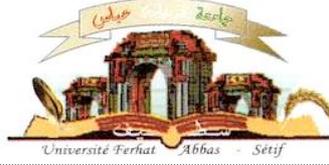


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2018

## THÈSE

Présentée par

**KADA Seoussen**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

THÈME

**Recherche d'extraits de plantes médicinales doués  
d'activités biologiques**

Soutenue publiquement le ...../...../2018

DEVANT LE JURY

|              |                             |                              |
|--------------|-----------------------------|------------------------------|
| Président    | <b>Dahamna Saliha</b>       | <b>Pr. UFA Sétif 1</b>       |
| Directeur    | <b>Bouriche Hamama</b>      | <b>Pr. UFA Sétif 1</b>       |
| Co-directeur | <b>Senator Abderrahmane</b> | <b>Pr. Univ. Batna</b>       |
| Examineurs   | <b>Lahouel Mesbah</b>       | <b>Pr. Univ. Jijel</b>       |
|              | <b>Zaama Djamila</b>        | <b>Pr. Univ. Constantine</b> |

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## **REMERCIEMENTS**

*Avant toute chose, je remercie DIEU, le tout puissant, pour m'avoir donné le courage et la patience d'achever ce travail.*

*J'exprime ma profonde gratitude à madame Pr **Bouriche Hamama**, qui m'a fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils pertinents, sa compétence scientifique et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail.*

*Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse :*

*Madame Pr. **Dahamna Saliha**, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*Monsieur Pr. **Senator Abderrahmane**, monsieur Pr. **Lahouel Mesbah** et madame Pr. **Zaama Djamil** d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.*

*Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique et spécialement Pr. **Abdellouche** et Dr. **Ouhida** ainsi que Mme **Benarab.S** de m'avoir aidé durant la réalisation des coupes histologiques ainsi que les membres de l'équipe du laboratoire de Biochimie, Hopital Saadna Abdenour de Sétif qui m'ont permis d'effectuer les dosages des différents paramètres biochimiques.*

*Je voudrais également adresser mes remerciements au Professeurs **Assaf.A Demirtas.I** et **Kizil.M** de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires en Turquie et en Jordanie, et m'ont permis d'effectuer les analyses photochimiques et les activités antioxydante et ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire.*

*Enfin, je n'oublie pas de remercier vivement les membres de notre équipe laborantine, en particulier, **Messaoudi Dalila**, **Karnouf Nassima**, **Meziti Hicham**, **Meziti Asma**, **Laouicha saliha**, **Kherbache Abdellah**, **Benbrinis soumia** et qui ont partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire.*

*Sans Oublier toutes mes amies : **Tigrine Chafia**, **Houchi Selma**, **Guemmaz Thoria**, **Nouar Hind**, **Madoui soraya**, **Naouel Marouani**, **Boudoukha Chahra**, **Benabdallah Hassiba**.*

*Tous mes enseignants : **Mahdadi Rachid**, **Khanchouche Abdelhalim**, **Belhattab Rachid**, **Arrar Lekhmissi**, **Baghiani Abderrahmane**, **Khanouf Sedik** et **Amira ismail**.*

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

## **Publications**

1. **Seoussen Kada.**, Hamama Bouriche., Abderrahmane Senator., Ibrahim Demirtas., Tevfik Ozen., Bircan Ceken Toptanci., Goksel Kızıl., Murat Kızıl. (2016). Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharmaceutical Biology*, 55(1) , 333-337.

2. **Seoussen Kada.**, Hamama Bouriche., Abderrahmane Senator., Fatih Gul., Ibrahim Demirtas (2016). Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Algerian *Cistus Salvifolius* Extracts. *Advances in Environmental Biology*, 10(1), 23-32.

3. Hamama Bouriche., **Seoussen Kada.**, Areej M. Assaf., Abderrahmane Senator., Fatih Gul., Ibrahim Demirtas (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharmaceutical Biology*, 54(1)

4. Hamama Bouriche., **Seoussen Kada.**, Abderrahmane Senator., Ibrahim Demirtas., Tevlik Ozen., Bircan Ceken Toptanci., Goksel Kızıl., Murat Kızıl (2017). Phenolic Content and Biomolecule Oxidation Protective Activity of *Globularia alypum* Extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, 1-14.

## **Communications**

• **Kada S**, Bouriche H, Senator A (2017). Antiinflammatory and antinociceptive activity of *Cistus salvifolius* aqueous extract. 4<sup>th</sup> international Conference on Pure and Applied Sciences: Renewable Energy. Istanbul Gelisim University, Istanbul, Turkey.

• **Kada S**, Bouriche H, Kherbache A, Laouicha S, Senator A (2016). Antiinflammatory activity of aqueous extract of *Hertia cheirifolia*. 1<sup>er</sup> séminaire iInternational de Pharmacie de Sétif (SIPS 2016). Université Ferhat Abbas, Sétif 1.

• **Kada S**, Bouriche H, Messaoudi D, Karnouf N, Senator A (2014). Analgesic and antiinflammatory activities of methanolic extract of *Globularia alypum*. 2<sup>nd</sup> ICONAHE (International Conference on Natural Health): Istanbul Gelisim University,

## DEDICACE

*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.*

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude  
et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

*A mon mari KAMEL, pour sa patience, son soutien et ses nombreux  
encouragements.*

*A mes deux adorables filles INES et MALAK  
A mes sœurs Amel et Nisrine et mon frère Djamel,*

*à toute la famille KADA.*

*A toute ma belle famille KHENOUCHE*

## ملخص

تم في هذه الدراسة تقدير الفعالية المضادة للالتهاب، للأوكسدة و للبكتيريا للمستخلص المائي و الميثانولي لكل من *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*. بين التقدير الكمي للمركبات الفينولية أن المستخلصات الميثانولية تحتوي على أعلى كمية من الفينول، الفلافونويدات و الدباغ مقارنة بالمستخلصات المائية. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 و 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة في تثبيط وذمة الرجل المحفزة بالكراجنين بنسب تراوحت بين 29% و 91%. من جهة أخرى أظهرت المعالجة الموضعية للفتران بـ 2 مغ/الأذن من المستخلصات المائية و الميثانولية تثبيطاً للتهاب الأذن المحفزة بزيت croton بنسب تراوحت بين 77% و 85%. كما أدت معالجة الفتران بـ 1مغ/مل من المستخلصات المائية و الميثانولية إلى انخفاض معنوي لهجرة الخلايا المتعادلة نحو موقع الإلتهاب ، تراوحت نسب التثبيط بين 38% و 65%. كما أدت معالجة الجرذان بجرعة 200مغ/كغ من المستخلصات إلى تثبيط تشكيل النسيج الحبيبي و انخفاض في الوزن الجاف لكريات القطن بنسب تراوحت بين 17.5% و 42%. أدى أيضاً تطبيق مراهم تحوي 2% من المستخلصات إلى شفاء كل الجروح المحدث في الجرذان بعد 15 يوم من العلاج بنسب تراوحت بين 80% إلى 90%. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 او 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة على تثبيط الألم المحدث بحمض الأستيك و الفورمالديهيد بنسب 18-80% و 25-80% على الترتيب. كل المستخلصات تثبط إتلاف بروتين الألبومين بنسب تتراوح بين 65 و 91% و تثبط تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب بين 15% و 96% و بينت قدرة على تثبيط افراز 1-IL،  $\gamma$ -INF، IL-8،  $\alpha$ -TNF. كما بينت النتائج أن كل المستخلصات أبدت قدرة عالية مضادة للجذور حرة و أظهرت قدرة معتدلة لإستخلاص المعادن و قدرة إرجاع متعلقة بالتركيز لا بأس بها. تثبط كل المستخلصات أكسدة حمض اللينوليك بنسب تراوحت بين 29-94% و كذلك أكسدة كل من البروتينات و ADN بنسب 78-98%. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي و الميثانولي لـ *Cistus salvifolius* تثبط نمو 8 سلالات بكتيرية في حين لم تبدي كل المستخلصات أي تثبيط على الفطريات. كخلاصة، فإن المستخلصات المائية و الميثانولية لكل من *Hertia cheirifolia*، *Globularia alypum* و *Cistus salvifolius* لها خصائص مضادة للالتهاب و مضادة للأوكسدة ، في حين أن *Cistus salvifolius* فقط لديه نشاط مضاد للجراثيم معتبر. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذه النباتات لعلاج بعض الاضطرابات المرتبطة بالالتهاب و الأوكسدة.

**الكلمات المفتاح:** مضادات الالتهاب، مضادات الجراثيم، مضادات الأوكسدة، مستخلصات النباتات، *Hertia cheirifolia* *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Résumé

La présente étude a été désignée pour l'évaluation des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des extraits aqueux (E.Aq) et méthanoliques (E.Met) de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* en utilisant plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*. Les dosages ont montré que les E. Met sont plus riches en polyphénols, flavonoïdes et en tannins que les E. Aq. *In vivo*, le traitement par voie orale des rats par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe l'œdème de la patte induit par la carragénine avec une inhibition entre 29% et 81%. D'une autre part, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.Aq ou E.Met a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 77%-89%. Le traitement des souris par 1 mg/poche d'E.Aq ou d'E.Met réduit significativement le nombre des leucocytes migrés vers le site enflammé avec un pourcentage de 38-65%. De même, le traitement des rats par 200 mg/Kg d'extraits inhibe la formation du granulome et le poids sec des pelletes en coton avec un pourcentage de 17.5-40%. L'application locale des pommades des extraits a réduit la surface des plaies 80-90%. Le traitement des souris par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe 18-80% et 25-80% la douleur induite par l'acide acétique et le formaldéhyde, respectivement. *In vitro*, tous les extraits ont prévenu la dénaturation du BSA avec 65-91%, ont inhibé l'hémolyse des érythrocytes avec 15-91% et ont inhibé la libération de  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8 et IL-1. D'autre part, les deux extraits montrent une forte activité anti-radicalaire et une activité chélatrice modérée. De même, les extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant, inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 29-94% et l'oxydation de l'ADN et des protéines avec 78-98%. Finalement, L'effet antibactérien des deux extraits a été déterminé sur 10 souches bactériennes et 3 souches fongiques par la méthode de diffusion sur l'agar. Enfin, les résultats ont révélé que Aq.E et Met.E de *Cistus salvifolius* ont le plus large spectre d'activité contre 8 souches, mais aucun effet n'a été observé sur les espèces fongiques avec tous les extraits testés. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, de *Globularia alypum*, de *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne remarquable. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et au stress oxydant.

**Mots clés:** anti-inflammatoire, antibactérien, antioxydant, extraits de plantes, *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Abstract

The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial activities of aqueous (Aq. E) and methanolic (Met. E) extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* using several models *in vivo* and *in vitro*. Results showed that Met. E are richer in polyphenols, flavonoids and tannins than aqueous ones. *In vivo*, the oral administration of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq.E and Met.E, inhibited the carragenine induced paw edema with 29% - 91%. The local treatment of mice with 2 mg/ear of Aq.E or Met.E inhibited croton oil induced ear edema with 77-89%. The treatment of rats with 1mg/pouch of Aq.E or Met.E decreased significantly the number of leucocytes migrated to inflammation site with 38-65%. Similarly, the treatment of rats by 200 mg/kg of extracts inhibited the granuloma dry weigh formation by 17.5-40%. The topical application 2% extracts reduced wound area by 80-90% after 15 days of treatment. Moreover, the treatment of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq. E and Met.E inhibited the pain induced by acetic acid and formaldehyde with 18-80% and 25-80%, respectively. *In vitro*, all extracts prevented BSA denaturation by 65-91%, inhibited the erythrocytes hemolysis by 15-91% and decreased the release of  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8 and IL-1. On the other hand, all extracts showed high antiradical activity against DPPH radicals and moderate chelating activity. All extracts showed a good concentration dependent reducing power and inhibited linoleic acid oxidation by 29-94% and protected DNA, protein and lipid oxidation by 78-98%. Finally, the results revealed that Aq.E and Met.E of *Cistus salvifolius* has the broadest spectrum of activity against 8 strains but no effect has been observed against fungal species with all extracts tested. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* exhibit anti-inflammatory, antioxidant, while only *Cistus salvifolius* exhibits antibacterial activity. Taken together, this study supports the traditional use of these plants to treat some disorders related to inflammation and oxidative stress.

**Key words:** anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, plant extracts, phytothérapie, *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*.

## ملخص

تم في هذه الدراسة تقدير الفعالية المضادة للالتهاب، للأوكسدة و للبكتيريا للمستخلص المائي و الميثانولي لكل من *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*. بين التقدير الكمي للمركبات الفينولية أن المستخلصات الميثانولية تحتوي على أعلى كمية من الفينول، الفلافونويدات و الدباغ مقارنة بالمستخلصات المائية. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 و 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة في تثبيط وذمة الرجل المحفزة بالكراجنين بنسب تراوحت بين 29% و 91%. من جهة أخرى أظهرت المعالجة الموضعية لأذن الفئران بجرعة 2 مغ/لأذن من المستخلصات المائية و الميثانولية تثبيطاً للتهاب الأذن المحفزة بزيت croton بنسب تراوحت بين 77% و 85%. كما أدت معالجة الفئران بـ 1مغ/مل من المستخلصات المائية و الميثانولية إلى انخفاض معنوي لهجرة الخلايا المتعادلة نحو موقع الإلتهاب، تراوحت نسب التثبيط بين 38% و 65%. كما أدت معالجة الجرذان بجرعة 200مغ/كغ من المستخلصات إلى تثبيط تشكيل النسيج الحبيبي و انخفاض في الوزن الجاف لكريات القطن بنسب تراوحت بين 17.5% و 42%. أدى أيضاً تطبيق مراهم تحوي 2% من المستخلصات إلى شفاء كل الجروح المحدث في الجرذان بعد 15 يوم من العلاج بنسب تراوحت بين 88% إلى 96%. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 او 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة على تثبيط الألم المحدث بحمض الأستيك و الفورمالديهايد بنسب 18-80% و 25-80% على الترتيب. كل المستخلصات تثبطت إتلاف بروتين الألبومين بنسب تتراوح بين 65 و 91% و تثبطت تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب بين 15% و 96% و بينت قدرة على تثبيط افراز  $TNF-\alpha$ ,  $IL-8$ ,  $INF-\gamma$ ,  $IL-1$ . كما بينت النتائج أن كل المستخلصات أبدت قدرة عالية مضادة للجذور الحرة و أظهرت قدرة معتدلة لإستقلاب المعادن و قدرة إرجاع متعلقة بالتركيز لا بأس بها. تثبطت كل المستخلصات أكسدة حمض اللينولويك بنسب تراوحت بين 29-94% و كذلك أكسدة كل من البروتينات و ADN بنسب 78-98%. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي و الميثانولي لـ *Cistus salvifolius* تثبط نمو 8 سلالات بكتيرية في حين لم تبدي كل المستخلصات أي تثبيط على الفطريات. كخلاصة، فإن المستخلصات المائية و الميثانولية لكل من *Hertia cheirifolia* و *Globularia alypum* و *Cistus salvifolius* لها خصائص مضادة للالتهاب و مضادة للأوكسدة، في حين أن *Cistus salvifolius* فقط لديه نشاط مضاد للجراثيم معتبر. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذه النباتات لعلاج بعض الاضطرابات المرتبطة بالالتهاب و الأوكسدة.

الكلمات المفاتيح: مضادات الالتهاب، مضادات الجراثيم، مضادات الأوكسدة، مستخلصات النباتات، *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Résumé

La présente étude a été désignée pour l'évaluation des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des extraits aqueux (E.Aq) et méthanoliques (E.Met) de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* en utilisant plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*. Les dosages ont montré que les E. Met sont plus riches en polyphénols, flavonoïdes et en tannins que les E. Aq. *In vivo*, le traitement par voie orale des rats par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe l'œdème de la patte induit par la carragénine avec une inhibition entre 29% et 81%. D'une autre part, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.Aq ou E.Met a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 77%-89%. Le traitement des souris par 1 mg/poche d'E.Aq ou d'E.Met réduit significativement le nombre des leucocytes migrés vers le site enflammé avec un pourcentage de 38-65%. De même, le traitement des rats par 200 mg/Kg d'extraits inhibe la formation du granulome et le poids sec des pellettes en coton avec un pourcentage de 17.5-40%. L'application locale des pommades des extraits a réduit la surface des plaies 88-96%. Le traitement des souris par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe 18-80% et 25-80% la douleur induite par l'acide acétique et le formaldéhyde, respectivement. *In vitro*, tous les extraits ont prévenu la dénaturation du BSA avec 65-91%, ont inhibé l'hémolyse des érythrocytes avec 15-91% et ont inhibé la libération de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 et IL-1. D'autre part, les deux extraits montrent une forte activité anti-radicalaire et une activité chélatrice modérée. De même, les extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant, inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 29-94 % et l'oxydation de l'ADN et des protéines avec 78-98%. Finalement, L'effet antibactérien des deux extraits a été déterminé sur 10 souches bactériennes et 3 souches fongiques par la méthode de diffusion sur l'agar. Enfin, les résultats ont révélé que Aq.E et Met.E de *Cistus salvifolius* ont le plus large spectre d'activité contre 8 souches, mais aucun effet n'a été observé sur les espèces fongiques avec tous les extraits testés. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, de *Globularia alypum*, de *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne remarquable. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et au stress oxydant.

**Mots clés:** anti-inflammatoire, antibactérien, antioxydant, extraits de plantes, *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Abstract

The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial activities of aqueous (Aq. E) and methanolic (Met. E) extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* using several models *in vivo* and *in vitro*. Results showed that Met. E are richer in polyphenols, flavonoids and tannins than aqueous ones. *In vivo*, the oral administration of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq.E and Met.E, inhibited the carragenane induced paw edema with 29% - 91%. The local treatment of mice with 2 mg/ear of Aq.E or Met.E inhibited croton oil induced ear edema with 77-89%. The treatment of rats with 1mg/pouch of Aq.E or Met.E decreased significantly the number of leucocytes migrated to inflammation site with 38-65%. Similarly, the treatment of rats by 200 mg/kg of extracts inhibited the granuloma dry weigh formation by 17.5-40%. The topical application 2% extracts reduced wound area by 88-96% after 15 days of treatment. Moreover, the treatment of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq. E and Met.E inhibited the pain induced by acetic acid and formaldehyde with 18-80% and 25-80%, respectively. *In vitro*, all extracts prevented BSA denaturation by 65-91%, inhibited the erythrocytes hemolysis by 15-91% and decreased the release of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1. On the other hand, all extracts showed high antiradical activity against DPPH radicals and moderate chelating activity. All extracts showed a good concentration dependent reducing power and inhibited linoleic acid oxidation by 29-94% and protected DNA, protein and lipid oxidation by 78-98%. Finally, the results revealed that Aq.E and Met.E of *Cistus salvifolius* has the broadest spectrum of activity against 8 strains but no effect has been observed against fungal species with all extracts tested. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* exhibit anti- inflammatory, antioxidant, while only *Cistus salvifolius* exhibits antibacterial activity. Taken together, this study supports the traditional use of these plants to treat some disorders related to inflammation and oxidative stress.

**Key words:** anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, plant extracts, phytothérapie, *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AINS:** Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**AIS:** Anti-inflammatoires stéroïdiens.

**ALAT:** Alanine aminotransférase

**ASK-1:** Apoptosis signal regulating Kinase-1

**ASAT:** Aspartate transaminase

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BHT:** butylatedhydroxytoluene

**CAT:** Catalase

**COX:** Cyclooxygenase

**CSF:** Colonies Stimulating Factor

**DL<sub>50</sub>:** Dose létale 50

**DMSO:** Diméthyle sulfoxyde

**DPPH:** 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl

**EAG:** Equivalent d'acide gallique

**E.Aq :** Extrait aqueux

**EAT:** Equivalent acide tannique

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**ELAM:** Molécules d'adhérence des leucocytes endothéliales

**E.Met :** Extrait méthanolique

**EQ:** Equivalent quercétine

**ERK:** Extracellular Signal Regulated Kinases

**ERN:** Espèce réactive d'azote

**ERO:** Espèce réactive d'oxygène

**GLU:** Glucose

**GSH:** Glutathion

**GM-CSF:** Granulocyte monocyte-colony stimulating factor

**HPLC-TOF-MS:** High Performance Liquid Chromatography Time of Flight- Mass Spectrometry.

**IC<sub>50</sub>:** Concentration inhibitrice à 50%

**ICAM :** Inter Cellular Adhesion Molecule

**IFN $\gamma$  :** Interféron $\gamma$

**IL:** Interleukine  
**iNOS :** Oxyde nitrique synthase inductible  
**JNK:** Kinase-c-Jun N-terminal  
**LOX:** Lipooxygénase  
**LPS:** Lipopolysaccharides  
**Lh :** Lymphocyte T helper  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**MDA:** Malondialdéhyde  
**MPO:** Myeloperoxydase  
**MCP-1:** Monocyte Chemotactic Factor  
**NF-kB:** Nuclear factor-kappaB.  
**NO:** Nitric Oxyde  
**OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economiques  
**PAF:** Facteur activateur des plaquettes  
**PAL :** Phosphatase alcaline  
**PBMC:** Cellules mononucléaires périphériques  
**PFG:** Produits finaux de glycosylation  
**PGH<sub>2</sub>:** Prostaglandine H<sub>2</sub>  
**PLA<sub>2</sub>:** Phospholipase A<sub>2</sub>  
**PMNs:** Polynucléaires morphonucleaires neutrophiles  
**SEM:** Erreur standard de la moyenne  
**SD:** Standard déviation  
**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis  
**SOD:** Superoxyde dismutase  
**TEMED:** Tetra Methyl Ethylene Diamine  
**TGF-β:** Facteur de croissance transformant β  
**TNF:** Facteur de necrose tumoral  
**VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
**VEGF:** Vascular endothelial growth factor  
**XO:** Xanthine oxydase

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1.</b> Evolution de l'inflammation aiguë .....  | 4  |
| <b>Figure 2.</b> Initiation de l'inflammation .....   | 5  |
| <b>Figure 3.</b> Phase cellulaire de l'inflammation .....   | 6  |
| <b>Figure 4.</b> Composants cellulaires et médiateurs de la phase de résolution .....   | 7  |
| <b>Figure 5.</b> Réponse inflammatoire aiguë et rôle des médiateurs lipidiques dans la résolution ou la défaillance de l'inflammation .....     | 9  |
| <b>Figure 6.</b> Site d'inhibition des cyclo-oxygénases par l'aspirine et les AINS .....  | 13 |
| <b>Figure 7.</b> Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote intervenant dans le phénomène du stress oxydant .....                             | 16 |
| <b>Figure 8.</b> Sources endogènes des espèces réactives oxygénées .....  | 17 |
| <b>Figure 9.</b> Cibles biologiques et dommages induits par les ROS .....   | 20 |
| <b>Figure 10.</b> Réaction de la peroxydation lipidique .....   | 21 |
| <b>Figure 11.</b> Principales circonstances pathologiques accompagnant le stress oxydant .....  | 24 |
| <b>Figure 12.</b> Principales stratégies mises par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques .....                               | 28 |
| <b>Figure 13.</b> Photographie de <i>Hertia cheirifolia</i> de djabel boutaleb .....  | 32 |
| <b>Figure 14.</b> Photographie de <i>Cistus salvifolius</i> de djabel boutaleb .....  | 34 |
| <b>Figure 15.</b> Photographie de <i>Globularia alypum</i> de djabel boutaleb .....   | 37 |
| <b>Figure 16.</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....  | 40 |
| <b>Figure 17.</b> Droite d'étalonnage de la quercétine.....   | 41 |
| <b>Figure 18.</b> Droite d'étalonnage de l'acide tannique .....   | 42 |
| <b>Figure 19.</b> Courbe d'étalonnage des alcaloïdes .....  | 42 |
| <b>Figure 20.</b> Principales étapes d'isolement de PBMCs à partir de sang humain .....   | 50 |
| <b>Figure 21.</b> Contenu en composé phénoliques des E.Met et E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> .....   | 58 |
| <b>Figure 22.</b> Contenu en pigments liposolubles des E.Met et E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> ..... | 59 |
| <b>Figure 23.</b> Profils chromatographiques de l'E.Met et l'E.Aq de <i>G. alypum</i> obtenus par HPLC-TOF-MS .....                             | 61 |
| <b>Figure 24.</b> Profil chromatographique de l'E.Met et l'E.Aq de <i>C. salvifolius</i> obtenu par HPLC TOF/MS .....                           | 63 |
| <b>Figure 25.</b> Profil chromatographique de l'E.Met et l'E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> obtenu par HPLC-TOF-MS.....                            | 64 |
| <b>Figure 26.</b> Courbe dose-réponse chez les souris traitées par l'extrait méthanolique de <i>C. salvifolius</i> .....                        | 65 |
| <b>Figure 27.</b> Evolution pondérale des souris durant les 14 jours de toxicité aiguë. ....  | 67 |
| <b>Figure 28.</b> Valeurs de la masse relative des organes des souris .....   | 67 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 29.</b> Photomicrographie du rein des souris .....  | 69 |
| <b>Figure 30.</b> Photomicrographie d'une coupe du foie des souris .....  | 69 |
| <b>Figure 31.</b> Effet de l'extrait aqueux et méthanolique de <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> sur l'œdème de l'oreille .....   | 70 |
| <b>Figure 32.</b> Effets des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.....                  | 72 |
| <b>Figure 33.</b> Effets des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.....                  | 73 |
| <b>Figure 34.</b> Effets des extraits aqueux et des extraits méthanolique de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air .....                          | 73 |
| <b>Figure 35.</b> Effet des extraits aqueux et des extraits méthanoliques de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur le poids de la rate .....  | 75 |
| <b>Figure 36.</b> Effet des extraits aqueux et des extraits méthanoliques de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur le nombre total des globules blancs .....  | 75 |
| <b>Figure 37.</b> Effet de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> sur le nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique. ....                | 77 |
| <b>Figure 38.</b> Effet analgésique des extraits aqueux et des extraits méthanolique de <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> sur le temps de réaction de la douleur induite par le formaldéhyde.. .... | 78 |
| <b>Figure 39.</b> Effet des E. Met et E. Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique.....  | 80 |
| <b>Figure 40.</b> Effet des E. Met et E. Aq de <i>H. Cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> sur la dénaturation de BSA.....  | 81 |
| <b>Figure 41.</b> Effet des E. Met et E. Aq de <i>Globularia alypum</i> , <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Hertia cheirifolia</i> sur la production du TNF- $\alpha$ .....   | 83 |
| <b>Figure 42.</b> Effet des différentes concentrations des E. Met et E. Aq <i>Globularia alypum</i> , <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Hertia cheirifolia</i> sur la production de l'IL-1.....                                       | 84 |
| <b>Figure 43.</b> Effet des différentes concentrations des E. Met et E. Aq de <i>Globularia alypum</i> , <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Hertia cheirifolia</i> sur la production de l'IN- $\gamma$ .....                           | 85 |
| <b>Figure 44.</b> Effet des E. Met et E. Aq de <i>Globularia alypum</i> , <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Hertia cheirifolia</i> sur la production de l'IL-8.....   | 86 |
| <b>Figure 45.</b> Activité antiradicalaire des extraits aqueux et méthanoliques de <i>G. alypum</i> , <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et du BHT vis-à-vis du radical DPPH.....  | 88 |
| <b>Figure 46.</b> Activités chélatrices des extraits aqueux et méthanoliques de <i>G. alypum</i> , <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux.....   | 89 |
| <b>Figure 47.</b> Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>G. alypum</i> , de <i>C. salvifolius</i> , de <i>H. cheirifolia</i> et de BHT .....   | 90 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 48.</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène en présence et en absence des E.Met et E.Aq de <i>G. alypum</i> , <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et du BHT ..... | 92 |
| <b>Figure 49.</b> Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>H. cheirifolia</i> contre l'oxydation de l'ADN. ....  | 94 |
| <b>Figure 50.</b> Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>G. alypum</i> contre l'oxydation de l'ADN. ....   | 94 |
| <b>Figure 51.</b> Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>C. salvifolius</i> contre l'oxydation de l'ADN. ....  | 95 |
| <b>Figure 52.</b> Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de <i>G. alypum</i> contre l'oxydation de la BSA.....  | 95 |
| <b>Figure 53.</b> Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de <i>C. salvifolius</i> contre l'oxydation de la BSA. ....  | 96 |
| <b>Figure 54.</b> Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de <i>H. cheirifolia</i> contre l'oxydation de la BSA.....   | 96 |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1.</b> Cytokines impliquées dans différents pathologies .....   | 12 |
| <b>Tableau 2.</b> Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne .....   | 30 |
| <b>Tableau 3.</b> Classes de toxicité selon l'échelle de Diezi (1989) chez les souris de laboratoire .....   | 44 |
| <b>Tableau 4.</b> Rendements d'extraction et teneurs de l' E. Met et E .Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins .....                  | 58 |
| <b>Tableau 5.</b> Teneurs total en alcaloïdes des E.Met et E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> . .....   | 59 |
| <b>Tableau 6.</b> Composés phénoliques identifiés par HPLC/TOFMS dans l'E.Met et l'E.Aq de <i>G. alypum</i> , <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Hertia cherifolia</i> .....  | 60 |
| <b>Tableau 7.</b> Taux de mortalité des souris traitées par l'E.Met de <i>C. salvifolius</i> .....   | 65 |
| <b>Tableau 8.</b> Détermination des différentes doses létales (DL) de l'E.Met de <i>C. salvifolius</i> chez les souris par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés .....                                   | 66 |
| <b>Tableau 9.</b> Détermination des différentes doses létales (DL) de l'E.Met de <i>C. salvifolius</i> chez les souris par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés .....                                   | 68 |
| <b>Tableau 10.</b> Effet des E.Met et E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> et <i>C. salvifolius</i> sur la formation du granulome induit par les pelletes en coton chez le rat .....                     | 74 |
| <b>Tableau 11.</b> Effet cicatrisant des E.Met et E.Aq de <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et <i>G. alypum</i> .....  | 76 |
| <b>Tableau 12.</b> Effet des E. Met et E .Aq de <i>H. cheirifolia</i> (HC), <i>C. salvifolius</i> (CS) et <i>G. alypum</i> (GA) et l'aspirine sur les contorsions induites par l'acide acétique chez la souris ..... | 78 |
| <b>Tableau 13.</b> Activité antiradicalaire des extraits aqueux (E. Aq) et méthanoliques (E. Met) de <i>G. alypum</i> , <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et du BHT vis-à-vis du radical DPPH.....       | 88 |
| <b>Tableau 14.</b> Valeurs IC <sub>50</sub> et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits de <i>G. alypum</i> , <i>H. cheirifolia</i> , <i>C. salvifolius</i> et de l'EDTA. ....              | 89 |
| <b>Tableau 15.</b> Les EC <sub>50</sub> des E.Met et des E.Aq de <i>G. alypum</i> , <i>C. salvifolius</i> , <i>H. cheirifolia</i> et du BHT.....   | 89 |
| <b>Tableau 16.</b> Effet des extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de <i>H. cheirifolia</i> , <i>G. alypum</i> , <i>C. salvifolius</i> et l'amoxicilline sur la croissance bactérienne .....              | 97 |

## SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | 1  |
| <b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>  |    |
| <b>I. Inflammation</b> .....  | 3  |
| I.1. Inflammation aiguë .....   | 3  |
| I.1.1. Phase vasculaire.....  | 3  |
| I.1.2. Phase cellulaire.....  | 4  |
| I.1.3. Phase de résolution .....  | 6  |
| I.2. Inflammation chronique.....  | 8  |
| I.3. Médiateurs de l'inflammation.....  | 8  |
| I.4. Pathologies inflammatoires.....  | 11 |
| I.5. Traitement de l'inflammation .....   | 12 |
| I.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....                                   | 12 |
| I.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens .....                                      | 13 |
| I.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....                                | 14 |
| <b>II. Stress oxydant</b> .....   | 15 |
| II.1. Espèces réactives de l'oxygène .....  | 15 |
| II.2. Sources des espèces réactives oxygénées .....                               | 16 |
| II.2.1. Sources endogènes .....   | 17 |
| II.2.2. Sources exogènes .....  | 18 |
| II.3. Rôles physiologiques des ROS.....   | 18 |
| II.3.1. Défense contre les infections.....  | 18 |
| II.3.2. Transduction du signal et régulation de la prolifération cellulaire ..... | 19 |
| II.4. Oxydation des macromolécules .....  | 19 |
| II.4.1. Peroxydation lipidique .....  | 20 |
| II.4.2. Oxydation des protéines .....   | 21 |
| II.4.3. Oxydation de l'ADN .....  | 22 |
| II.2.4. Oxydation des glucides .....  | 22 |
| II.5. Maladies liées au stress oxydatif .....                                     | 23 |
| II.6. Antioxydants .....  | 23 |
| II.6.1. Antioxydants endogènes .....  | 23 |
| II.6.2. Antioxydants exogènes .....   | 25 |
| II.6.3. Autres antioxydants.....  | 26 |

|   |    |
|---|----|
| <b>III. Infections bactériennes</b> .....           | 26 |
| III.1. Résistance aux antibiotiques .....           | 27 |
| III.2. Traitement des infections bactériennes ..... | 28 |
| <b>IV. Plantes étudiées</b> .....                   | 31 |
| IV.1. <i>Hertia cheirifolia</i> L.....              | 31 |
| IV.2. <i>Cistus salvifolius</i> L.....              | 33 |
| IV.3. <i>Globularia alypum</i> L.....               | 36 |

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

|  |    |
|--|----|
| <b>I. Matériel</b> .....   | 36 |
| I.1. Matériel végétale .....   | 36 |
| I.2. Animaux .....   | 36 |
| I.3. Sang humain et bovin .....  | 36 |
| I.4. Microorganismes .....   | 36 |
| <b>II. Méthodes</b> .....  | 37 |
| II.1. Extraction .....   | 37 |
| II.1.1. Préparation des extraits aqueux .....                                | 37 |
| II.1.2. Préparation des extraits méthanoliques .....                         | 37 |
| II. 2. Analyses phytochimiques.....  | 37 |
| II.2.1. Dosage des polyphénols totaux .....                                  | 37 |
| II.2.2. Dosage des flavonoïdes .....   | 38 |
| II.2.3. Dosage des tannins .....   | 39 |
| II.2.4. Dosage des alcaloïdes .....  | 39 |
| II.2.5. Dosage des pigments liposolubles.....                                | 41 |
| II.2.6. Analyse par HPLC/TOF/MS.....   | 41 |
| II.3. Etude toxicologique.....   | 41 |
| II.3.1. Détermination de la DL <sub>50</sub> .....                           | 42 |
| II.3.2. Examen biochimique.....  | 42 |
| II.3.3. Examen histologique .....  | 42 |
| II.4. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....                       | 43 |
| II.4.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris ..... | 43 |
| II.4.2. Œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat .....        | 44 |
| II.4.3. Poche d'air.....   | 44 |
| II.4.4. Granulome au pellet de coton.....                                    | 45 |
| II.4.5. Détermination de l'activité cicatrisante.....                        | 45 |
| II.4.6. Détermination de l'activité analgésique .....                        | 46 |
| II.4.6.1. Test de contorsion dorso-abdominale .....                          | 46 |

|   |    |
|---|----|
| II.4.6.2. Test du formaldéhyde.....                           | 46 |
| II.5. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....       | 47 |
| II.5.1. Production des cytokines .....                        | 47 |
| II.5.1.1. Isolement des monocytes périphériques du sang ..... | 48 |
| II.5.1.2. Culture cellulaire et dosage des cytokines .....    | 48 |
| II.5.2. Inhibition de la dénaturation des protéines.....      | 49 |
| II.5.3. Stabilité membranaire des érythrocytes humains .....  | 49 |
| II.6. Activité antioxydante .....                             | 50 |
| II.6.1. Activité anti-radicalaire.....                        | 50 |
| II.6.2. Chélation du fer ferreux .....                        | 50 |
| II.6.3. Pouvoir réducteur .....                               | 51 |
| II.6.4. Blanchiment du $\beta$ -carotène.....                 | 51 |
| II.6.5. Oxydation de l'ADN .....                              | 52 |
| II.6.6. Oxydation des protéines .....                         | 52 |
| II.7. Activité antimicrobienne .....                          | 53 |
| II.7.1. Evaluation de l'activité antibactérienne .....        | 53 |
| II.7.2. Evaluation de l'activité antifongique .....           | 53 |
| II.8. Analyses statistique .....                              | 54 |

## RESULTATS

|   |    |
|---|----|
| I. Analyses phytochimiques .....  | 57 |
| 1.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins .....                            | 57 |
| I .2. Détermination des pigments liposolubles .....   | 57 |
| I.3. Dosage des alcaloïdes .....  | 57 |
| I.4. Caractérisation phytochimique par HPLC/Tof-MS .....  | 60 |
| II. Etude de la toxicité aigue.....   | 62 |
| II.1. Estimation de la DL <sub>50</sub> .....   | 62 |
| II.2. Evolution pondérale.....  | 66 |
| II.3. Effets de l'extrait méthanolique de <i>C. salvifolius</i> sur quelques paramètres biochimiques..... | 68 |
| II.4. Effets de l'extrait methanolique de <i>C. salvifolius</i> sur l'histologie du rein et du foie.....  | 68 |
| III. Activité anti-inflammatoire .....  | 70 |
| III.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....   | 70 |
| III.1.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris .....    | 70 |
| III.1.2. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat .....           | 71 |
| III.1.3. Effet des extraits sur la poche d'air .....  | 71 |
| III.1.4. Granulome au pellet de coton .....   | 74 |
| III.1.5. Activité cicatrisante.....   | 74 |
| III.1.6. Activité analgésique.....  | 75 |

|  |     |
|--|-----|
| III.2. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....                               | 78  |
| III.2.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains..... | 78  |
| III.2.2. Effet des extraits sur la dénaturation des protéines.....                     | 78  |
| III.2.3. Effet des extraits sur la libération des cytokines.....                       | 79  |
| III.2.3.1. Effet des extraits sur la libération de TNF- $\alpha$ .....                 | 79  |
| III.2.3.2. Effet sur la libération de l'IL-1 .....                                     | 80  |
| III.2.3.3. Effet sur la libération de IN- $\gamma$ .....                               | 80  |
| III.2.3.4. Effet sur la libération de l'IL-8 .....                                     | 80  |
| IV. Activité antioxydante .....  | 85  |
| IV.1. Activité antiradicalaire.....  | 85  |
| IV.2. Effet chélateur du fer ferreux.....  | 85  |
| IV.3. Pouvoir réducteur.....   | 88  |
| IV.4. Blanchissement du $\beta$ -carotène .....  | 89  |
| IV.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN .....   | 89  |
| IV.6. Effet sur l'oxydation des protéines .....  | 91  |
| V. Activité antibactérienne.....   | 95  |
| <b>DISCUSSION</b>  |     |
| I. Extraction et analyse phytochimique.....  | 96  |
| II. Etude toxicologique .....  | 99  |
| III. Activité antiinflammatoire .....  | 100 |
| III.1. Activité antiinflammatoire <i>in vivo</i> .....                                 | 100 |
| III.2. Activité antiinflammatoire <i>in vitro</i> .....                                | 106 |
| VI. Activité antioxydante.....   | 108 |
| VI.1. Activité antiradicalaire.....  | 109 |
| VI.2. Activité chélatrice .....  | 109 |
| VI.3. Activité réductrice.....   | 110 |
| VI.4. Effet sur la peroxydation des lipides.....                                       | 111 |
| VI.5. Effet sur l'oxydation d'ADN .....  | 111 |
| VI.6. Effet sur l'oxydation des protéines .....  | 111 |
| V. Activité Antibactérienne.....   | 112 |
| <b>CONCLUSION ET PESPECTIVES</b> .....   | 117 |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....   | 119 |
| <b>ANNEXE</b>  |     |

# Introduction

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire qui s'orientent vers l'incorporation des molécules d'origine naturelle dans leurs produits. Sachant que dans le domaine pharmaceutique, 60% à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle, et près de 25% des prescriptions sont à base de plantes. De même, selon l'OMS (2008), plus de 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour traiter plusieurs maladies (Pierangeli *et al.*, 2009). En effet, les substances naturelles d'origine végétale sont douées de plusieurs activités biologiques comme l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne... etc.

Le traitement de l'inflammation est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes. Tous les AINS, quelles que soient leur voie d'administration, présentent des risques de toxicité gastro-intestinale et rénale. Le risque est d'autant plus important que la posologie est élevée et que le traitement est prolongé. Dans la plupart des cas, la phytothérapie

peut s'imposer comme une alternative avec des effets secondaires moindres.

D'autre part, la production non contrôlée des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote provoquent ou maintiennent les processus inflammatoires, conduisant à plusieurs maladies tels que le cancer, le diabète, l'asthme, le vieillissement précoce, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et inflammatoires. La neutralisation de ces espèces par les antioxydants, surtout d'origine naturelle, peut limiter l'endommagement des biomolécules (ADN, protéines, lipides et sucres).

A l'heure actuelle le phénomène de résistance bactérienne est connu chez toutes les familles d'antibiotiques et touche presque toutes les espèces bactériennes. L'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies constitue une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes.

De nombreuses recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation des substances naturelles douées d'activités biologiques afin d'établir des règles scientifiques pour leur usage. Et c'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail qui a pour objectif principal d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de trois plantes médicinales couramment utilisées en médecine traditionnelle: *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius*.

Dans cette étude cinq volets sont étudiés :

- Le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la quantification des composés phénoliques, des pigments liposolubles et des alcaloïdes et l'identification des composés phénoliques.
- Le second est consacré à évaluer la toxicité des extraits de plantes étudiées, dans le but de définir le seuil toxique et l'intervalle d'innocuité de ces extraits.
- Dans le troisième volet, les activités anti-inflammatoires (*in vivo* et *in vitro*) ont été étudiées en utilisant plusieurs modèles:
  - Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.
  - Œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.
  - Poche d'air.
  - Granulome au pellet de coton.
  - Activité cicatrisante.
  - Activité analgésique.
  - Production des cytokines.
  - Inhibition de la dénaturation des protéines.
  - Stabilité membranaire des érythrocytes humains.
- le quatrième volet est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, chélation, pouvoir réducteur, blanchiment de la  $\beta$ -carotène, peroxydation des lipides, oxydation de l'ADN et des protéines).
- Le dernier volet a été consacré à l'évaluation des activités antibactérienne et antifongique des extraits étudiés.

**Revue**  
**Bibliographique**

## I. Inflammation

L'inflammation est un mécanisme physiologique de défense de l'hôte contre l'invasion par des agents pathogènes. Cependant, elle peut avoir des effets néfastes si elle n'est pas régulée. Elle est accompagnée par la production de divers médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les leucotriènes et les prostaglandines (Noack *et al.*, 2018). En outre, les cellules inflammatoires peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de nitrogène qui peuvent déclencher des réactions d'oxydation toxiques, conduisant à des lésions tissulaires (Majdalawieh et Fayyad, 2015).

L'inflammation peut être aigue ou chronique. La première est une réponse immédiate de courte durée, habituellement, elle disparaît spontanément ou avec un traitement. Toutefois, elle peut évoluer vers une inflammation chronique à laquelle plusieurs maladies peuvent être liées (Roifman *et al.*, 2011; Noack *et al.*, 2018).

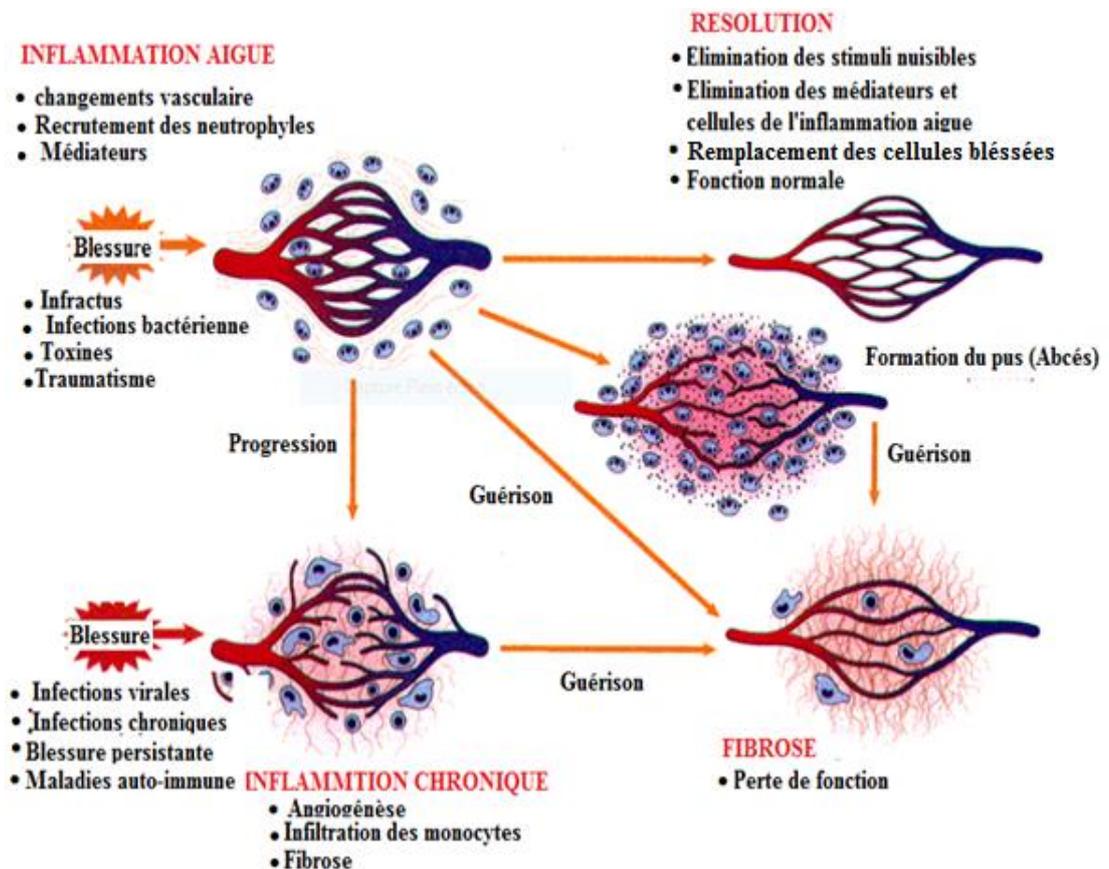
### I.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate de quelques jours à quelques semaines, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Elle se traduit par quatre symptômes cardinaux: œdème, rougeur, douleur et chaleur. Cependant, un échec dans la résolution provoque une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à la progression en inflammation chronique (Khanna *et al.*, 2010; Lee et Surh, 2012 ; Rathinam et Fitzgerald, 2016) (**Figure 1**). La réponse inflammatoire aiguë se déroule en trois phases.

#### I.1.1. Phase vasculaire

La réponse vasculaire (**Phase d'initiation**) comporte une vasoconstriction réflexe très brève suivie d'une vasodilatation durable suite à une lésion tissulaire ou un signal de danger endogène ou exogène, ce qui entraîne une exudation de liquide plasmatique et donc la formation d'œdème (Dorword *et al.*, 2012). L'augmentation de la perméabilité entraîne aussi la diapédèse et la migration extravasculaire des leucocytes. La brève vasoconstriction de quelques secondes va perturber le mouvement des plaquettes dans la circulation sanguine et entraîner leur activation. Les plaquettes activées produisent du thromboxane A<sub>2</sub> aux propriétés agrégantes et vasoconstrictrices puissantes et favorisent la libération de médiateurs comme la sérotonine et l'histamine (**Figure 2**). La libération de ces facteurs vasoactifs entraînent une vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire et par conséquent l'exudation plasmatique (Buckley *et al.*, 2014). 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 hyperpression sur les terminaisons nerveuses locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill *et al.*, 2003).



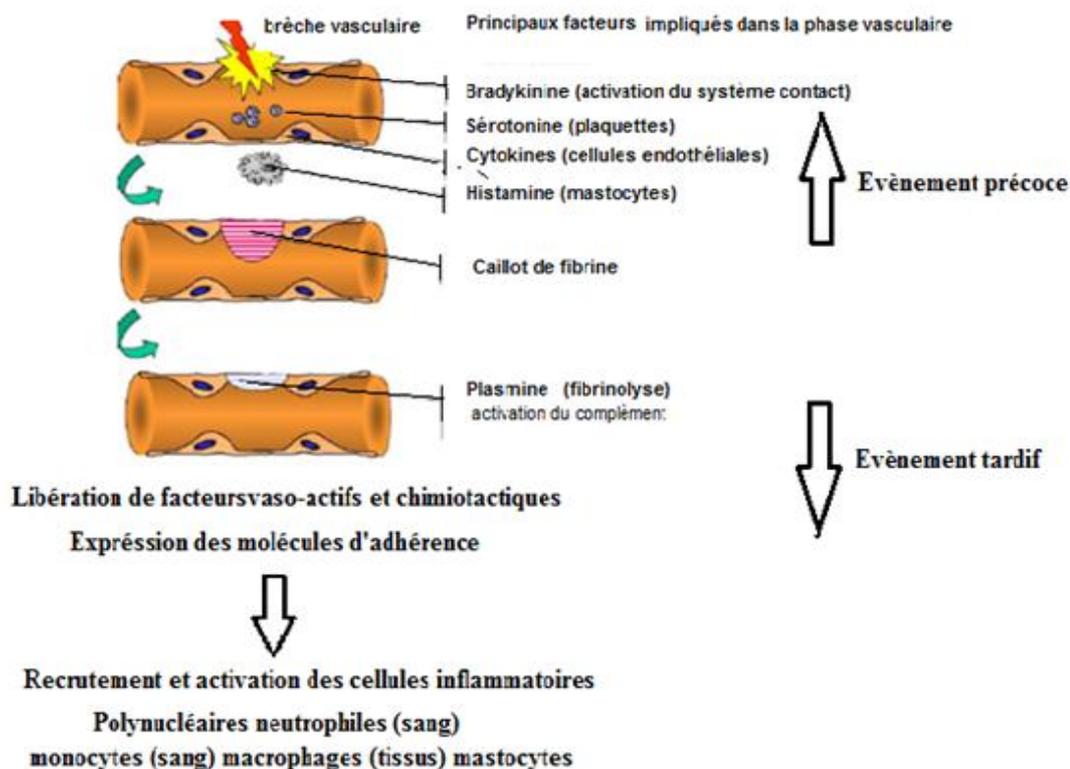
**Figure 1.** Evolution de l'inflammation aiguë (Kumar *et al.*, 2007).

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.

De plus, l'activation des facteurs de coagulation en présence de facteurs tissulaires aboutit à la formation de fibrine qui vient consolider le clou hémostatique formé par l'agrégation des plaquettes. La fibrine est un puissant agent chimiotactique des polynucléaires neutrophiles (Autier *et al.*, 2004).

### I.1.2. Phase cellulaire

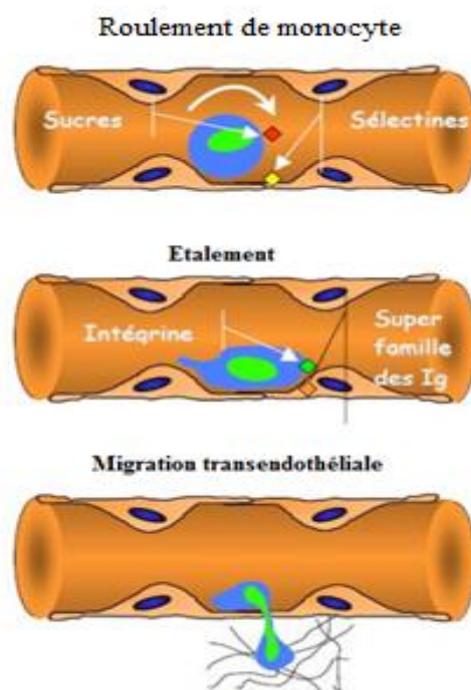
Cette phase fait suite à la réponse vasculaire, elle implique surtout les cellules endothéliales et les leucocytes circulants. Elle est caractérisée par un afflux extravasculaire



**Figure 2.** Initiation de l'inflammation (Prin *et al.*, 2009).

interstitiel de leucocytes, les polynucléaires neutrophiles (PMNs) dans un premier temps puis les monocytes. L'accumulation des neutrophiles atteint son maximum à la 4<sup>ème</sup> heure puis décline rapidement, alors que le nombre de monocytes augmente après la 4<sup>ème</sup> heure et atteint son maximum entre 18 et 24 heures. Les polynucléaires circulants sont attirés vers le foyer inflammatoire par des facteurs chimiotactiques. Les PMNs circulants se marginalisent et adhèrent aux cellules endothéliales. Cette adhérence résulte de l'interaction entre les sélectines de la surface des cellules endothéliales et certains polysaccharides de la surface des polynucléaires. Cette adhérence est faible, laissant les polynucléaires rouler à la surface de l'endothélium. L'adhérence devient ensuite forte et étroite, résultat de la réaction entre les récepteurs des cellules endothéliales VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 et les intégrines présentes à la surface des polynucléaires (Dorward *et al.*, 2012; Headland et Norling, 2015).

La deuxième vague cellulaire est constituée de monocytes qui gagnent le foyer inflammatoire attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles où ils se transforment en macrophages (**Figure 3**). Ces dernières assurent le nettoyage du foyer inflammatoire en cas d'inflammation aiguë et participent à la poursuite du processus inflammatoire en cas d'inflammation chronique par la production de nombreux médiateurs inflammatoires (Iwelawa *et al.*, 2007).



**Figure 3.** Migration de monocyte vers le foyer inflammatoire (Prin *et al.*, 2009).

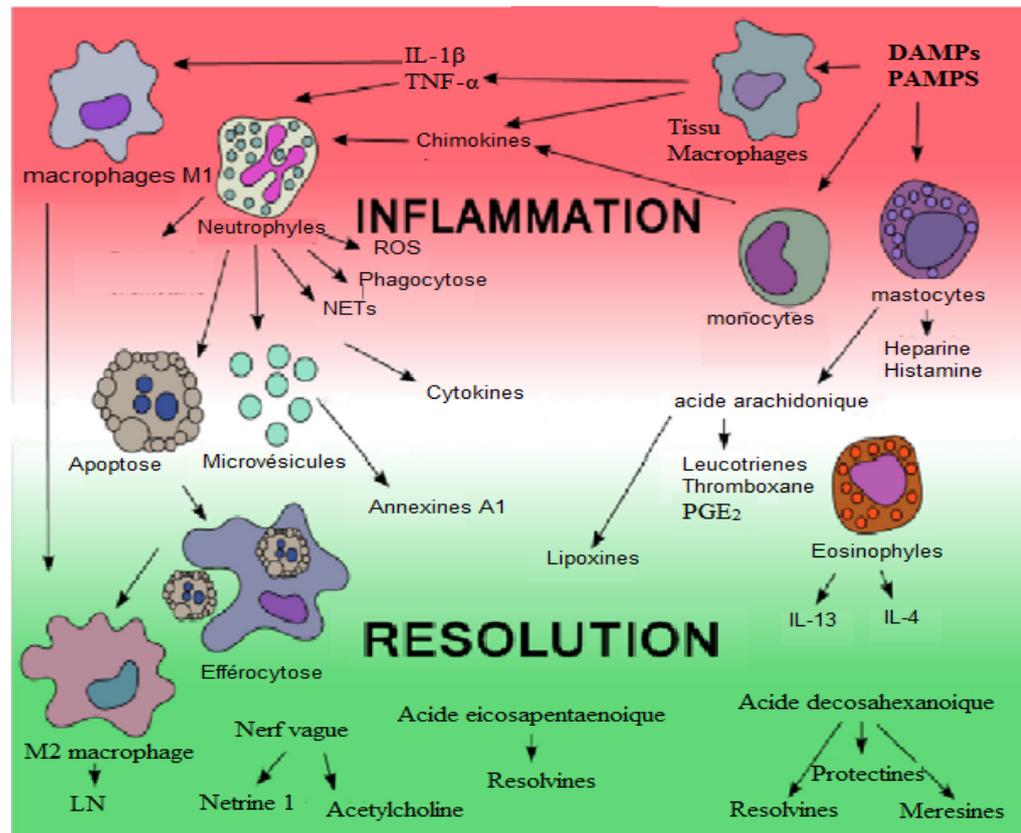
### I.1.3. Phase de résolution

Certains lipides, telles que les lipoxines, les protectines et les résolvines jouent un rôle majeur dans la promotion de la résolution du processus inflammatoire (**Figure 4**) et de la réparation tissulaire (Serhan et Savill, 2005; Serhan, 2007). Les lipoxines, sécrétées par les macrophages bloquent l'influx des neutrophiles, facilitent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et permettent 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 parasympathique joue également un rôle important dans l'arrêt de l'inflammation, en induisant l'activation des macrophages via la libération de l'acétyl choline (Tracey, 2002). Cette action pourrait être liée à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 et IL-8) et l'induction de l'IL-10 qui est 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, tandis que les produits de dégradation et les débris cellulaires sont phagocytés par les

macrophages. La réparation de l'endothélium est assurée par les cellules endothéliales. Les fibrocytes puis les fibroblastes permettent la reconstruction des tissus en produisant les protéines de la matrice intercellulaire comme le collagène, la fibronectine et la laminine. Le système d'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire va s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).



**Figure 4.** Processus de résolution et de réparation tissulaire (Headland et Norling, 2015).

La guérison d'une plaie implique la multiplication cellulaire, la migration cellulaire active et la production de la matrice extracellulaire (Lambole et Upendra, 2012). La durée de la cicatrisation et de la réparation d'une plaie dépend de la taille et de la profondeur de la lésion (Krishna et Upendra, 2012). Dans ce processus complexe, plusieurs cellules interagissent tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes (Lewis *et al.*, 2011).

La cicatrisation s'effectue en trois phases principales:

- La phase inflammatoire s'accompagne d'une vasoconstriction qui favorise la libération des médiateurs inflammatoires.
- La phase proliférative caractérisée par la formation du tissu de granulation principalement par les fibroblastes et l'angiogenèse.

- La phase de remodelage caractérisée par la reformulation et l'amélioration des composants de la fibre de collagène qui augmente la résistance à la traction (Stevens et Lowe, 2009).

Bien que la cicatrisation de la plaie soit un processus biologique naturel, un traitement est recommandé pour augmenter le taux de guérison et réduire la croissance microbienne autour de la zone blessée.

## I.2. Inflammation chronique

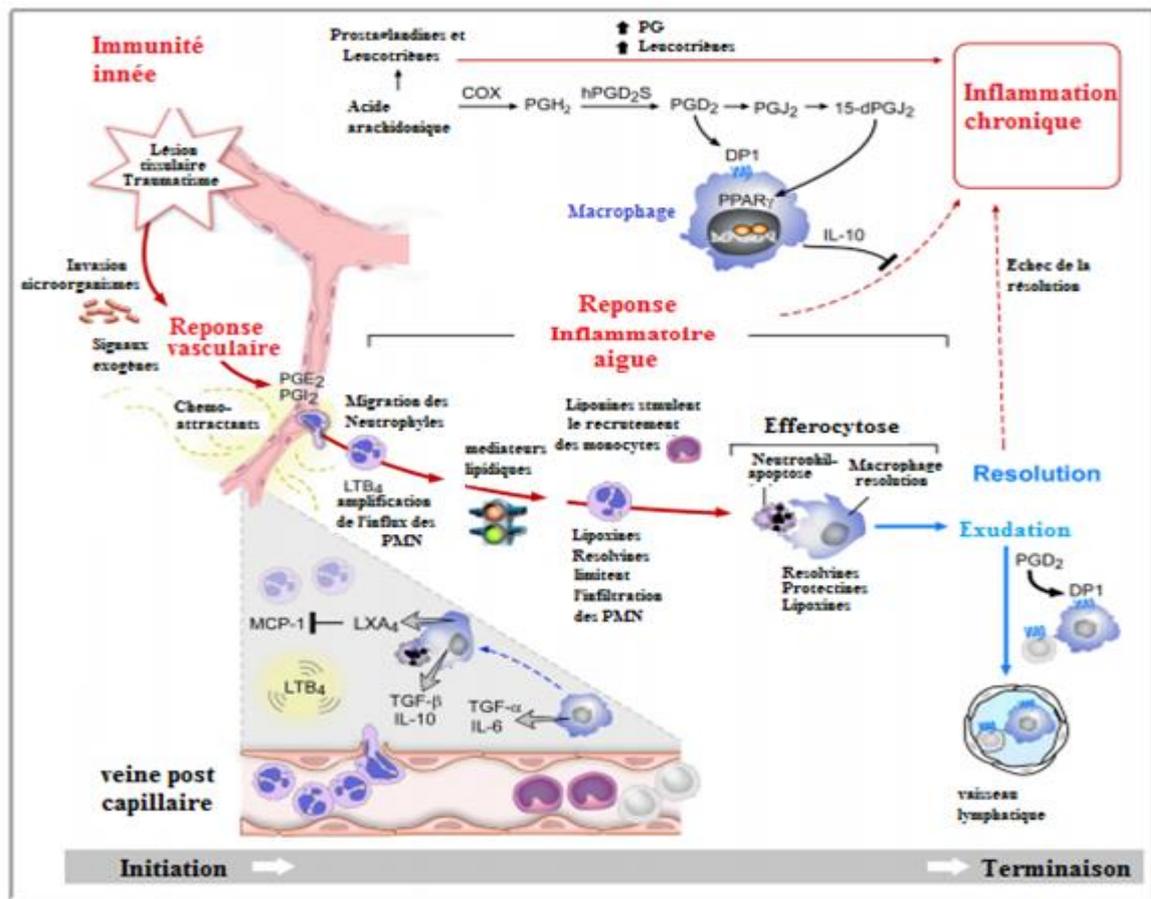
L'inflammation chronique est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette inflammation. L'inflammation chronique conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentative de réparation sont également présents (Lee et Surh, 2012; Howcroft *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014).

## I.3. Médiateurs de l'inflammation

Le déclenchement de l'inflammation fait appel à des facteurs synthétisés localement ou au niveau systémique dont certains sont des pro-inflammatoires et d'autres des 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. Parmi ces médiateurs on peut parler de:

\* **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 (leucotriènes, thromboxanes et prostaglandines)**, des dérivés de l'acide arachidonique qui jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire (**Figure 5**). 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. Les thromboxanes stimulent les mécanismes de l'agrégation plaquettaire (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).



**Figure 5.** Rôle des médiateurs lipidiques dans la résolution ou la défaillance de l'inflammation (Buckley *et al.*, 2014).

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

\* **Cytokines et chimiokines**, produits par de nombreuses cellules telles que les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules épithéliales. Elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et le TNF $\alpha$ ) ou anti-inflammatoires (IL-10) (Noack *et al.*, 2018). D'autres cytokines comme IL-2, IL-4, IL-3, IFN- $\gamma$  et les CSF (colony stimulating factor) interviennent dans les phénomènes inflammatoires (Weill *et al.*, 2003). Les cytokines sont responsables de la médiation de l'immunité innée, de la régulation, l'activation, la croissance, de la différenciation des lymphocytes, ainsi que de la stimulation de l'hématopoïèse (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). L'IL-1, TNF- $\alpha$  et IL-6 jouent un rôle prépondérant dans la régulation des cellules phagocytaires. Elles interviennent en particulier dans les phénomènes d'adhérence à l'endothélium, de déplacement orienté vers le site de l'agression, de phagocytose et d'activation des systèmes lytiques. Les chimiokines sont

des petits peptides apparentés aux cytokines qui ont toutes la propriété d'être chimiotactiques pour les leucocytes. Elles permettent le recrutement des monocytes et des polynucléaires du sang vers le site de l'infection. Certaines chimiokines participent aussi au développement des lymphocytes et à l'angiogenèse (Weill *et al.*, 2003).

Les cytokines pro-inflammatoires sont largement impliquées dans des pathologies et agissent à différents niveaux : local en amplifiant la réaction inflammatoire par une influence sur la néo-vascularisation, l'hyperprolifération cellulaire et la dégradation tissulaire, et systémique, en augmentant les risques cardiovasculaires ou même le risque de dépression. Les réseaux de régulation qui gouvernent l'expression des cytokines peuvent présenter des défauts conduisant à des immunodéficiences qui peuvent aboutir à plusieurs pathologies (Judy *et al.*, 2014).

Une surproduction d'IL-1 caractérise plusieurs désordres auto-inflammatoires génétiques, tels que la fièvre familiale méditerranéenne ou les syndromes périodiques associés à la cryopyrine. À concentration élevée, l'IL-1 est associée aux pathogénèses inflammatoires, comme les MICI, l'inflammation articulaire et la dégradation cartilagineuse mais également dans la pathogenèse des maladies cardiaques. L'IL-1 favorise également l'angiogenèse tumorale et les métastases (Noack *et al.*, 2018).

Le TNF- $\alpha$  joue aussi un rôle dans les maladies cardiovasculaires, il induit l'apoptose des cardiomyocytes. Au cours de la tumorigenèse, l'activité du TNF- $\alpha$  peut devenir protumorale au sein d'un environnement inflammatoire particulier. Le TNF- $\alpha$  également été impliqué dans la réponse nociceptive qui est le processus physiologique soulignant la sensation de douleur. Chez les patients arthritiques, le blocage du TNF réduit l'augmentation du nociception avant l'induction des effets anti-inflammatoires.

IFN- $\gamma$  joue un rôle dans les maladies autoimmunes (Hooks *et al.*, 1988 ; Lees, 2014) et les inflammations allergiques (Teixiera *et al.*, 2005) et il est impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives (Connor *et al.*, 2008 ; Too *et al.*, 2014). Les taux d'IL-8 sont augmentés au cours des lésions rhumatoïdes (Kim *et al.*, 2004).

\* **Platelet Activating Factor (PAF)**, qui stimule l'agrégation plaquettaire, augmente la perméabilité vasculaire et active les leucocytes (Henrotin *et al.*, 2001).

\* **Kinines**, des polypeptides plasmatiques phlogogènes, dont la plus active est la bradykinine. Ils entraînent une activation de la phospholipase A2, une irritation des fibres sensorielles au niveau lésionnel. La bradykinine favorise la vasoconstriction (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, l'activation du complément permet la production des anaphylatoxines. Le système de complément induit l'opsonisation qui facilite la phagocytose et la lyse des micro-organismes pathogènes et l'activation des cellules inflammatoires. Les fragments C3a et C5a augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent plusieurs mécanismes comme le chimiotactisme des neutrophiles, la production de leucotriène, la dégranulation des mastocytes, la libération d'histamine et la formation des ROS (Henrotin *et al.*, 2001).

\* **Système de 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).

\* **Neuropeptides, représentés principalement par** la substance P. Plusieurs types de cellules possèdent des récepteurs membranaires pour la substance P à savoir les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les fibroblastes. La substance P augmente la perméabilité vasculaire, stimule le chimiotactisme des neutrophiles, favorise la production de prostaglandines, induit la dégranulation des mastocytes et la libération de l'histamine. Elle stimule aussi l'angiogenèse et la prolifération des kiritinocytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Tanaka *et al.*, 1988 ; Ziche *et al.*, 1982 ; Henrotin *et al.*, 2001).

#### **I.4. Pathologies inflammatoires**

L'inflammation conduit au développement de plusieurs maladies humaines telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer, et les maladies intestinales inflammatoires (Serhan *et al.*, 2007; Leitch *et al.*, 2008; Khor *et al.*, 2011; Maskrey *et al.*, 2011; Wynn, 2011; Lee *et al.*, 2012). Les cytokines pro-inflammatoires sont largement impliquées dans ces pathologies en amplifiant la réaction inflammatoire via la néo-vascularisation, l'hyper-prolifération cellulaire et la dégradation tissulaire (Noack *et al.*, 2018). La production de cytokines et de chimiokines (**Tableau 1**) favorise le maintien des cellules inflammatoires sur le site inflammatoire dans différents maladies chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies chroniques de l'intestin (Liby, 2007; Lowe *et al.*, 2011).

**Tableau 1.** Cytokines impliquées dans différentes pathologies (Iwelawa *et al.*, 2007)

| Maladies                   | Cytokines exprimées   |
|----------------------------|---|
| AIDS                       | TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  |
| Infection aigue            | IL-6  |
| Infections parasitaires    | TNF- $\alpha$   |
| Asthme                     | l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13  |
| Cancer                     | IL-6  |
| Maladies cardiovasculaires | TNF- $\alpha$ , IL-6  |
| Atherosclerose             | IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6   |
| Veillelissement            | IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6  |
| Fièvre                     | IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , IL-6   |
| Maladie de Corohn's        | IL-1 et IL-12   |
| Ulcer peptique             | IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8  |
| Alzeihmer                  | l'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6   |
| Sclerose                   | TNF- $\alpha$   |
| Diabetes                   | Les médiateurs de Th-1 et Th-2  |
| Douleur                    | TNF- $\alpha$ , IL-1 et $\beta$ et IL-6   |
| depression                 | TNF- $\alpha$ , IL-1, $\beta$ et IL-6, IL-1ra, IFN- $\gamma$ , IL-6                             |
| Schizophrenia              | TNF- $\alpha$ , IL-1 et $\beta$ et IL-6   |
| Maladies de sommeil        | TNF- $\alpha$ , IL-6  |
| Axion                      | TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1ra, IFN- $\gamma$ , IL-6, et diminution des taux de l'IL-4 et l'IL-10 |
| Polyarthrite rumatoide     | TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, GM-CSF et IL-8  |

## I.5. Traitement de l'inflammation

Il existe de nombreux anti-inflammatoires de synthèse et des antibiotiques sont disponibles, mais ils présentent plusieurs effets indésirables. Cependant, les médicaments à base de substances naturelles sont moins toxiques, et les microorganismes, sont moins résistants à ces substances (Farahpour et Habibi, 2012).

### I.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

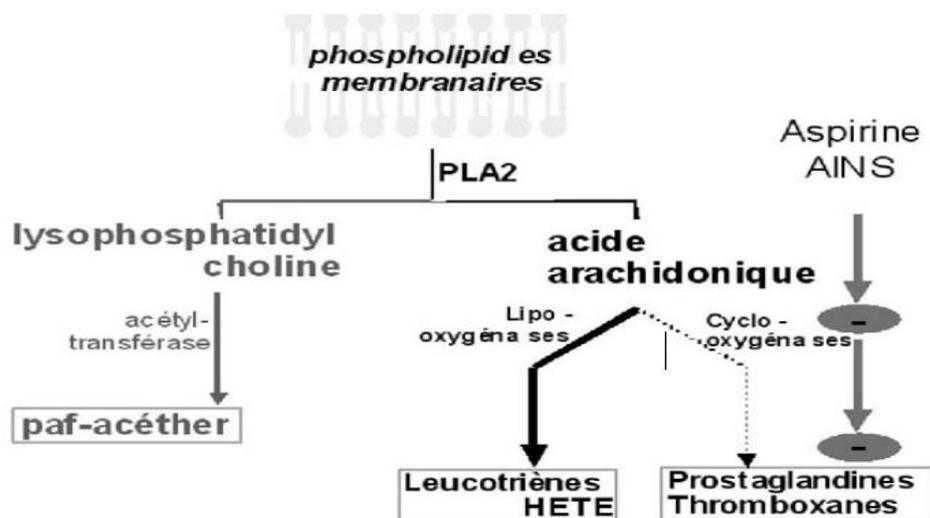
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Ces médicaments ont un effet antalgique et antipyrétique associé à un effet anti-inflammatoire. Les effets des AINS résultent principalement de l'inhibition de la cyclooxygénase et ainsi de la synthèse des prostaglandines. Cette inhibition peut être irréversible, avec les AINS salicylés, ou non avec les autres AINS (Tricot et Jouzeau, 2014).

Les bons effets des AINS 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 leurs effets indésirables s'explique par leur mécanisme d'action. En effet, les AINS inhibent compétitivement la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) par la cyclooxygénase (**Figure 6**). Cette inhibition rend impossible la transformation de PGH<sub>2</sub> en prostanoides par les isomérases spécifiques (Blain *et al.*, 2000).

La cyclo-oxygénase existe sous deux formes: la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et la cyclo-oxygénase 1 (COX-1). La COX2 est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF $\alpha$  et l'interleukine 1. Elle est impliquée dans l'inflammation et dans quelques processus associés à la prolifération cellulaire. Au contraire, la COX1 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 COX2 sélectifs (Tricot et Jouzeau, 2014).

### I.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol) ou héli-synthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et immuno-suppressives (Dangoumau, 2006).



**Figure 6.** Site d'inhibition des cyclo-oxygénases par l'aspirine et les AINS (Demoly, 2007).

Les AIS empêchent l'activation de la phospholipase A2, en bloquant à la fois la voie des prostaglandines et celles des leucotriènes (Mallem et Gogny, 2014).

Les glucocorticoïdes agissent à de multiples niveaux sur toutes les phases de l'inflammation qu'elle soit aiguë ou chronique. En outre, ils diminuent fortement la migration des polynucléaires et des monocytes/macrophages vers le site inflammatoire ainsi que la production des médiateurs inflammatoires, comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines et les ions superoxydes (Kessel *et al.*, 2014). Ils sont également responsables de la diminution de la perméabilité capillaire et de l'augmentation de l'activité des ostéoclastes, ce qui conduit à la fragilisation des os (Henzen, 2003).

Les glucocorticoïdes représentent le traitement le plus efficace des maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Kessel *et al.*, 2014). Ils ont néanmoins l'inconvénient de réduire la défense de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (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 ; Strehl *et al.*, 2011).

### **I.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale**

Grace à leurs diverses activités biologiques bénéfiques, les plantes médicinales sont largement utilisées par l'homme. Ces activités sont dues à leur richesse en métabolites secondaires bioactifs, tels que les polyphénols, les stérols, les alcaloïdes, les coumarines les terpènes...etc. L'activité anti-inflammatoire des composés phénoliques a été démontrée dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Contrairement aux composés pharmacologiques qui agissent spécifiquement via un récepteur ou une voie de signalisation, les polyphénols ont des modes d'action multi-cibles. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase (Yoon et Baek, 2005), les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires (Capiralla *et al.*, 2012), 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 (Zeinalia *et al.*, 2017). La diversité de ces mécanismes d'action potentiels explique le large spectre d'activités biologiques (antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-angiogéniques) de ces substances observées *in vivo*.

Beaucoup d'extraits de plantes riches en flavonoïdes possèdent des activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes à la fois (Selloum *et al.*, 2003 ; Baheti *et al.*, 2011 ; Bouriche *et al.*, 2016, Meziti *et al.*, 20017). Des travaux menés *in vitro* ont montré que les flavonoïdes (Lutéoline, apigénine, kampferol, quercétine, myricétine, naringénine, catéchine, phlorétine, buteine, pelargonidine) sont de puissants inhibiteurs de la production de TNF- $\alpha$  par des macrophages stimulés par le LPS (Muzamal *et al.*, 2013). Récemment, Zeinalia et ses collaborateurs (2017) ont montré que la chryisine est un puissant anti-inflammatoire qui agit sur NF-kB qui contrôle l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), les enzymes inductibles COX2 et iNOS et les molécules d'adhésion ICAM, VCAM et E-sélectine.

Les stéroïdes possèdent des activités anti-inflammatoires sur plusieurs modèles expérimentaux. La fraction aleorésine de *Curcuma amada* possède un effet anti-inflammatoire significatif ainsi qu'une activité anti-arthrétique (Mujumdar *et al.*, 2000). Le  $\beta$ -sitostérol isolé de *Dichrostachys cinera* possède une activité anti-inflammatoire dans le modèle de l'œdème de la patte et le granulome de pellete en coton (Jayakumari *et al.*, 2008).

Les terpénoïdes ont montré une activité anti-inflammatoire sur plusieurs modèles d'inflammation (Baheti *et al.*, 2011). En effet, l'étude de Manez *et al.* (1999) a montré que l'oléane de type triterpènes saponine, Zanthosaponines et le cyclitol pinitol isolés de l'extrait méthanolique des racines de *Zanha Africana* inhibent la phospholipase A2. L'étude de Schweizer *et al.* (2000) a montré que le pentacyclique triterpènes de *Boswellia resin*, inhibe la biosynthèse des leucotriènes et la 5-lipoxygénase.

## II. Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes antioxydants. Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines) (**Figure 7**), conduisant à l'apparition des diverses maladies (Pisoschi et Pop, 2015; Smaga *et al.*, 2015).

### II.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) incluent les radicaux libres possédant au moins un électron libre sur la couche externe (radical hydroxyl OH $\cdot$ , superoxyde O $_2\cdot$ , le radical peroxy ROO $\cdot$ ) et les dérivés non radicalaires, dont la réactivité est très élevée comme le

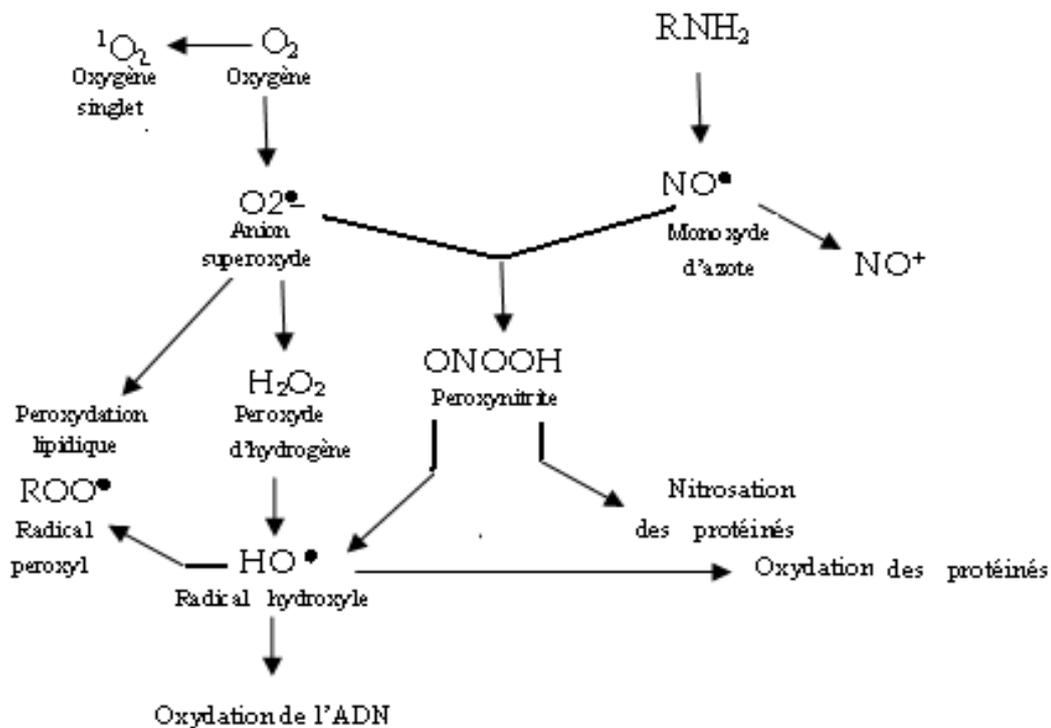
peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'oxygène singlet  $^1O_2$  et l'acide hypochloreux  $HOCl$  (Cuzzocrea *et al.*, 2001 ; Chu *et al.*, 2010).

A cause de leur hyperréactivité, les radicaux libres ont une demi-vie très courte (quelques nanosecondes à quelques millisecondes). Cette réactivité dépend des éléments en présence, si un radical rencontre un autre radical, le produit sera non radicalaire ( $A^{\bullet}+B^{\bullet}\rightarrow AB$ ). Si un radical rencontre un non radical, un nouveau radical sera formé ( $A^{\bullet}+B\rightarrow A+B^{\bullet}$ ) 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).

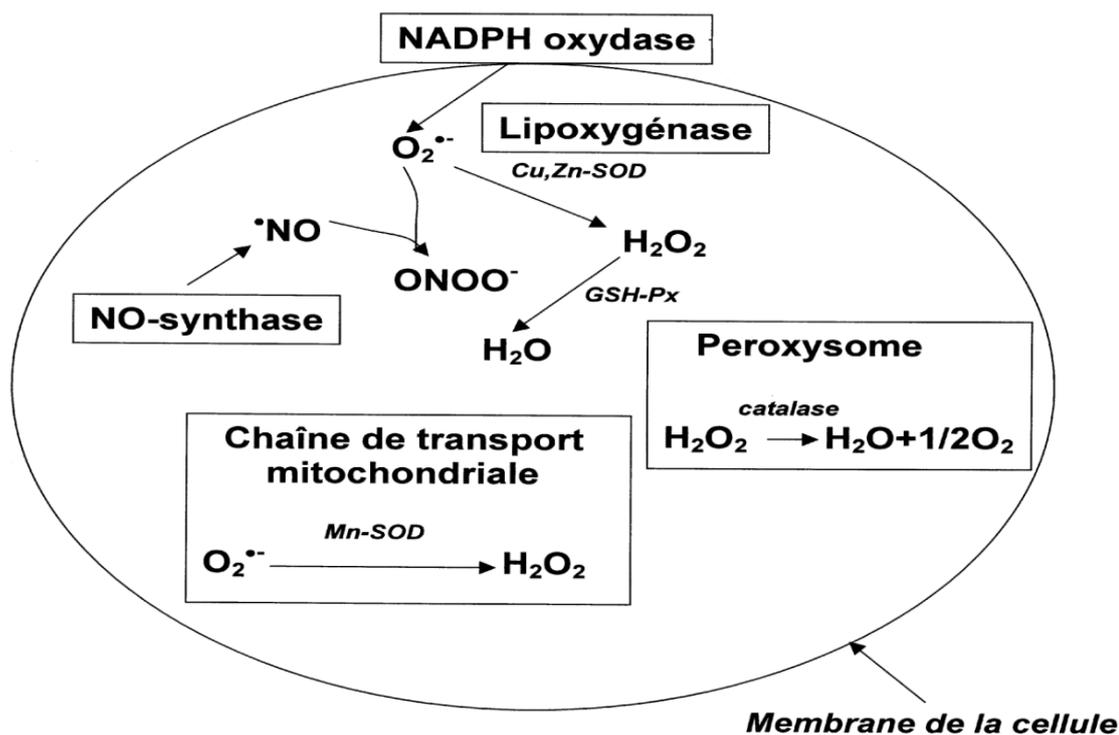
Les espèces réactives de nitrogène (ERN) sont dérivés de l'oxyde nitrique ou du monoxyde d'azote comme le radical monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), l'anion peroxyntrite ( $ONOO^-$ ) et le radical dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ) (Finaud *et al.*, 2006)..

## II.2. 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 est plus importante que celle d'origine exogène (**Figure 8**).



**Figure 7.** Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote intervenant dans le phénomène du stress oxydant (Favier, 1997).



**Figure 8.** Sources endogènes des espèces réactives oxygénées (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002).

### II.2.1. Sources endogènes

La chaîne respiratoire mitochondriale est responsable de la production de 90% des ROS dans la cellule (Balaban *et al.*, 2005). La production d' $O_2^{\bullet-}$  résulte de la fuite d'électrons lors de leur transfert par les complexes de la chaîne respiratoire (Zhang et Gutterman, 2007).

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 du  $H_2O_2$ . L' $O_2^{\bullet-}$  produit au cours de l'ischémie-reperfusion est rapidement converti en  $ONOO^-$  par son interaction avec le NO (Rahman *et al.*, 2006).

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' $^1O_2$  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 jouent le rôle de régulateurs dans les cascades de signalisation intracellulaire (Bae *et al.*, 1997).

Les lipoxygénases et les cyclooxygénases représentent une autre importante source de ROS dans les parois vasculaires. La 5-LO catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés

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- $1\beta$  (Droge, 2002).

### II.2.2. Sources exogènes

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

Certains métaux (chrome, cuivre, fer et 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 ERN tels que le  $NO^\bullet$  et le  $NO^2$  (Koren, 1995). Ces oxydants participent à la genèse d'autres radicaux libres car ils sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. Le  $NO^\bullet$  et le  $NO^2$  peuvent aussi réagir avec l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour former de puissants oxydants comme  $ONOO^\bullet$  et le radical  $OH^\bullet$  (Pincemail *et al.*, 1998 ; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2001).

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.3. Rôles physiologiques des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène présentent un paradoxe dans leurs fonctions biologiques. D'une part, ils préviennent les maladies en aidant le système immunitaire par la médiation de la signalisation cellulaire et en jouant un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager des macromolécules importantes dans les cellules.

### II.3.1. Défense contre les infections

Les phagocytes activés produisent des ROS en quantités suffisantes pour tuer les bactéries. Dans ce système, les ROS sont produits par le complexe NADPH qui transforme le  $O_2$  en  $O_2^{\bullet-}$  (Kardeh *et al.*, 2014). Le  $O_2^{\bullet-}$  est ensuite réduit dans le phagosome par la SOD en  $H_2O_2$  qui peut être par la suite converti en HOCl par la MPO (Lloyd *et al.*, 2013). Le HOCl peut alors former spontanément le  $OH^\bullet$ . Ces deux molécules hautement réactives sont très toxiques pour les bactéries ingérées par les phagocytes. Le HOCl est également un élément important de la défense antimicrobienne par destruction de l'ancrage de l'ADN à la membrane bactérienne, ce qui entraîne l'arrêt de la réplication de l'ADN des bactéries (Nordberg et Arnér, 2001).

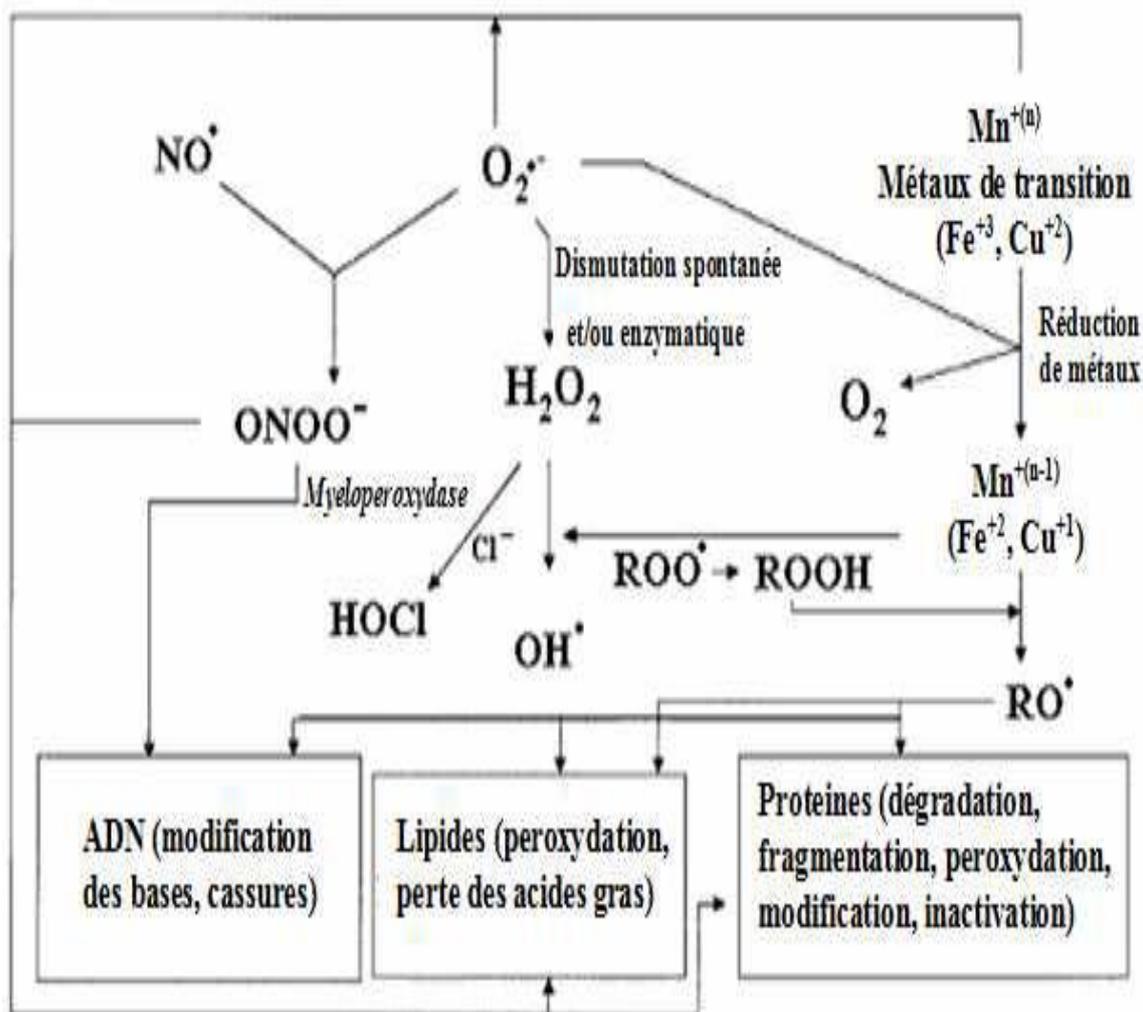
### II.3.2. Transduction du signal et régulation de la prolifération cellulaire

La production contrôlée des ROS est essentielle pour l'activité des voies de transduction du signal. Une large classe de molécules de transduction du signal sur lesquelles les ROS influencent leur fonction est les MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Hurd *et al.*, 2012). Les MAPK sont composées de trois sous-familles: les ERK (extracellular signal-regulated kinases), les JNK (kinases c-Jun N-terminal) et les kinases p38 (Martindale et Holbrook, 2002 ; Droge, 2002). Les ERK coordonnent le signal grâce à des facteurs de croissance tels qu'EGF (epidermal growth factor). Le récepteur de l'EGF (EGFR) est activé par les ROS. L'activation de l'EGFR provoque l'autophosphorylation de ce récepteur et l'activation des kinases MAPK (MAPKK) et donc l'activation des ERK. L'activation des ERK en réponse aux ROS favorise généralement la régulation de la prolifération cellulaire (Holbrook et Ikeyama, 2002; Li et Holbrook, 2003). Dans des conditions normales d'oxydo-réduction de la thiorédoxine (Trx) se lie à l'ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) et l'inhibe. Les ROS provoquent la dissociation du complexe Trx-ASK1, conduisant ainsi à l'activation des deux autres familles de MAPK (JNK et p38) par ASK1 (Martindale et Holbrook, 2002). L'activation de ces kinases implique de multiples MAPKK ainsi que l'interaction des protéines régulatrices de la prolifération conduisant à l'apoptose ou la nécrose (Kardeh *et al.*, 2014). Ces processus ont également des rôles essentiels dans l'élimination des cellules transformées et la suppression des tumeurs (Seifried *et al.*, 2007).

A faible concentration, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active la signalisation et pourrait être impliqué dans des réponses physiologiques comme celle du cycle de Krebs, la croissance, la dépolarisation membranaire et la régulation du calcium (Sayre *et al.*, 2005).

### II.4. Oxydation des macromolécules

Les lipides, les protéines et les acides nucléiques représentent les principales cibles des espèces réactives de l'oxygène (**Figure 9**).



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

#### II.4.1. Peroxydation lipidique

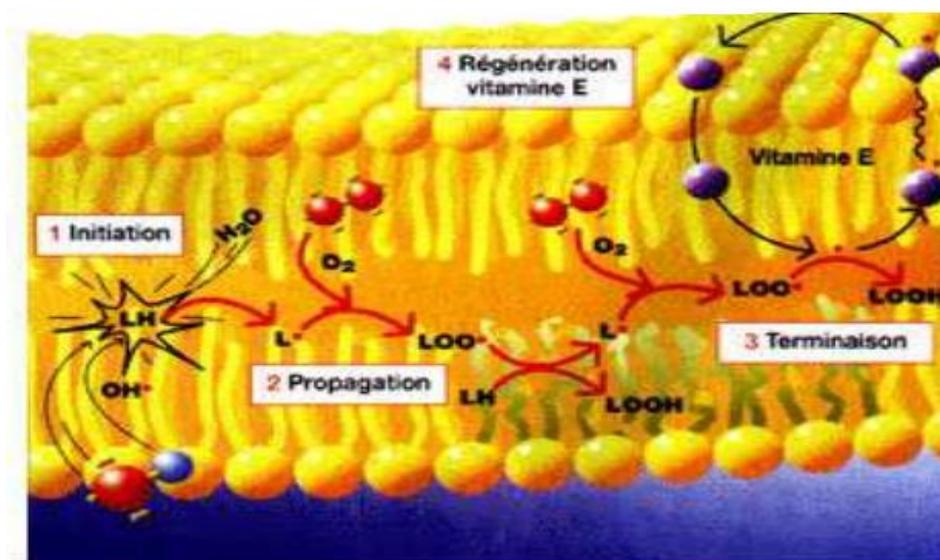
En raison de leur haut degré d'insaturation, les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation. Ce processus induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004). La réaction incontrôlée des ROS avec les lipides membranaires conduit à une génération innombrable de radicaux libres produits dans une réaction en chaîne, qui provoque la détérioration des membranes (Kardeh *et al.*, 2014; Pisoschi et Pop, 2015).

Dans la phase d'initiation (**Figure 10**) de la réaction en chaîne de la peroxydation, un radical hydroxyle réagit avec une chaîne d'acide gras insaturé (LH) et produit un radical d'acide gras et une molécule d'eau. Le radical d'acide gras n'est pas stable, dans la phase de propagation il a tendance à réagir avec l' $\text{O}_2$  pour produire un radical peroxyde lipidique ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Cette molécule générée réagit ensuite avec un autre acide gras insaturé et produit un

autre radical d'acide gras et un peroxyde lipidique (LOOH) (Kardeh *et al.*, 2014). Ce dernier est très réactif, il fournit une grande variété de produits actifs qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN.

Les réactions de peroxydation donnent des produits spécifiques utilisés comme indicateurs de la peroxydation tels que le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4- HNE) (Valko *et al.*, 2006).

La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la réaction en chaîne de peroxydation, c'est la phase de terminaison (Daum-Badouard, 2006).



**Figure 10.** Réaction de la peroxydation lipidique (Daum-Badouard, 2006).

#### II.4.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation peut rompre les liaisons peptidiques modifiant ainsi la chaîne protéique. Elle provoque des modifications par addition de produits issus de la peroxydation. Le dommage des protéines peut se produire par oxydation du thiol, une carbonylation, une fragmentation ou un mauvais repliement et dépliement, ce qui pourrait conduire à la perte de l'activité de la protéine (Pisoschi et Pop, 2015). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales et la formation des amas anormaux dans ou autour des cellules (Goto et Radak, 2013). Les principaux produits de l'oxydation des protéines sont les carbonyles qui sont utilisés comme marqueurs du stress oxydant.

Tous les acides aminés sont sensibles à l'oxydation, en particulier, la cystéine et la méthionine sont facilement oxydables (Raedschelders *et al.*, 2012; Pisoschi et Pop, 2015). L'oxydation de la lysine, la proline, l'arginine et la thréonine donne également lieu à des marqueurs de dérivés carbonylés (Pisoschi et Pop, 2015). L'oxydation de la tyrosine par les radicaux OH• produit la dityrosine, la réaction avec des ERN forme la 3-nitrotyrosine, alors que la réaction avec le HOCl donne la 3-chlorotyrosine (Raedschelders *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013).

L'oxydation des protéines est impliquée dans plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la dystrophie musculaire, l'ischémie-reperfusion et le vieillissement (Favier, 2003, Goto et Sadak, 2013; Bordt et Polster, 2014; Pisoschi et Pop, 2015; Moniczewski *et al.*, 2015).

#### **II.4.3. Oxydation de l'ADN**

Les ROS entraînent des dommages à l'ADN et conduisent à la mort cellulaire et au vieillissement (Saito *et al.*, 2015). Une abstraction d'hydrogène de l'ADN par le OH• conduit à l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques, ces actions représentent les altérations les plus communes de l'ADN nucléaire et mitochondrial attaqués par les ROS (Raedschelders *et al.*, 2012; Kardeh *et al.*, 2014). Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8- hydroxy-guanine (8-OHG). Ce dernier produit est considéré comme un marqueur de lésions nucléiques et de carcinogénèse (Sugamura *et al.*, 2011; Pisoschi et Pop, 2015). Comme pour les autres composés cellulaires, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> échappe aux enzymes de régulation, il peut rejoindre le noyau de la cellule et réagir avec les ions Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>++</sup> associés à la chromatine générant ainsi le radical hydroxyle *in situ*, qui attaque l'ADN (Kruidenier et Verspaget, 2002).

#### **II.4.4. Oxydation des glucides**

Le glucose et les protéoglycanes du cartilage sont les cibles préférés des ROS. L'oxydation du glucose est directe et donne des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine pour aboutir à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG), soit par la formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine pour donner une protéine glyquée susceptible d'être attaquée par des ROS pour former des PFG. Ces derniers en présence de métaux de transition favorisent la libération

d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (Halliwell et Gutteridge, 1999).

## **II. 5. Maladies liées au stress oxydatif**

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (**Figure 11**) telles que le cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, vieillissement accéléré. Il est un des facteurs de genèse de maladies plurifactorielles telles que la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 1997).

## **II.6. 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 les dommages oxydatifs.

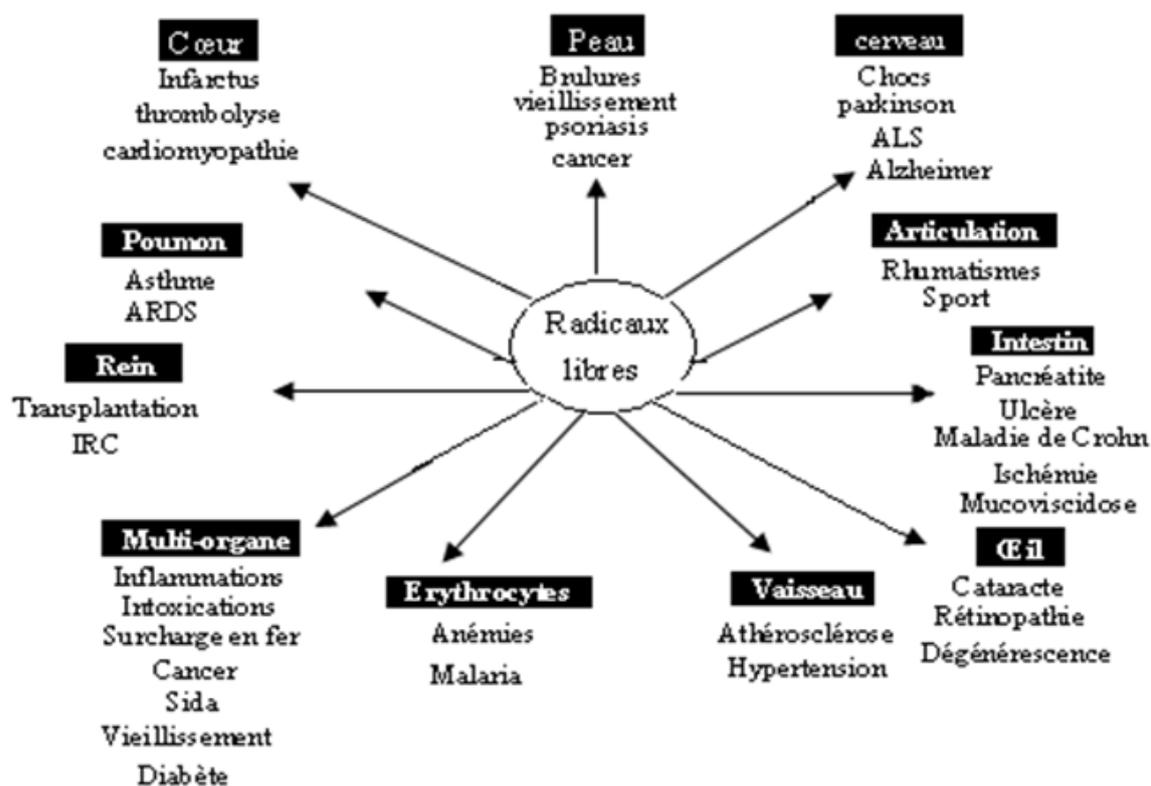
### **II. 6.1. Antioxydants endogènes**

#### **II. 6.1.1. Enzymes antioxydantes**

Le super oxyde dismutase (SOD) décompose le superoxyde en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moins toxiques. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sera à son tour transformé par la catalase en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O, ou en H<sub>2</sub>O 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 antioxydantes participent à la régulation du stress oxydant (Sayre *et al.*, 2005).

#### **II. 6.1.2. Antioxydants 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-Cayuella, 1995).



**Figure 11.** Principales circonstances pathologiques accompagnant le stress oxydant. ARDS: Syndrome de détresse respiratoires aigue ; Sida : Syndrome d'immunodéficience acquise ; ALS : Sclérose latéral amyotrophique (Favier, 1997).

## 1. 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).

## 2. 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 dans les muscles en cas d'effort (Hellsten *et al.*, 2001), puis elle sera régénéré par la vitamine C (Vasconcelos *et al.*, 2007).

## II.6.2. Antioxydants exogènes

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).

### II.6.2.1. 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 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 catalases (Margaritis *et al.*, 2003; Lyn Patrick, 2006).

. 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 participe aux réactions de Fenton/Haber-Weiss (Sayre *et al.*, 2005).

La vitamine B<sub>6</sub> exerce un rôle antioxydant indirect en favorisant la synthèse de la cystéine à partir de la méthionine et ainsi renforcerait la production de GSH (Dalto et Matte, 2017).

### II.6.2.2. Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux qui regroupent plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes dans leur structure 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 certaines 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). Ils agissent de différentes façons soit par effet scavenger directe (Quinoes *et al.*, 2013) soit par chélation de métaux de transition empêchant ainsi la réaction de Fenton (Rodrigo *et al.*, 2011) soit par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production de ROS comme la xanthine oxydase (Halliwell, 1994; Jayasena *et al.*, 2013).

### **II.6.3. Autres antioxydants**

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. Infections bactériennes**

Les infections bactériennes surtout nosocomiales représentent un véritable problème de santé publique en raison de la fréquence et de la gravité de ces infections, de leurs conséquences en termes de morbidité, et de mortalité, mais aussi par leur poids considérable en termes de consommation de soins, d'examen et de journées d'hospitalisation. Les causes de ce phénomène sont multiples mais le déterminant majeur est l'utilisation excessive et/ou inappropriée des antibiotiques (Munita et arias, 2016). En effet, le rôle de l'exposition aux

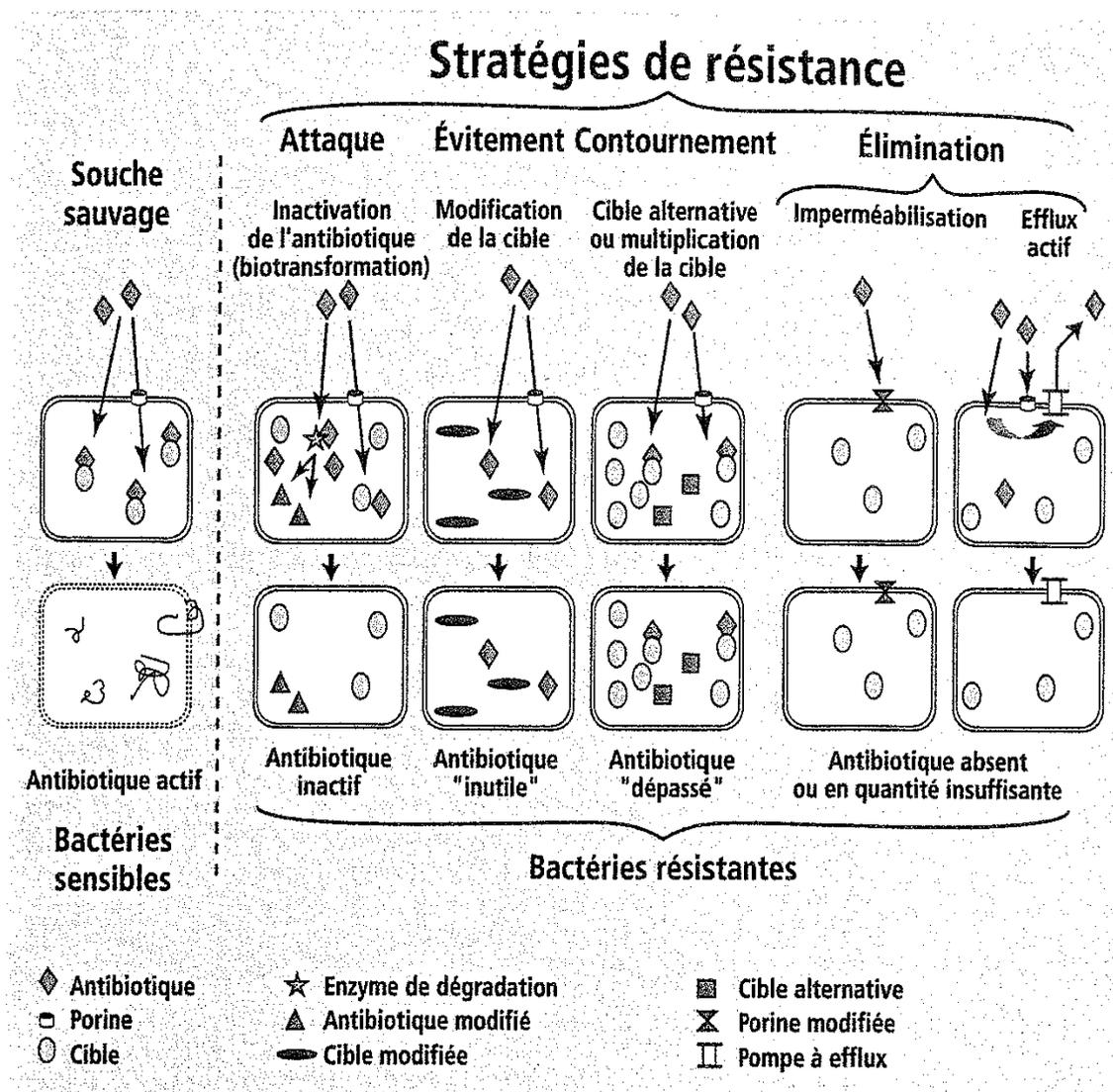
antibiotiques dans l'émergence de la multirésistance des bactéries est largement rapporté dans la littérature (Guillemot *et al.*, 2003; Serragui *et al.*, 2013).

### III.1. Résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème majeur compliquant le traitement des infections bactériennes surtout par la dissémination des souches multi-résistantes (Ventola, 2015). La progression de cette multirésistance risque de conduire à une augmentation de la létalité de certaines infections bactériennes et représente donc une menace réelle (Serragui *et al.*, 2013; Munita et Arias, 2016). Le phénomène de résistance est connu pour toutes les familles d'antibiotiques et concerne toutes les espèces bactériennes. Ces dernières peuvent développer des mécanismes différents selon leur sensibilité initiale et leur capacité à exprimer les diverses résistances d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles sources de médicaments (Vaubourdolle, 2013).

Pour acquérir une résistance, les bactéries mettent en jeu quatre types de stratégies (**Figure 12**) qui sont toutes sous contrôle génétique. Dans la première dite offensive, la bactérie produit une enzyme appelée  $\beta$ -lactamase capable d'inactiver l'antibiotique. La deuxième stratégie dite d'évitement consiste à une modification de la cible de l'antibiotique qui rend ce dernier inefficace. Dans la troisième dite de contournement 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 quatrième stratégie 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; Munita et Arias, 2016).

L'augmentation des résistances contre les principales classes d'antibiotiques combinée aux nombre limités d'agents en cours de développement a conduit à la découverte de nouvelles molécules susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication inter-cellulaire.



**Figure 12.** Principales stratégies mises par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques (Mesaros *et al.*, 2005).

## III.2. Traitement des infections bactériennes

### III.2.1. Antibiotiques

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). Certains antibiotiques sont naturels, ils sont synthétisés par des microorganismes tels que la vancomycine, la streptomycine, la pénicilline et la céphalosporine. 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).

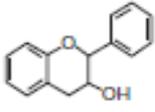
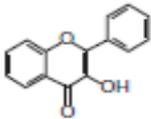
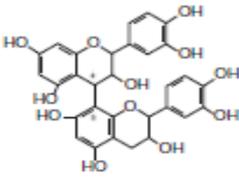
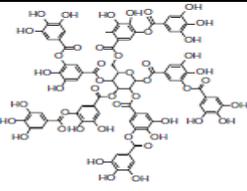
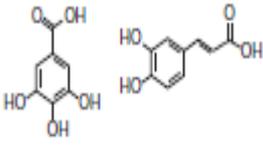
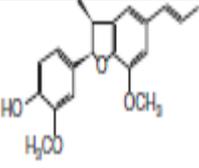
### III.2.2. Antimicrobiens naturels

Depuis quelques années, les recherches sont orientées vers la caractérisation de nouveaux agents antimicrobiens d'origine naturelle comme les peptides bactériens, les bactériophages et les molécules bioactives des plantes qui peuvent substituer les antibiotiques classiques ou agir d'une manière synergique avec ces derniers. Les plantes synthétisent différents métabolites secondaires dotés d'activité antibiotiques mais en général cette activité est plus faible que celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Kordali *et al.*, 2008). Parmi ces métabolites on trouve les polyphénols qui sont doués de diverses importantes activités antimicrobiennes, cette diversité est probablement reliée à leurs diversités structurales (**Tableau 2**). Les phénols sont généralement bactéricides vis-à-vis des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. 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'intercaler dans les phospholipides membranaires des bactéries 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 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).

L'activité des flavonoïdes 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). 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 flavonoïdes peuvent aussi interférer avec le métabolisme énergétique des bactéries. En effet, les retrochalcones et le flavanone lonchocarpole A inhibent fortement la consommation d'oxygène (Haraguchi *et al.*, 1998).

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).

**Tableau 2.** Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2011).

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

## IV. Plantes étudiées

Les plantes *Hertia cheirifolia* (*H. cheirifolia*), *Globularia alypum* (*G. alypum*) et *Cistus salvifolius* (*C. salvifolius*) ont été choisis selon trois critères: l'origine géographique commune (Djbel boutaleb, Setif), l'utilisation en médecine traditionnelle et les recherches non approfondies sur ces plantes.

### IV.1. *Hertia cheirifolia* L.

*Hertia cheirifolia* est une plante de la famille des Asteracées, endémique en Algérie jusqu'à l'atlas saharien et en Tunisie en zone aride sur les talus. Communément appelé Othonne ou Othonnopsis à feuilles de giroflée, Hémérocalle en français, barbary ragwort en anglais, timerzou en berbère (Quezel et Santa, 1963) et localement il est appelé Khertchoun. Cette plante (**Figure 13**) est un sous-arbrisseau vivace aromatique de 0.2 à 0.3 m de hauteur, ligneux à tiges dressés à fleurs, se reproduisant par des graines. Le feuillage est persistant, charnu vert de gris, glauque, feuilles alternes, spatulées, acuminées. Les fleurs sont réunies en capitule solitaires à bractées oblongue et pétiolées avec un bord entier, de couleur jaune citron (Quesel et Santa., 1963).

#### IV.1.1. Classification de *Hertia cheirifolia*

**Règne:** Plantae

**Sous-règne:** Tracheobionta

**Embranchement:** Magnoliophyta

**Superdivision:** Spermatophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Asteridae

**Ordre:** Asterales

**Famille:** Asteraceae

**Genre:** *Hertia*

**Espèce:** *Hertia cheirifolia* L. (Quezel et Santa, 1963).



**Figure 13.** Photographie de *Hertia cheirifolia* de djabel boutaleb

#### IV.1.2. Phytochimie

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *H. cheirifolia* contient une amalgame de métabolites secondaires dans les diverses parties de la plante. Massiot et ses collaborateurs, (1990) ont identifié 6 composés eremophilénolides dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de cette plante (10- $\beta$ -hydroxyeremophilénolide, 8- $\beta$ , 10- $\beta$ -dihydroxyeremophilénolide, 8- $\beta$ -méthoxy-10- $\beta$ -hydroxyeremophilénolide, 6- $\beta$ ,10- $\beta$  dihydroxy-8- $\beta$ -méthoxyeremophilénolide, 10- $\beta$ -angeloyloxy-6- $\beta$ , 10- $\beta$ -dihydroxy-8- $\beta$ -méthoxyeremophilénolide et 3- $\beta$ -angeloyloxy-10- $\beta$ -hydroxy-8- $\beta$ -méthoxyeremophilénolide). Aclinou *et al.* (1991) ont montré que *H. cheirifolia* renferme aussi des sesquiterpénolides et des stéroïdes et plusieurs groupes de molécules actives tels que les flavonoïdes. Les travaux de Ammar *et al.* (2009) ont abouti à la caractérisation d'un sesquiterpénolide (Bakkanolide) et de deux stéroïdes dans l'extrait chloroformique de cette plante (3 $\beta$ , 22E-Stigmasta-5, 22-diène-3-ol (Stigmasterol) et le stigmasterol 3  $\beta$ -glucoside. Attia *et al.* (2012) ont déterminé dans l'huile essentielle de *H. cheirifolia* plusieurs composés majoritaires, tels que le thymol (61%), le 2,6-Diméthoxy-phenol (12.83%), le Camphor (5.82%), le Terpinène-4-ol (5.48%) et le  $\alpha$ -Terpinéol (3.58%). Plus récemment, Majouli *et al.* (2016) ont rapporté la richesse de l'huile essentielle des feuilles et des fleurs fraîches en  $\alpha$ -pinène, valencène,  $\beta$ -caryophyllène, germacrène D, germacrène A,  $\alpha$ -terpinyl acetate et monoterpène hydrocarbures. L'extrait d'acetate d'éthyl des racines contient l'acide cinnamique, l'acide férulique, rutine, myricétine, naringine, naringénine, quercétine, p-coumarique (Majouli *et al.*, 2017).

### IV.1.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques

*Hertia cheirifolia* est utilisée en médecine traditionnelle algérienne et tunisienne comme anti-inflammatoire et antispasmodique (Iserin, 2001; Ammar *et al.*, 2009). Les infusats des feuilles de cette plante bouillies sont utilisés pour traiter les crampes, les douleurs à l'estomac et de l'intestin ainsi que certaines maladies gastro-intestinales telles que la dyspepsie, la diarrhée et pour traiter certaines infections, (Iserin, 2001).

Les métabolites secondaires du *H. cheirifolia* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Il a été montré que l'extrait chloroformique de cette plante exerce une activité anti-spasmodique et anti-inflammatoire. Ces effets sont attribués aux sesquiterpenoides bakkenolides et certains stéroïdes (Ammar *et al.*, 2009). Les études portant sur des extraits alcooliques et aqueux de *H. cheirifolia* ont prouvé son pouvoir anti-oxydant qui est accordé à la présence de polyphénols (Bousselsela *et al.*, 2012; Majouli *et al.*, 2017). Une activité acaricide des huiles essentielles de cette plante contre les acariens phytophages, particulièrement l'acarien *Tetranychus urticae* qui cause des dégâts en agriculture ont été rapporté par Attia *et al.* (2012 ; 2015).

### IV.2. *Cistus salvifolius* L.

*Cistus salvifolius* (*C. salvifolius*) est une plante (**Figure 14**) vivace, qui appartient à la famille des Cistacées, communément appelé ciste a feuille de sauge, ciste mondré ou ciste femelle (Bock, 2014). Localement il est appelé lasase et cfeira (Guide de la flore Algérienne, 2009). La famille des Cistacées comprend plus de 200 espèces et environ dix genres. Les plantes de cette famille sont des arbustes, herbacés, poilus ou velus, pérennes ou annuels, peuvent atteindre 20 à 60 cm de haut. Les feuilles sont simples, souvent opposées et sont très attractifs pour la consommation animale (Damerdji, 2012). La racine de *C. salvifolius* est sans poils absorbants en général. Les fleurs hermaphrodites apparaissent entre le mois d'avril et juillet, ont une belle forme en coupe, leurs diamètre varie de 3 à 5 cm, elles sont blanches à fond jaune et ont 5 pétales

Les Cistes sont très abondantes dans les régions tempérées à subtropicales mais surtout présents autour du bassin méditerranéen (Qa'dan *et al.*, 2011; Gürbüz *et al.*, 2015). Cette espèce très commune dans le Tell Algérien (Guide de la flore Algérienne., 2009), préfère les versants rocheux, les prairies sèches, forêts claires et les broussailles, sols siliceux et rocaillieux, maigres, peu épais, filtrants et acides au soleil ou à mi- ombre, elle peut supporter des températures allant jusqu'à -5°C (Damerdji, 2012).



**Figure 14. Photographie de *Cistus salvifolius* de djabel boutaleb**

### **V.2.1 Classification de *Cistus salvifolius* L.**

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Tracheobionta ou Angiospermes

**Classe :** Magnoliopsida ou Dicotylédones

**Sous-classe :** Dilleniidae

**Ordre :** Malvales

**Famille :** Cistaceae

**Genre espèce :** *Cistus salvifolius* L. (Hywood, 1996; Damerджи, 2012)

### **V.2.2. Phytochimie**

Divers composés chimiques ont été isolés à partir des extraits de *C. salvifolius*. L'étude phytochimique réalisée par Gürbüz, (2015), sur des extraits de la partie aérienne et les racines de cette plante a révélé la présence de trois flavonoïdes aglycones (kaempférol, la quercétine, la myricétine), quatre flavonoïdes glycosides (kaempférol 3-O-β- (6-O-transp-coumaroyl)-glucopyranoside (Trans-tirilosid), la quercétine 3-O-α-arabinopyranoside (Guaijaverin), la quercétine 3-O-β-galactopyranoside, et la myricétine 3-O-β-galactopyranoside), deux glycosides de phenylbutanon, deux glycosides de phloroglucinol, deux glycosides stéroïdes, le sitosterol-3-O-(6"-O-butanoyl)-β-galactopyranoside et le guaijaverin (4-(4'-O-[6"-O-galloyl-β-galactopyranosyl]-3'-hydroxyphenyl)-butan-2-on,4-(3'-O-β-gluco-pyranosyl-4'-

hydroxy- phenyl)-butan-2-on, 1-O- $\beta$ -glucopyranosyl-3,5-dimethoxybenzene). Qa'dan et ses collaborateur, (2011), ont isolé deux pro-anthocyanidines oligomères epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4 $\beta$ →8)-epigallocatechin et Epigallocatechin -3-O-p-hydroxybenzoate-(4 $\beta$ →8)-epigallocatechin-3-O-gallate. La fraction de l'extrait aqueux de l'acétone de la plante a révélé la présence de: flavan-3-ols et prodelphinidines dimères (catéchine, gallocatéchine, épicatechine, l'épigallocatechine, l'épicatechine-3-O-gallate, épigallocatechine-3-O-gallate, l'épigallocatechine-3-Op-hydroxybenzoate) et un anthocianidins oligomères, protodelphinins, ellagitannins et le rhododendrin glucoside phénylpropanoïde (Betuloside).

### V.2.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques

Les racines et les parties aériennes de la ciste ont été utilisées depuis l'Antiquité dans la culture méditerranéenne pour leurs propriétés médicinales. Ils sont connus pour leurs vertus anti-diarrhéiques, antiacide, antispasmodique. Ils sont utilisés comme remèdes pour traiter de diverses maladies de la peau, l'ulcère gastroduodéal, le diabète sucré et en tant qu'agents anti-inflammatoires, surtout dans les inflammations urinaires, le rhumatisme et la traitement des hémorroïdes (Yeşilada *et al.*, 1995; Attaguile *et al.*, 2004; Oubenchicker *et al.*, 2014). En outre, *Cistus salvifolius* est utilisé dans l'aromatisation traditionnelle des produits laitiers fermentés et il est considéré comme une source alimentaire importante pour les bovins (Damerджи, 2012; Gürbüz *et al.*, 2015).

Les métabolites secondaires du *Cistus salvifolius* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. En effet, plusieurs phénols isolés de cette plante possèdent des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires (Toniolo et Nicoletti., 2014), antioxydantes (Sayah *et al.*, 2017), anti agrégante, modulante des fonctions des cellules immunitaires (Attaguile *et al.*, 2004) et cytotoxique contre des lignées cellulaires humaines de cancer (Toniolo et Nicoletti, 2014; Gürbüz *et al.*, 2015). Les huiles essentielles de *C. salvifolius* sont caractérisées par un pouvoir antioxydant et une activité inhibitrice du cholinestérase,  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase (Loizzo *et al.*, 2013; Sayah *et al.*, 2017). Elles Possèdent aussi une activité anti fongique et anti-microbienne, surtout vis-à-vis de *lesteria monocytogens* et les mycobactéries (Haouat *et al.*, 2013). D'autres propriétés antivirale, algicide, antifongique, anti protozoaire ont été rapporté (Oubenchiker *et al.*, 2014; Toniolo et Nicoletti., 2014; Gürbüz *et al.*, 2015).

### IV.3. *Globularia alypum* L.

*Globularia alypum* est une plante vivace, communément appelé Tasselgha ou ain larneb au Maghreb (Jouad *et al.*, 2002). D'autres noms (Chebra, Chelr'a, Zerga, zeriga, zoutna, alk, haselra, oulbarda) sont attribués à *Globularia alypum* (Chograni *et al.*, 2011).

C'est une plante très abondante dans le pourtour du bassin méditerranéen, surtout à son ouest où elle forme d'importants buissons très ramifiés, principalement dans les lieux rocaillieux, broussailleux et secs (Taleb-dida *et al.*, 2011).

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes très rameux, d'environ 30-60 cm d'hauteur (**Figure. 15**). Les tiges sont dressées, brun-rouge striées, à petites feuilles persistantes très nombreuses, alternes, coriaces et glabres, de forme ovale ou oblongue, atténuées en court pétiole et disposées le long et au sommet (Beniston et Beniston, 1984). Les fleurs sont en général bleues violacées, à quatre étamines, groupées en capitules hémisphériques plus ou moins globuleux, entourés d'un involucre de bractées atteignant près de 2 cm de diamètre. Elles ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée (Leporatti et Ghedira, 2009; Baba aissa, 2011).

#### IV.3.1. Classification botanique de *Globularia alypum*

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Asteridae

**Ordre :** Scrophulariales

**Famille :** Globulariaceae

**Genre:** *Globularia*

**Espèce :** *Globularia alypum* L. (Quezel et Santa, 1963)

#### V.3.2. Phytochimie

Plusieurs composés ont été isolés des fractions de l'extrait méthanolique du genre *Globularia*. Ces composés sont essentiellement des phénylétanoïdes glucosides, des iridoïdes (catalpol, acide mussaenosidique, acide (epi) loganique) et des secoiridoïdes, connues pour leurs diverses activités biologiques (Al-safi *et al.*, 2005; Amessiss-Ouchemoukh *et al.*, 2013). Cinq flavonoïdes sont identifiés comme des flavones glycosylés (hydroxyluteonine-7-

laminaribioside, deux isomères du luteolin disaccharides, cynaroside et nepitrine). Trois flavonol glycosilés (quercetin glucoside, amurnsin, hydroxycinnamic acide) ont été isolés à partir des feuilles. La présence du globularine, résine, mucilages, tanins, choline, chlorophylle, acide-cinnamique, acide globularique a été démontrées (Chograni *et al.*, 2012 ; Khlifi *et al.* ; 2011)



**Figure 15.** Photographie de *Globularia alypum* de djabel boutaleb

### V.3.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques

*G. alypum* est utilisée comme antiseptique, antimycosique, cicatrisante, astringente, diurétique (Bellakhdar *et al.*, 1991; Fehri *et al.*, 2012), antihypertensif et hypoglycémiant (Jouad *et al.*, 2002; Zennaki *et al.*, 2009). Les feuilles sont employées comme laxatif, purgatif, sudorifique et stomachite (Bellakhdar, 1997). La partie aérienne est utilisée pour traiter les maladies rénales, cardiovasculaires et contre les ulcères de l'estomac, du colon, du rectum, du foie et de l'œsophage (Djeridane *et al.*, 2006). Les espèces du genre *Globularia* présentent des activités antidiabétique, antituberculose, cytotoxiques, antioxydantes et antimicrobienne (Jouad *et al.*, 2002; Es-safi *et al.*, 2005, Zennaki *et al.*, 2009). Il a été rapporté que l'extrait aqueux de cette plante réduit l'hypertriglycérimie et améliore le statut oxydatif du muscle, des reins et du cœur chez des rats alimentés par le fructose (Taleb-Dida *et al.*, 2011).

# **Partie pratique**

# **Matériel & méthodes**

## MATERIEL ET METHODES

### I. Matériel

#### I.1. Matériel végétal

Les plantes *Hertia cheirifolia*, *Cistus salvifolius* et *Globularia alypum* ont été récoltées entre mai et juin 2010 de la région de djebel Boutaleb, au sud-ouest de Sétif. L'identification a été faite par Dr. N. Boulaachab (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif 1). Les parties aériennes des trois plantes collectées ont été nettoyées, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant 2-3 semaines. Les feuilles ont été séparées puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

#### I.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris *Swiss albinos*, mâles et femelles pesant 25 - 30 g et des rats *Albino Wistar* pesant 150 - 200 g, procurés aux près de l'institut Pasteur d'Alger. Les animaux repartis en groupes sont hébergés dans des cages en polypropylène à température ambiante avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. L'aliment est fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El-Kassar-Bejaia. Après une semaine d'adaptation, les animaux sont pesés, marqués et soumis à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

#### I.3. Sang humain et bovin

Le sang humain frais est obtenu par prélèvement à partir de donneurs volontaires sains et non fumeurs et qui n'ont pas pris de traitement médical pendant au moins quinze jours. Le sang bovin est procuré par prélèvement à partir d'animaux sains dans l'abattoir de la ville de Sétif.

#### I.4. Microorganismes

Les 10 souches bactériennes ATCC **Gram**<sup>-</sup> (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) et **Gram**<sup>+</sup> (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) utilisées nous ont été fournies gracieusement par le laboratoire de Substances Naturelles de Tlemcen.

Les 3 souches de champignons levuriformes et filamenteux (*Candida albicans* ATCC 1024, *Aspergillus niger* 2AC 936, *Aspergillus flavus* NRRL 3357) nous ont été fournis par le laboratoire du CHU de Sétif.

## II. Méthodes

### II.1. Extraction

#### II.1.1. Préparation des extraits aqueux

Les extraits aqueux (E.Aq) des feuilles des trois plantes sont préparés selon Ferreira *et al.* (2006). Brièvement, 100 g de poudre des feuilles de chaque plante sont mis à bouillir pendant 20 minutes dans 1000 ml d'eau distillée. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min, les surnageants obtenus sont filtrés et lyophilisés pour obtenir des poudres brunes qui seront conservées à -32°C jusqu'à leur utilisation.

#### II.1.2. Préparation des extraits méthanoliques

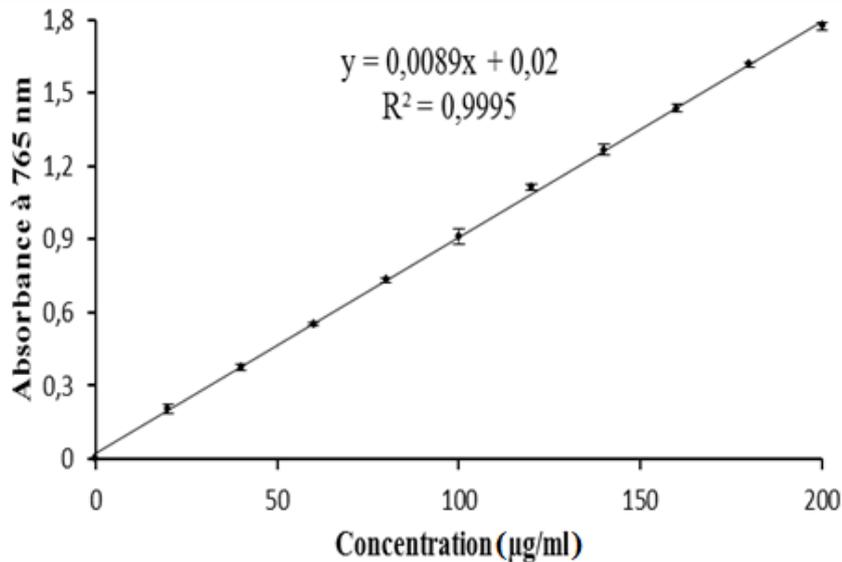
Les extraits méthanoliques (E.Met) sont préparés selon la méthode décrite par de Motamed et Naghibi (2010). Des pesées de 100 g de poudre des feuilles sont mises à une macération dans 1000 ml du mélange méthanol/eau (8:2 V/V) sous agitation pendant 24 h à l'ombre et à température ambiante. Après filtration, les filtrats sont récupérés cependant, les résidus sont remis pour une seconde macération dans 1000 ml de méthanol 50%, sous agitation pendant 24 h. Après filtration, le méthanol est évaporé sous pression réduite à 40°C dans un rotavapeur (BÜCHI). Les solutions obtenues sont lyophilisées pour obtenir des poudres brunes qui seront conservées à -32°C jusqu'à leur utilisation.

### II.2. Analyses phytochimiques

#### II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques des extraits méthanoliques et aqueux de *H. cheirifolia*, *C. salvifolius* et *G. alypum* est estimée par le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de Li *et al.* (2007). Cette méthode qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ ) phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Brièvement, 100 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide gallique sont mélangés avec 500 µl du réactif du Folin-Ciocalteu dilué au 1/10. Après 4 min, 400 µl de  $Na_2CO_3$  (7.5%) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 1 h 30 min d'incubation contre un blanc dépourvu d'extraits à tester qui ont été remplacés par le solvant. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en µg d'équivalent d'acide

gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ), et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 16**).



**Figure 16.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique

### II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ), Ceci traduit le fait que le métal perd 2 électrons pour s'unir à 2 atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune produite possède une absorbance maximale à 430 nm, l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans l'extrait (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). Le dosage des flavonoïdes des différents extraits a été réalisé selon Bahorun *et al.* (1996). Brièvement, 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (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 la quercétine (**Figure 17**) et est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

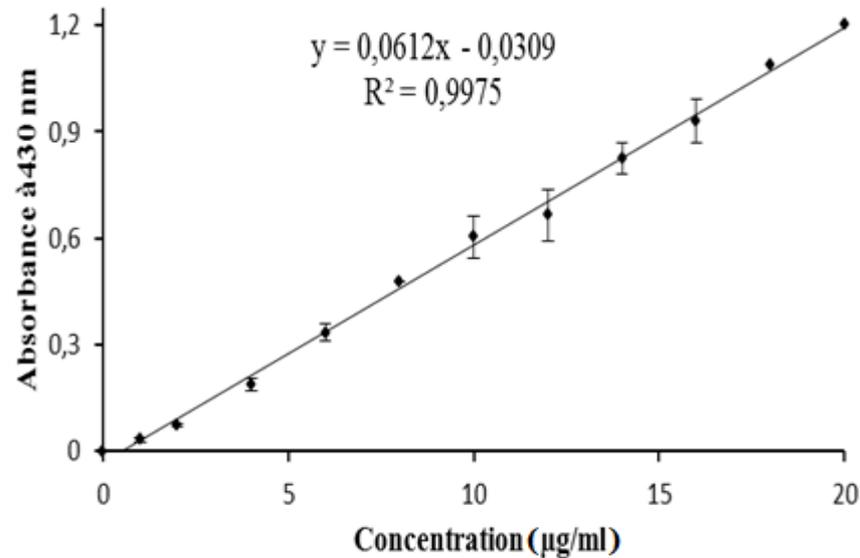


Figure 17. Droite d'étalonnage de la quercétine

### II.2.3. Dosage des tannins

La méthode de Bate-Smith, (1973) qui se base sur la précipitation de l'hémoglobine du sang frais des bovins est utilisée pour déterminer la teneur en tannins des extraits étudiés. Brièvement, un volume de sang hémolysé (1 ml de sang et 489 ml d'eau distillée) est mélangé avec un volume d'extrait 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 18**). 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 extraits est calculé selon la formule suivante:

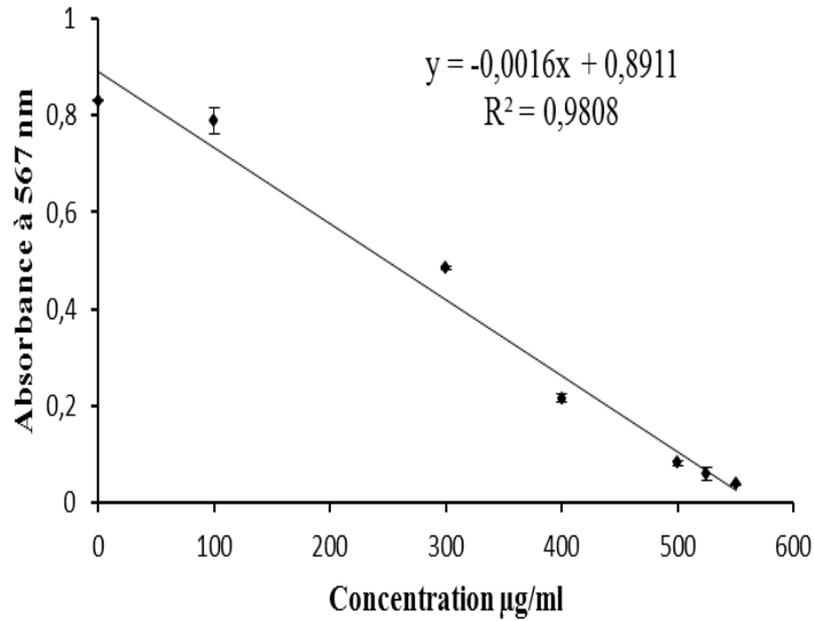
$$\text{Taux de précipitation (\%)} = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle.      At: Absorbance du test.

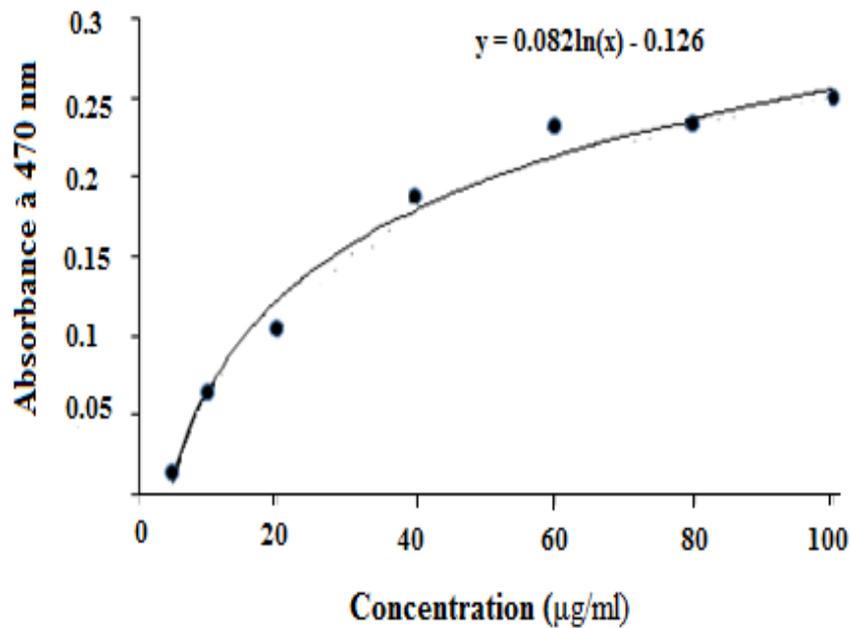
### II.2.4. Dosage des alcaloïdes

Le taux des alcaloïdes dans les extraits méthanoliques et aqueux a été déterminé selon la méthode décrite par Shamsa et *al.* (2008). A 1 ml de chaque extrait sont additionnés, 10 ml de solution de tampon phosphate (pH 4.7) et solution de vert de bromocresol avec une proportion 1:1 (V/V), et 4 ml de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement. Après décantation, la phase chloroformique est éliminée et la phase contenant les extraits est récupérée dans une fiole jaugée de 10 ml et le volume est ajusté avec du chloroforme.

L'absorbance est mesurée à 470 nm contre le blanc préparé sans extrait. L'atropine est utilisée comme standard. La concentration en alcaloïdes est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'atropine/mg d'extrait ( $\mu\text{g EA/mg d'extrait}$ ) (**Figure 19**).



**Figure 18.** Droite d'étalonnage de l'acide tannique



**Figure 19.** Courbe d'étalonnage des alcaloïdes

### II.2.5. Dosage des pigments liposolubles

Les teneurs en  $\beta$ -carotène, lycopène et chlorophylle des extraits méthanolique et aqueux ont été déterminées selon Nagata et Yamashida (1992). Brièvement, 100 mg de chaque extrait sont ajoutés à 10 ml d'un mélange acétone-hexane (4:6 V/V) puis agités vigoureusement pendant 1 min, ensuite le tout est filtré à travers un papier Whatman N°4. L'absorbance des filtrats est mesurée à différentes longueurs d'ondes: 453 nm, 505 nm, 645 nm et 663 nm. La teneur en pigments est calculée suivant les équations indiquées ci-dessous et les résultats sont exprimés en mg de chlorophylle, caroténoïdes ou atropène/g d'extrait.

$$-\beta\text{-carotène (mg/100 ml)} = 0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$$

$$-\text{Lycopène (mg/100 ml)} = -0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$$

$$-\text{Chlorophylle a (mg/100 ml)} = 0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645}$$

$$-\text{Chlorophylle b (mg/100 ml)} = -0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}$$

### II.2.6. Analyse par HPLC/TOF-MS

L'analyse qualitative des extraits aqueux et méthanoliques a été réalisée par HPLC/TOF-MS en utilisant un système HPLC Agilent Technology, 1260 Infinity, couplé à un détecteur (TOF) LC/MS, 6210 et une colonne ZORBAX SB-C18, selon Abay *et al.* (2015). Les extraits aqueux et méthanoliques (200 ppm) sont dissouts dans le méthanol, puis filtrés à travers un filtre PTFE (0.45  $\mu\text{m}$ ) à l'aide d'un injecteur pour éliminer toutes les particules. Ensuite, 10  $\mu\text{l}$  de chaque solution d'extrait est injectée dans une colonne de type phase inverse SB-C18 (4.6 x 100 mm et 3.5  $\mu\text{m}$ ). La phase mobile est constituée de trois éluants: l'eau distillée ultra pure, 0.1% d'acide formique et l'acetonitrile, respectivement. Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 30 min. Le débit est de 0.6 ml/min et la température de la colonne est de 35°C. Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF/MS est négatif, opérant avec le gaz de nitrogen à une température de 325°C et un débit de 10 L  $\text{min}^{-1}$ , un nébuliseur de 2,76 bars, un voltage capillaire de 4000 V et un voltage de fragmentation de 175 V. La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à 254 nm.

## II. 3. Etude toxicologique

Afin d'évaluer tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il est nécessaire de tester la toxicité des extraits des trois plantes étudiées. Dans la présente étude, les lignes directrices pour les essais des produits chimiques de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 425, 2008) ont été adoptées. Pratiquement, une dose de 2 g/kg de chaque extrait des trois plantes a été testée sur des lots de cinq souris de poids

homogène. Les souris sont réparties en 4 lots comme suit: Lot 1 (Placebo), Lot 2 (souris ayant reçu 2 g/kg d'E.Met de *H. cheirifolia*), Lot 3 (souris ayant reçu 2 g/kg d'E.Met de *C.salvifolius*), Lot 4 (souris ayant reçu 2 g/kg d'E.Met de *G.alypum*). Les doses sont administrées per os (dose unique) et par voie orale. Les souris du groupe placebo ont reçu un même volume (10 ml/kg) d'eau distillée. Afin d'établir des classes de toxicité (**Tableau 3**) pour les extraits des trois plantes qui n'ont pas montré de signes de toxicité ni un têt de mortalité à une dose de 2 g/ kg, une autre dose unique de 5 g/kg a été administré par voie orale à un groupe de 5 souris pour chaque plante et de la même façon. Les lots de souris ont été mis en observation individuelle afin de détecter les différentes perturbations comportementales et physiologiques des animaux en comparaison avec celui du groupe non traité, (agitation, convulsions, anorexie, paralysie partielle, asthénie, diarrhée et mort) pendant les 4 heures qui ont suivi les traitements puis régulièrement durant les premières 24 et 48 h et quotidiennement par la suite pendant 14 jours pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de mortalité. Afin de suivre l'évolution corporelle des souris le long de l'expérimentation, leurs poids sont déterminés avant et après une semaine de traitement et 24 heures avant le sacrifice.

**Tableau 3.** Classes de toxicité selon l'échelle de Diezi (1989) chez les souris de laboratoire

| <b>DL<sub>50</sub> orale</b>              | <b>Indice de toxicité</b> |
|---|---------------------------|
| DL <sub>50</sub> < 5 mg/kg                | très toxique              |
| 5 mg/kg < DL <sub>50</sub> < 500 mg/kg    | Toxique                   |
| 500 mg/kg < DL <sub>50</sub> < 5000 mg/kg | faiblement toxique        |
| DL <sub>50</sub> > 5000 mg/kg             | non toxique (inoffensive) |

### II. 3. 1. Détermination de la DL<sub>50</sub>

Pour les plantes qui ont provoqué un taux de mortalité lors de l'essai limite à 2 g/kg, la DL<sub>50</sub> est déterminé selon le protocole expérimental décrit par OCDE 425 (2008) et Litchfield et Wilcoxon (1949). La toxicité aiguë a été évaluée chez des souris, préalablement mis à jeun pendant 16 heures. Les animaux ont été randomisés par groupe de huit souris males et femelles pour chaque dose. Cinq lots sont traités par voie orale chacun par une dose unique de l'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius*: 55, 175, 550, 1750, et 2000 mg/kg de poids corporel. Les souris du groupe témoin ont reçu un même volume (10 ml/Kg) d'eau distillée.

Les souris traitées sont surveillées jusqu'à 14 jours pour enregistrer les effets toxiques, y compris le nombre de morts.

La DL<sub>50</sub> a été déterminé selon deux méthodes de Miler et Tainter (1944) et l'analyse par la méthode de probits (méthode des moindres carrés) en utilisant le logiciel Bio stat professionnel 3.2/2007 (El Allaoui *et al.*, 2011).

### **II. 3. 2. Examen biochimique**

Au 14<sup>ème</sup> jour de l'expérience, les souris ont été sacrifiées afin de récupérer le sang pour des analyses biochimiques et les organes pour des analyses cytologiques.

Le sang récupéré dans des tubes héparinés est soumis à une centrifugation à 4000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à froid afin de doser le glucose, créatinine, cholestérol total, triglycérides totaux, transaminase glutamate oxaloacétate, transaminase glutamate pyruvate et phosphatase alcaline. Le dosage est effectué à l'aide d'un automate Beckman Coulter Synchron CX-9 Clinical System ALX.

### **II. 3. 3. Examen histologique**

Les foies et les reins sont récupérés, pesés puis préservés dans le formol 10% pendant une semaine, pour réaliser les coupes histologiques. Les différents organes sont coupés en petits morceaux puis déshydratés par passage dans trois bains successifs d'éthanol (70-75°, 90-95° et 100°) pendant 30 minutes. Ensuite, ils sont éclaircis pendant 20 min dans deux bains de toluène et finalement inclus dans deux bains de paraffine pendant deux heures à l'aide d'un automate (LEICA RM 1160). Les blocs de paraffine sont coupés par microtome (LEICA RM 2145), les coupes obtenues de 5µm d'épaisseur sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, rehydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine.

## **II.4. Activité anti-inflammatoire *in vivo***

### **II.4.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris**

L'effet anti-œdémateux des extraits aqueux et méthanolique des feuilles a été évalué 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 15 µl 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, 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 la solution de l'huile de croton et non traité) selon la formule suivante :

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

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

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

#### **II.4.2. 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 (Winter *et al.*, 1962). Une heure avant l'induction de l'œdème, les rats traités reçoivent oralement 200 ou 400 mg/kg de l'E.Aq ou de l'E.Met des feuilles de *Hertia cheirifolia*, *Cistus salvifolius* et *Globularia alypum*. L'aspirine (100 mg/kg) est utilisé comme anti-inflammatoire de référence. Le volume des pattes enflammées est mesuré à l'aide d'un pléthysmomètre (Ugo Basile, Italie) avant l'administration de la carragénine et 30 min après traitement, puis chaque heure jusqu'à 6 h. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule :

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

$\Delta$  Témoin: moyenne de volume pour le groupe témoin.

#### **II .4.3. Poche d'air**

La poche d'air est réalisée selon la méthode décrite par Toby (2003). Les souris sont anesthésiées, puis une poche d'air dorsale est formée dans la région intra scapulaire par l'injection sous-cutanée de 3 ml d'air stérile. Trois jours plus tard, la poche est regonflée par l'injection de 1.5 ml d'air stérile. Cette opération est répétée le sixième jour pour assurer la formation de la poche d'air. Sept jours après l'injection initiale d'air, 0.1 ml de  $\lambda$ -carragénine (1%) est injectée dans la cavité de la poche d'air pour induire une inflammation. Une heure après l'induction de l'inflammation, les souris reçoivent par injection l'extrait (1 mg/poche) ou l'indométacine (0.15 mg/poche) et sont sacrifiées par dislocation cervicale 4 h après le traitement. Ensuite, 1 ml d'eau physiologique est injecté dans la poche, après un léger massage, une incision est effectuée et l'exsudat de la poche est récupéré. Afin de déterminer le nombre de leucocytes ayant migrées vers la poche d'air, une dilution au 1/10 de l'exsudat est réalisée par la solution Turk. Le comptage des PMNs est effectué à l'aide d'une cellule

Thoma avec un objectif X 40. Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est calculé par la comparaison de pourcentage d'infiltration leucocytaire chez les souris des groupes traités avec celui du groupe témoin considéré comme 100% d'activation selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Nombre de PMNs du groupe témoin} - \text{Nombre de PMNs du groupe traité}) / \text{Nombre PMNs de groupe témoin}] \times 100$$

#### II.4.4. Granulome au pellet de coton

Les rats sont anesthésiés légèrement avec l'érythan (20%, W/V). L'arrière peau de chaque rat a été rasée au niveau axillaire (creux de l'aisselle) et désinfecté avec l'éthanol 70 %. Une incision a été faite dans les deux régions axillaires de chaque rat en utilisant une lame de bistouri, puis en utilisant des forceps émoussés, des tunnels sous-cutanés ont été formés. Un pellet de coton de 15 mg stérilisé a été implanté dans la fosse axillaire de chaque rat (Ismail *et al.*, 1997). Les groupes de rats traités reçoivent, par voie orale une fois par jour pendant 7 jours consécutifs, 200 mg/kg d'E. Met, E.Aq ou 100 mg/kg du dexaméthasone. Le groupe témoin reçoit uniquement de l'eau distillée. Au 8<sup>ème</sup> jour, les rats sont sacrifiés et le sang est récupéré dans des tubes héparinés, la rate de chaque rat est récupérée puis pesée et les deux pellets de coton sont retirés puis pesés et séchés à l'étuve à 50°C pendant 24 h jusqu'à un poids constant et ils sont ensuite repesés. Le pourcentage d'inhibition du granulome est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(\text{Poids des pellets du groupe témoin} - \text{Poids des pellets du groupe traité}) / \text{Poids des pellets du groupe témoin}] \times 100$$

#### II.4.5. Détermination de l'activité cicatrisante

L'effet cicatrisant des E.Met et E.Aq des trois plantes sur des plaies expérimentales est déterminé selon Kodati *et al.*, (2011). Au début de l'expérience, la peau saine des rats a été préparée en éliminant tous le pelage. Les extraits ont été préparés dans la vaseline à une concentration de 5% (w/w). Le Mycocide® (0.25%, W/W) est utilisé comme standard. Les rats ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale de 1 ml de l'uréthane 20% (W/V). Des plaies circulaires de 300 mm<sup>2</sup> ont été réalisées au niveau dorsal et désinfectées avant l'application de la pommade. Les animaux sont traités une fois par jour avec une quantité précise de la pommade (environ 0.4 g). Le groupe témoin ne reçoit que de la vaseline. Les mesures des plaies ont été faites tous les trois jours jusqu'à la guérison complète (15 jours). L'aspect, la couleur et l'odeur des plaies ont été surveillés pendant toute la durée du

traitement. Le pourcentage de diminution ou rétrécissement des plaies est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ de diminution} = (\text{surface de la plaie } M J_1 - \text{surface de la plaie } M J_n / \text{surface de la plaie } M J_1) \times 100$$

$M J_1$ , Mesure au premier jour

$M J_n$  : Mesure au n<sup>ème</sup> jour

## II.4.6. Détermination de l'activité analgésique

### II.4.6.1. Test de contorsion dorso-abdominale (Test de torsion)

L'activité antalgique vis à vis de la douleur provoquée par l'acide acétique est évaluée selon la méthode décrite par Koster *et al.* (1959). Les souris sont réparties en lots de 6 souris. Le premier lot est utilisé comme témoin et reçoit par voie orale du NaCl physiologique (10 ml/kg) et les autres lots reçoivent par voie orale une dose unique de 200 mg, 400 mg d'extraits/kg ou 100 mg/kg d'aspirine comme référence. Un volume de 10 ml/kg d'acide acétique à 0.6 % est ensuite injecté par voie intra péritonéale. Le syndrome douloureux caractérisé par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsions de la musculature dorso-abdominale a été suivi en comptant le nombre de torsions pour chaque souris chaque 5 minutes au cours des 30 minutes après l'injection de l'acide acétique.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur. La moyenne des inhibitions des groupes traités par les extraits et l'aspirine a été comparée avec celle du groupe témoin. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = (M_c - M_t / M_c) \times 100$$

**M<sub>c</sub>**: moyenne du nombre de contorsions des souris du lot contrôle non traité.

**M<sub>t</sub>**: moyenne du nombre de contorsion des souris du lot traité.

### II.4.6.2. Test du formaldéhyde

L'effet antalgique des E.Met et E.Aq vis à vis de la douleur provoquée par le formaldéhyde a été déterminé selon la méthode décrite par Shibata *et al.* (1989) modifiée par Mbagwu *et al.*, (2007). Les souris sont réparties en lots de 6 souris chacun et sont soumis à jeun pendant une nuit. Le premier lot est utilisé comme témoin et reçoit du NaCl physiologique (10 ml/kg) et les 2 autres lots reçoivent par voie orale une dose unique de 200 mg, 400 mg d'extraits/kg. Le dernier lot reçoit de la morphine (utilisée comme référence) par voie intra péritonéale à la dose de 10 mg/kg, Une heure après l'administration des extraits ou 30 min après l'administration de la morphine, 20 µL du formaldéhyde (1%) sont injectés sous le coussinet

plantaire de la patte postérieure droite de chaque souris. Les animaux sont placés dans une enceinte qui permet d'observer la patte traitée et l'effet anti nociceptif est déterminé en deux phases. La première phase de 0 à 5 min et la seconde de 15 à 30 minutes. Le temps (en secondes) passé à lécher et à mordre la patte injectée (temps de réaction indicative de la douleur) a été enregistré pour chaque animal dans les deux phases. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{Temps de réaction du groupe témoin}) - (\text{Temps de réaction du groupe traité}) / (\text{Temps de réaction du groupe témoin})] \times 100$$

## **II.5. Activité anti-inflammatoire *in vitro***

### **II.5.1. Production des cytokines**

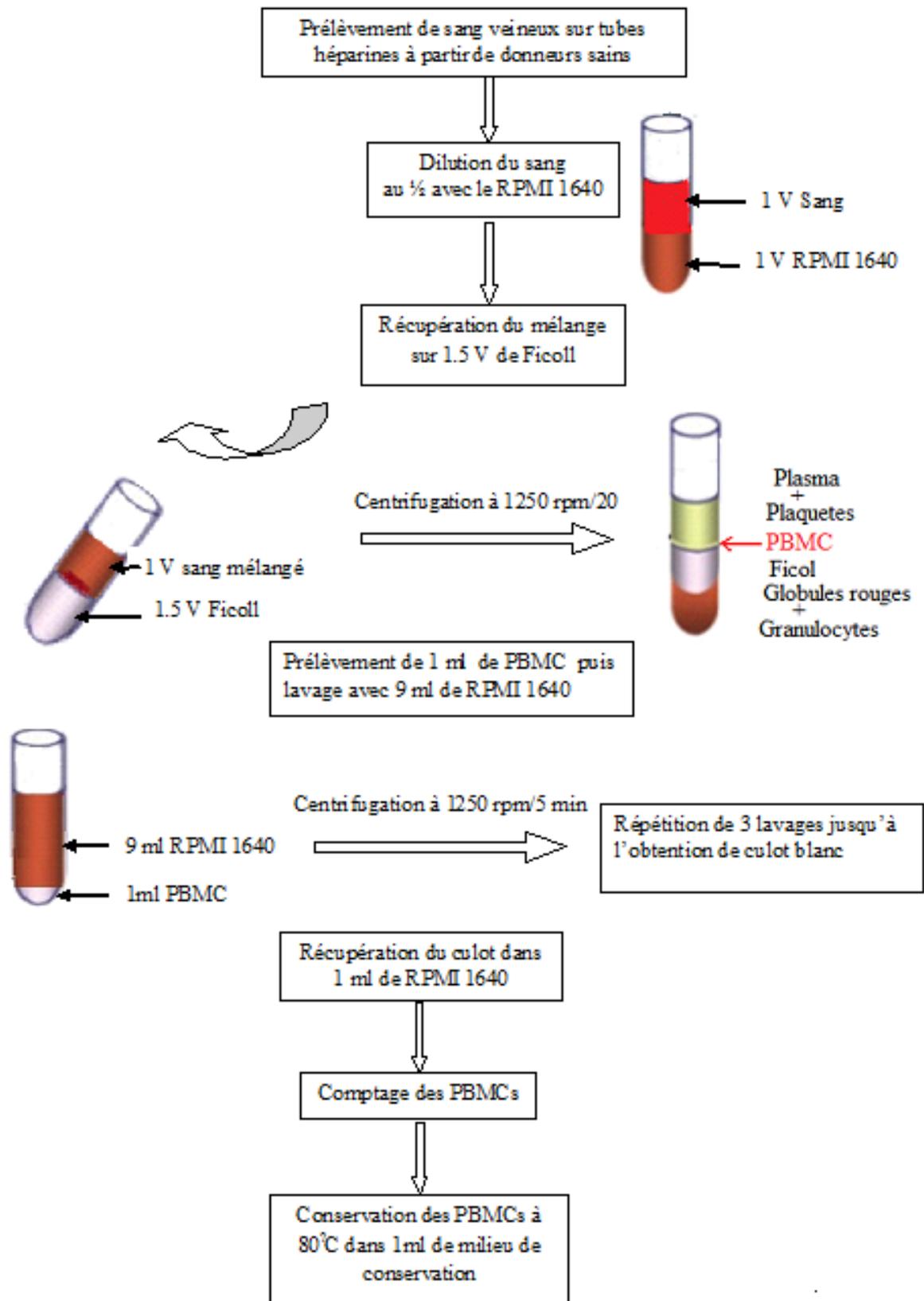
#### **II.5.1.1. Isolement des monocytes périphériques du sang**

Les monocytes périphériques sont isolées selon la méthode décrite par Amro *et al.*, (2013). Le sang veineux est prélevé dans des tubes héparinés (Becton Dickinson. MountainView, Calif) puis dilué (1:1, V/V) avec du milieu RPMI 1640 et mélangé à l'aide d'une pipette stérile. Le mélange est ensuite transféré délicatement dans un tube stérile contenant du Ficoll, suivi d'une centrifugation à 1250 rpm pendant 20 min. Les cellules mononucléaires (Lymphocytes et macrophages) restent à l'interphase formant un anneau limpide, tandis que les autres types de cellules précipitent. Les cellules mononucléaires sont aspirées à l'aide d'une pipette pasteur stérile puis transférées dans un tube stérile et centrifugées à 1480 rpm pendant 5 minutes. Cette étape est répétée deux fois. Après la dernière centrifugation, les cellules sont récupérées dans 9 ml de RPMI et conservées à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans un bain de glace. Lors de son utilisation, la suspension cellulaire est centrifugée à 1480 rpm pendant 5 min, puis les cellules sont récupérées dans du RPMI à la concentration choisie (**Figure 20**). Afin de déterminer le nombre des monocytes obtenus, 50  $\mu$ l de la suspension cellulaire sont rigoureusement mélangés avec 50  $\mu$ l de bleu trypan, puis le nombre est déterminé à l'aide d'une cellule de Thoma.

#### **II.5.1.2. Culture cellulaire et dosage des cytokines**

Les cellules ( $2 \times 10^5$  cellules/ml) sontensemencées dans des plaques de 24 puits dans le milieu RPMI 1640 contenant 10% de serum de veau fœtal, tampon HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM), Gentamicin (50  $\mu$ g/ml), Penicillin (100 U/ml) et la streptomycine sulphate (100 mg/ml). Les monocytes traités pendant 30 min par les E.Met et les E.Aq À différentes concentrations (1, 10, 50 et 100  $\mu$ g/ml) ou non traités (contrôle) sont stimulées par 5  $\mu$ g/ml de

Concavalin A. Après, elles s sont incubées dans une étuve à atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figure 20.** Principales étapes d'isolement de PBMCs à partir de sang humain

(Après une nuit d'incubation, les surnageants ont été récupérés et une gamme d'étalonnage a été réalisée avec chacun des TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et l'IFN $\gamma$ . La quantité de chaque cytokine libérée a été déterminée par ELISA suivant le protocole décrit par le fabricant (eBioscience, San. Diego, CA) et exprimée en pg/200  $\mu$ l de surnageant.

### II.5.2. Inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes étudiées a été évaluée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par Lavanya *et al.* (2010). Brièvement, 0.45 ml de la solution aqueuse d'albumine du sérum bovin (BSA) à 5 % est ajoutée à 0.05 ml de chaque extrait aqueux ou méthanolique (500  $\mu$ g/ml) ou de Diclofénac sodique comme anti-inflammatoire de référence avec la même concentration. Le contrôle est composé de 0.45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0.05 ml d'eau distillée. Les pH de toutes les solutions citées sont ajustés à 6.3, puis sont incubées à 37°C pendant 20 min. Ensuite, la température est augmentée à 57°C pendant 3 min, suivie d'un refroidissement. Un volume de 2.5 ml de la solution saline tampon phosphate (pH 6.3) est ajouté aux solutions.

L'absorbance (A) est lue à 420 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - (A \text{ du contrôle} - A \text{ de la solution test}) \times 100 / (A \text{ du contrôle})$$

### II.5.3. Stabilité membranaire des érythrocytes humains

La capacité des extraits méthanoliques et aqueux à protéger la membrane des érythrocytes humains contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique est évaluée selon la méthode décrite par Debnath *et al.* (2013). Brièvement, 100  $\mu$ L de la suspension érythrocytaire diluée à 10% dans un milieu isotonique (tampon phosphate 10 mM, pH=7.4, 154 mM NaCl) sont ajoutés à 1 ml de chaque extraits à différentes concentrations (0.5, 1, 2, 3 mg/ml) dissous dans un milieu hypotonique (10 mM tampon phosphate, pH=7.4, 50 mM NaCl) ou 1 ml d'aspirine (0.1 mg/ml) qui est utilisé comme référence. Le contrôle considéré comme 100% d'hémolyse contient la suspension érythrocytaire avec le milieu hypotonique seul. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, une centrifugation est effectuée à 3000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant récupéré est lue à 450 nm. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times (A_1 - A_2) / A_1$$

A<sub>1</sub>= L'absorbance du contrôle négatif

$A_2 = L$  = l'absorbance de l'extrait ou l'aspirine

## II.6. Activité antioxydante

### II.6.1. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire des extraits méthanoliques et aqueux a été évaluée par le test de DPPH (Que *et al.*, 2006). Le DPPH (diphényl picryl-hydrayl) est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans le méthanol. Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en diphényl picryl-hydrazine, de couleur jaunâtre dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

Pratiquement, 1 ml d'extrait à différentes concentrations (2-500 µg/ml) sont mis dans 1 ml de solution méthanolique de DPPH (0.1 mM). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution du radical DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc d'éthanol. Le BHT est utilisé comme antioxydant standard. 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.

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

### II.6.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des des extraits méthanoliques et aqueux a été évaluée selon la méthode décrite par Le *et al.*, (2007). Un volume de 700 µl de solutions d'extraits à différentes concentrations (5-200 µg) est mélangé avec 50 µl de  $FeCl_2$  (0.6 mM). Après 5 min d'incubation, 50 µl de ferrozine (5 mM) sont ajoutés 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. 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 effectives à 50% (EC<sub>50</sub>) des deux extraits qui produisent 50% d'activité chélatrice ont été calculées.

### II.6.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanoliques de *H. cheirifolium*, *C. salvifolius* et *G. alypum* est déterminé selon le protocole décrit par Rohit *et al.* (2012). Des solutions d'extraits et d'antioxydant de référence à différentes concentrations (2.5-200 µg/ml) sont initialement mélangées avec 2.5 ml du tampon phosphate (200 mM, pH 6.6) et 2.5 ml de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. Après 20 min. d'incubation à 50°C, 2.5 ml de TCA (10%) sont ajoutés 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 FeCl<sub>3</sub> (0.1%) et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc sans FeCl<sub>3</sub>. L'absorbance est directement proportionnelle au pouvoir réducteur.

La valeur d'EC<sub>50</sub> est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

### II.6.4. Blanchiment du β-carotène

La capacité de prévenir le blanchiment du β-carotène par les extraits étudiés est déterminée selon la méthode décrite par Tepe *et al.* (2011), qui est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique. Brièvement, 0.5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme est mélangée avec 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite à 45°C, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. Le milieu réactionnel contient 2.5 ml de l'émulsion de β-carotène/acide linoléique et 0.5 ml des solutions d'extraits (2 mg/ml) ou de l'antioxydant de référence BHT. Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation (t = 0 min) et à des intervalles de 15 min jusqu'à la fin de l'expérience (t = 120 min) à 490 nm. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle selon l'équation suivante

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [1 - (A_{t_0} - A_{t_{120}})_{\text{test}} / (A_{t_0} - A_{t_{120}})_{\text{contrôle}}] \times 100$$

A<sub>t<sub>0</sub></sub>: absorbance au temps t = 0.

A<sub>t<sub>120</sub></sub> : absorbance au temps t = 120 min.

## II.6.5. Oxydation de l'ADN

### 1. SDS-PAGE

L'activité protectrice de l'ADN par les extraits contre l'oxydation a été évaluée selon la méthode décrite par Kizil *et al.* (2011). L'endommagement de l'ADN a été testé par photolyse de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec des UV en présence d'ADN du plasmide pBluescript M13<sup>+</sup>. L'ADN plasmidique a été isolé à partir de la bactérie *E. coli* XL-1 Bleue par un kit Qiagen plasmid miniprep (Annexe 1) puis oxydé par un traitement de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV en présence de différentes concentrations (100, 250, 350 et 500 µg/mL) des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolium*, *C. salvifolius* et *G. alypum*. L'endommagement de l'ADN est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Brièvement, les expériences ont été réalisées dans un volume de 10 µl dans un tube de microcentrifugation contenant 200 ng d'ADN plasmidique dans un tampon phosphate (7.14 mmol et 14.29 mmol NaCl, pH 7.4), puis l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajouté à une concentration finale de 2.5 mmol/L, avec ou sans 1 µl d'E. Met ou E. Aq de chaque plante. Les réactions ont été initiées par irradiation UV et se sont poursuivies pendant 5 minutes sur la surface d'un transilluminateur UV avec une intensité de 8000 mW/cm<sup>2</sup> à 300 nm et à température ambiante. Après irradiation, le mélange réactionnel (10 µl) avec un colorant de détection du gel a été placé sur un gel d'agarose à 1% pour l'électrophorèse. L'électrophorèse a été réalisée à 40 V pendant 3 h en présence de bromure d'éthidium (10 mg/mL). L'ADN plasmidique pBluescript M13<sup>+</sup> non traité a été utilisé comme témoin dans chaque essai d'électrophorèse sur gel ou avec un traitement partiel (le traitement UV ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seulement). Le pourcentage d'inhibition de la scission des brins d'ADN a été calculé comme suit:

$$\% \text{ d'Inhibition} = I - (S_{m+a} - S_c) / (S_m - S_c).$$

$S_{m+a}$  représente le % restant d'ADN superenroulé après le traitement par UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des extraits.  $S_c$  est le % restant d'ADN superenroulé dans le plasmide témoin non traité.  $S_m$  est le % restant d'ADN superenroulé traité avec l'UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence d'extraits.

### 2. Analyse densitométrique

Le gel contenant l'ADN plasmidique Bluescript M13<sup>+</sup> traité et non traité a été analysé en utilisant un système de gel documentation (Gel- Doc - XR, BioRad, Hercules, CA, USA). Les bandes sur les gels ont été quantifiées par un programme Série découverte Quantité (version 4.5.2, BioRad Co.).

## II.6.6. Oxydation des protéines

### 1. SDS-PAGE

La capacité protectrice des E. Met et E. Aq de *H. cheirifolia*, *C. salvifolius* et *G. alypum* contre l'oxydation des protéines a été évaluée selon Kizil *et al.* (2011). Le BSA (1 mg/mL),

utilisée comme modèle de protéine, a été dissous dans 20 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7.4), puis 50  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M d'acide ascorbique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Ce mélange a été incubé en présence ou en absence des E. Met ou E. Aq des trois plantes (50-1000  $\mu$ g/mL) dans un volume final de 1.2 ml pendant 3 h à 37°C, puis analyser par électrophorèse-SDS sur gel de polyacrylamide 10% selon Laemmli, (1970). Le gel de séparation constitué de 10% d'acrylamide et 2.74% de bis-acrylamide a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (w/v) et polymérisé par ajout de 0.042% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (w/v). Le gel de concentration a été préparé de la même manière. Les échantillons ont été mélangés avec des volumes égaux de tampon d'échantillon (Tris-HCl pH 6.8, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoéthanol, 10% de saccharose et 0.002% de bleu de bromophénol). Le mélange est ensuite porté à ébullition pendant 5 minutes, puis 5  $\mu$ l de chaque échantillon ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE. Le gel a été placé dans un réservoir BioRad et un tampon de migration (25 mM Tris pH 8.3, 190 mM glycine, et 0.1% SDS) à une tension maximale de 25 m Amp, en utilisant une alimentation 1000/500 ( $\mu$ H/W<sup>-1</sup>) (BioRad). Les protéines séparées dans les gels ont été colorées dans une solution de bleu de Coomassie brillant R-250 (0.15%) contenant 10% d'acide acétique, 45% de méthanol dans de l'eau distillée, pendant 2 h puis décolorées par une solution d'acide acétique (10%) et numériquement photographiés.

## 2. Analyse densitométrique

La densité de chaque bande, correspondant aux fragments de protéine a été estimée à l'aide du système de documentation de gel (Gel- Doc - XR, BioRad, Hercules, CA, USA). Les bandes sur les gels ont été quantifiées par Un programme Série découverte Quantité (version 4. 5. 2, BioRad Co.). La densité de chaque bande a été estimée et normalisée par rapport au groupe témoin.

## II.7. Activité antimicrobienne

### II.7.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des E. Met et E. Aq de *H. cheirifolia*, *C. salvifolius* et *G. alypum* a été évaluée par la technique de diffusion sur l'agar (Falleh *et al.*, 2008), vis-à-vis de 6 souches bactériennes Gram<sup>-</sup> (*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<sup>+</sup> (*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'E. Aq ou E. Met puis placés sur les boîtes. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée. Des disques standards contenant l'antibiotique de référence (Amoxicilline) sont utilisés. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition exercée par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques.

### **II.7.2. Evaluation de l'activité antifongique**

L'activité antifongique des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon Sacchetti *et al.* (2005). Les cultures mères ont été développées sur une gélose appropriée (Sabouraud avec chloramphénicol), afin d'inhiber la croissance des éléments de la flore bactérienne contaminante et d'atteindre la phase stationnaire de la croissance. Les disques stériles imprégnés de 15 µl/disque de différentes concentrations d'extraits (200 et 300 µg/ml) sont déposés stérilement sur la gélose Sabouraud,ensemencée au préalable par la suspension microbienne ( $2.10^6$  spores/ml) correspondant à une absorbance de 0.15-0.17 à 530 nm pour les champignons et  $10^5$  pour les levures (Yazdani *et al.*, 2012). Les levures ont été incubées 48 h à 37 °C, tandis que les champignons ont été incubé 7 jours à 27 °C. Des témoins de Clotrimazon à 50 µg et le DMSO ont été réalisés (référence et témoin négatif respectivement). L'activité antifongique a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé pour les différentes concentrations des différents extraits.

### **II.9. Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, et en moyenne  $\pm$  SEM pour les tests *in vivo*. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 Demo. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey ou Dunett. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

# Résultats

## RESULTATS

### I. Analyses phytochimiques

#### I.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins

Après extraction hydro-alcoolique et aqueuse, des poudres fines hygroscopiques de couleur brune sont obtenus. L'E.Met et l'E.Aq de *G. alypum* représentent le rendement le plus élevé ( $37.87 \pm 3.34\%$  et  $30.05 \pm 2.06\%$  respectivement). Le rendement des extraits de *H. cheirifolia* sont proches, tandis que ceux de *C. salvifolius* sont différents. Les rendements des extraits méthanoliques des trois plantes sont relativement plus élevés que ceux des extraits aqueux (**Tableau 4**).

Le dosage des polyphénols totaux montre que l'E.Met et l'E.Aq de *C. salvifolius* renferment la plus grande quantité de polyphenols totaux avec  $414.70 \pm 0.01$  et  $291.48 \pm 0.08$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait respectivement suivi dans l'ordre par l'E.Met de *G. alypum*, l'E.Aq de *G. alypum*, l'E.Met de *H. cheirifolia* et finalement l'E.Aq de *H. cheirifolia* (**Figure 21**).

L'E.Met de *C. salvifolius* représente également l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de  $14.13 \pm 0.025$   $\mu\text{g EQ/mg E}$ , soit 1.5 fois supérieur à celles trouvées dans l'E.Met et l'E.Aq de *G. alypum* et environ 3.5 fois supérieur à celles de l'E.Aq de *C. salvifolius*, l'E.Met et l'E.Aq de *H. cheirifolia* (**Tableau 4**).

Le dosage des tannins a montré que l'acide tannique induit une précipitation totale de l'hémoglobine à une concentration de  $550$   $\mu\text{g/ml}$ . A  $0.5$   $\text{mg/ml}$ , l'E.Met et l'E.Aq de *C. salvifolius* représentent les effets tannants les plus élevés de l'ordre de  $82\%$  et  $73\%$  respectivement, tandis que à  $4$   $\text{mg/ml}$ , l'effet tannant de l'E.Met de *H. cheirifolia* est de  $75.93\%$  suivi par l'E.Met de *G. alypum*  $57\%$ , l'E.Aq de *G. alypum* ( $49.68\%$ ), et finalement l'E.Aq de *H. cheirifolia* ( $48.56\%$ ).

#### I.2. Détermination des pigments liposolubles

Les résultats obtenus montrent une richesse de l'E.Aq de *H. cheirifolia* en  $\beta$ -carotène, lycopène et en chlorophyle a et b suivi par l'E.Met de *H. cheirifolia* et l'E.Met de *G. alypum*. Les autres extraits ont montré des quantités faibles en ces molécules (**Figure 22**).

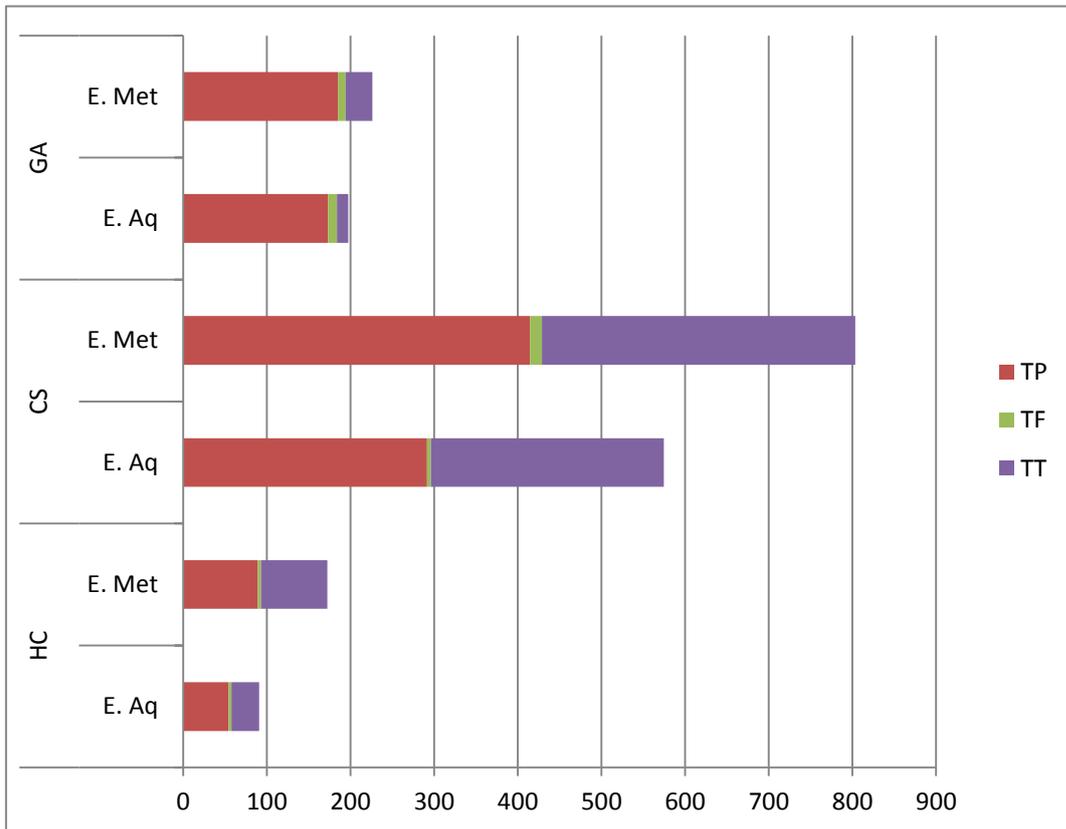
#### I.3. Dosage des alcaloïdes

La teneur en alcaloïdes des E.Met et E.Aq des trois plantes varient de  $4.74$  à  $6.05$   $\mu\text{g/mg}$  (**Tableau 5**). L'E.Met de *G. alypum* contient plus d'alcaloïdes que les autres extraits.

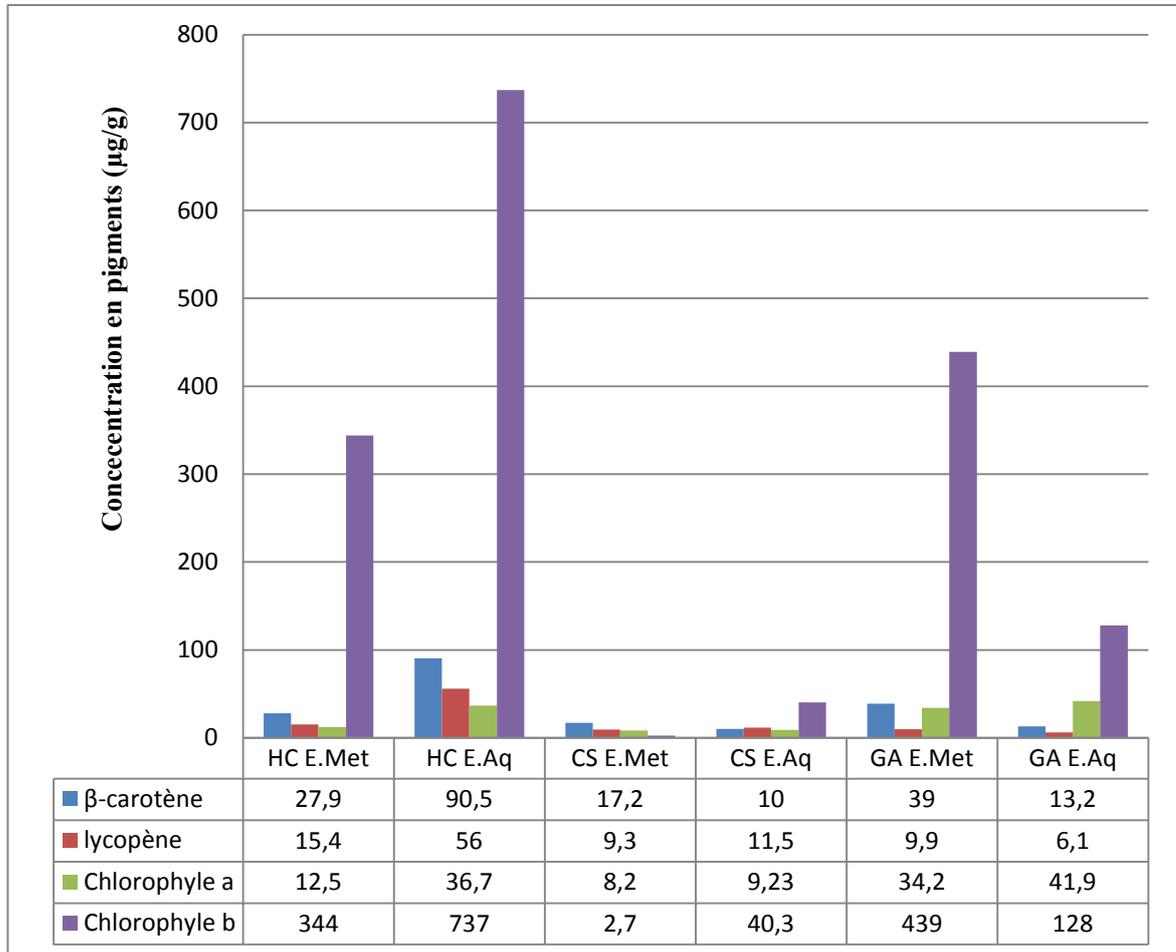
**Tableau 4.** Rendements d'extraction et teneurs de l'E. Met et E .Aq de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (CS) en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins.

| Plante | Extraits Bruts | Rendement d'extraction (%) | Polyphénols (µg EAG/mg d'extrait) | Flavonoïdes (µg EQ/mg d'extrait) | Tannins (µg EAT/mg d'extrait) |
|--------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| HC     | E. Aq          | 17.18 ± 2.72               | 54.28 ± 1.64                      | 3.48 ± 1.23                      | 33.32 ± 0.06                  |
|        | E. Met         | 19.3 ± 3.43                | 89.44 ± 6.68                      | 3.99 ± 1.35                      | 79.00 ± 0.025                 |
| CS     | E. Aq          | 9.45 ± 2.1                 | 291.48 ± 0.08                     | 4.85 ± 0.038                     | 278.31 ± 0.014                |
|        | E. Met         | 17.42 ± 1.56               | 414.70 ± 0.01                     | 14.13 ± 0.025                    | 374.56 ± 0.04                 |
| GA     | E. Aq          | 30.05 ± 2.06               | 173.11 ± 13.85                    | 10.85 ± 1.92                     | 13.43 ± 0.025                 |
|        | E. Met         | 37.85 ± 3.34               | 185.05 ± 2.56                     | 9.30 ± 1.71                      | 31.86 ± 0.014                 |

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.



**Figure 21.** Contenu en composé phénoliques des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (CS). TP: Teneurs en polyphenols totaux ; TF: Teneurs en flavonoides ; TT: Teneurs en tanins



**Figure 22.** Contenu en pigments liposolubles des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (CS).

**Tableau 5.** Teneurs total en alcaloides des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius*. exprimée en équivalent milligramme d’atropine (µg EA/mg d’extract).

| Plante               | Extrait | Alcaloïdes (µg EA/g) |
|----------------------|---------|----------------------|
| <i>H.cheirifolia</i> | E.Met   | 5.14 ± 0.12          |
|                      | E.Aq    | 4.74 ± 0.14          |
| <i>G. alypum</i>     | E.Met   | 6.05 ± 0.04          |
|                      | E.Aq    | 5.53 ± 0.16          |
| <i>C.salvifolius</i> | E.Met   | 5.51 ± 0.07          |
|                      | E.Aq    | 4.89 ± 0.04          |

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

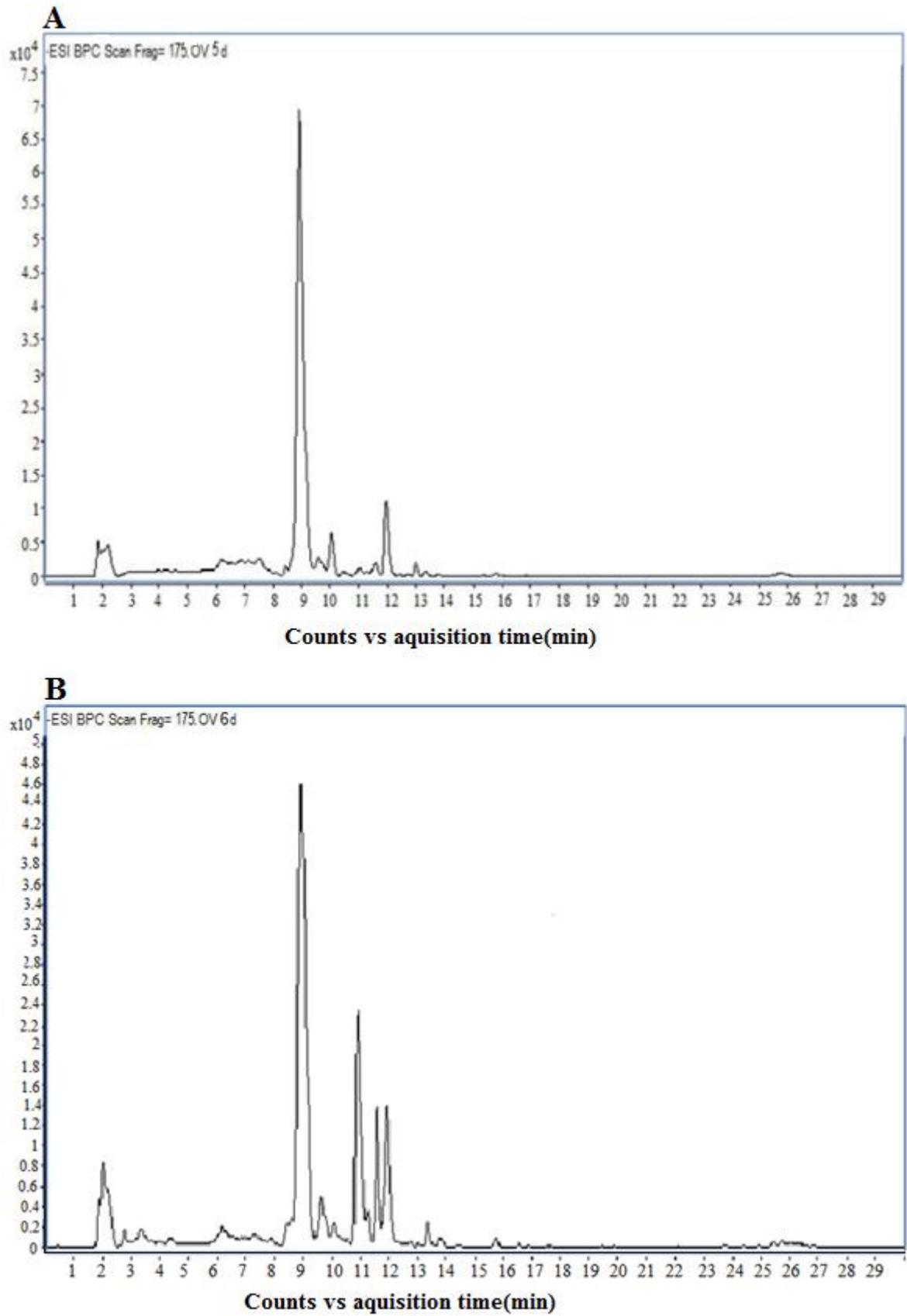
#### I.4. Caractérisation phytochimique par HPLC/Tof-MS

La comparaison des temps de rétention des composés de l'E.Aq et l'E.Met de *G. alypum* avec ceux des différents standards a permis de suspecter la présence de 14 composés phénoliques. Il s'agit de 5 acides phénols (acide gentisique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide cinnamique et l'acide *P*-coumarique) et 9 flavonoïdes (catechine, rutine, scutellarine, quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside, naringine, diosmine, hesperidine, neohesperidine et la morine), l'acide protocatechuique n'est détecté que dans l'extrait aqueux (**Tableau 6 et Figure 23**).

**Tableau 6.** Composés phénoliques identifiés par HPLC/TOFMS dans l'E.Met et l'E.Aq de *G. alypum* (GA), *Cistus salvifolius* (CS) et *Hertia cherifolia* (HC).

| Composés phénoliques              | TR (min) | mg/Kg de GA |        | mg/Kg de CS |        | mg/Kg de HC |        |
|-----------------------------------|----------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
|                                   |          | E.Met       | E.Aq   | E.Met       | E.Aq   | E.Met       | E.Aq   |
| Acide 4-hydroxybenzoïque          | 6.16     | 3.46        | 14.64  | 3.88        | -      | 3.96        | -      |
| Acide protocatechuique            | 6.43     | -           | 39.53  | 19.96       | 8.86   | -           | -      |
| Acide <i>P</i> -coumarique        | 9.99     | 8.33        | 13.74  | -           | -      | 25.09       | 13.74  |
| Acide vanillique                  | 8.14     | 25.26       | 19.00  | -           | -      | -           | -      |
| Acide gallique                    | 2.06     | -           | -      | 122.26      | 383.20 | -           | -      |
| Acide Gentisique                  | 4.38     | 21.39       | 23.31  | 45.46       | 18.31  | -           | -      |
| Acide cinnamique                  | 15.76    | 137.77      | 213.16 | 66.52       | -      | 94.90       | -      |
| Acide ferullique                  | 11.16    | -           | -      | 9.12        | -      | 27.23       | -      |
| Acide chlorogénique               | 6.01     | -           | -      | -           | -      | 1.72        | 383.20 |
| Rutine                            | 9.52     | 275.24      | 234.43 | 211.25      | 45.95  | 713.44      | 45.95  |
| Catechine                         | 5.23     | 30.99       | 25.67  | 899         | 143.15 | -           | -      |
| Scutellarin                       | 9.66     | 221.77      | 7.96   | -           | -      | -           | -      |
| Quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside | 10.06    | 39.07       | 347.38 | -           | -      | -           | -      |
| Naringine                         | 10.59    | 17.54       | 177.74 | -           | -      | -           | -      |
| Apeginine-7-glucoside             | 8.90     | -           | -      | 11.69       | -      | -           | -      |
| Diosmine                          | 10.95    | 381.42      | 233.97 | -           | -      | -           | -      |
| Hesperidine                       | 10.95    | 0.64        | 2.87   | -           | -      | -           | -      |
| Neohesperidine                    | 11.85    | 38.09       | 11.54  | -           | -      | -           | -      |
| Morine                            | 12.66    | 32.11       | 25.33  | -           | -      | -           | -      |

RT : temps de rétention.



**Figure 23.** Profils chromatographiques de l'E.Met (A) et l'E.Aq (B) de *G. alypum* obtenus par HPLC-TOF-MS.

Les résultats de l'analyse des E.Aq et E.Met de *C. salvifolius* révèlent la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes. Les conditions de séparation utilisées ont permis d'obtenir des chromatogrammes bien résolus (**Figure 24**). Neuf composés phénoliques sont identifiés dans l'E.Aq et E.Met. Les deux extraits possèdent trois acides phénols (l'acide gallique, acide gentisique et acide protocatechuique) en très grande quantité, tandis que l'acide cinnamique et l'acide 4-hydroxy benzoïque et l'acide ferullique ont été détecté seulement dans l'extrait méthanolique. Parmi les flavonoïdes détectés dans les deux extraits il y'a la rutine et la catechine, par contre l'apegenine-7-glucoside n'est détecté que dans l'extrait méthanolique (**Tableau 6**).

L'analyse des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia* révèle la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les deux extraits. Les profils HPLC/TOF-MS apparaissent assez proches (**Figure 25**). L'E.Aq et l'E.Met contiennent l'acide chlorogénique, l'acide *P*-coumarique, tandis que l'acide ferullique, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide cinnamique ne sont détectées que dans l'extrait méthanolique. La rutine est détectée comme étant le flavonoïde majeur et unique des deux extraits aqueux et méthanolique, avec une teneur de 713.44 et 45.95 mg/Kg de plante respectivement (**Tableau 6**).

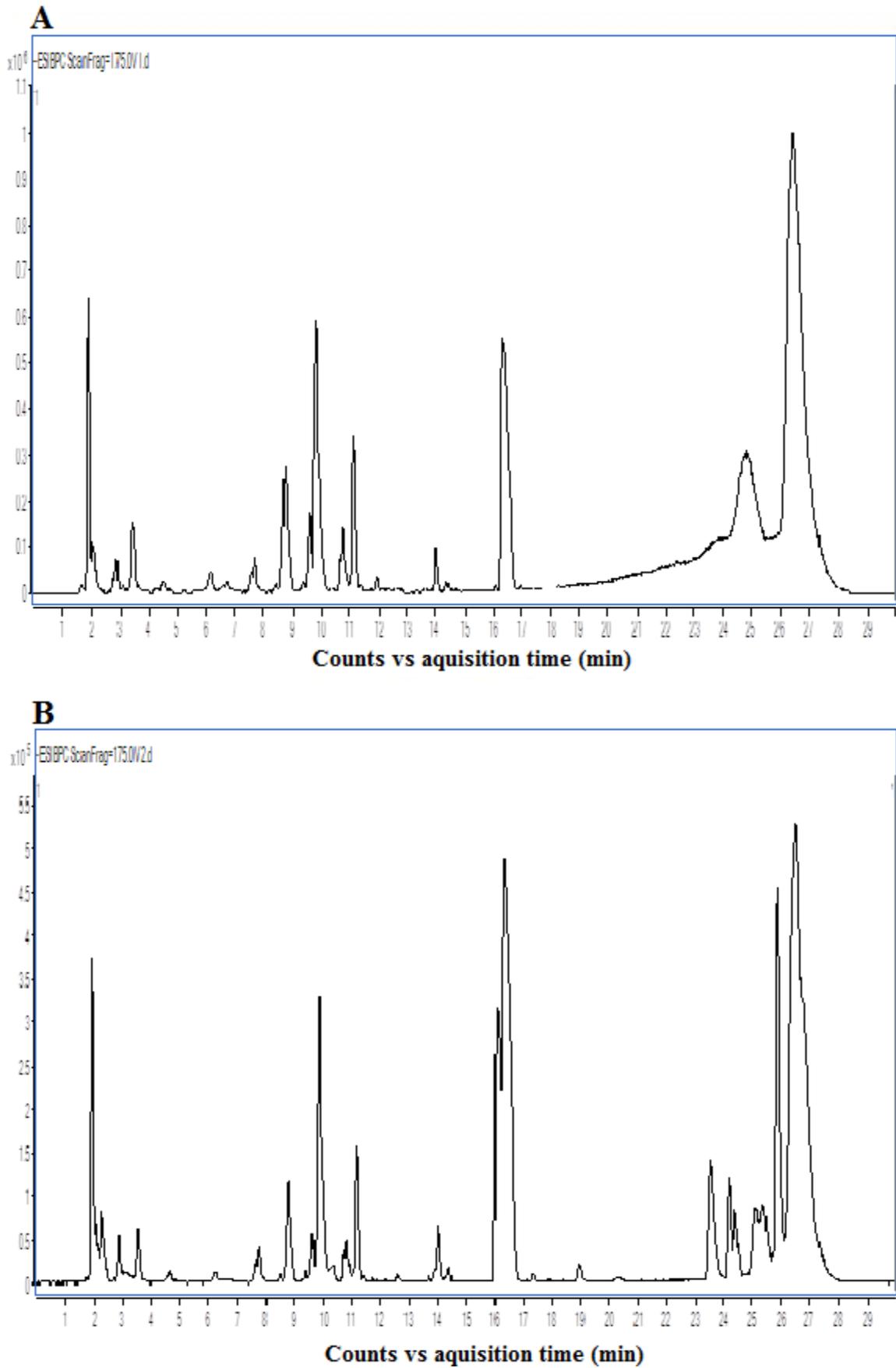
## II. Etude de la toxicité aigue

L'étude de la toxicité aigüe chez des souris a montré que l'administration orale de 2000 mg/Kg des extraits de *H. cheirifolia*, et *G. alypum* ne provoque aucun signe d'intoxication ni de mortalité pendant les 14 jours d'observation. Par contre, après l'administration de l'extrait méthanolique de *C. salvifolius* aux souris, une augmentation régulière des signes d'intoxications et de mortalité (3 souris mortes sur un nombre total de 5) a été observée en relation avec la dose administrée.

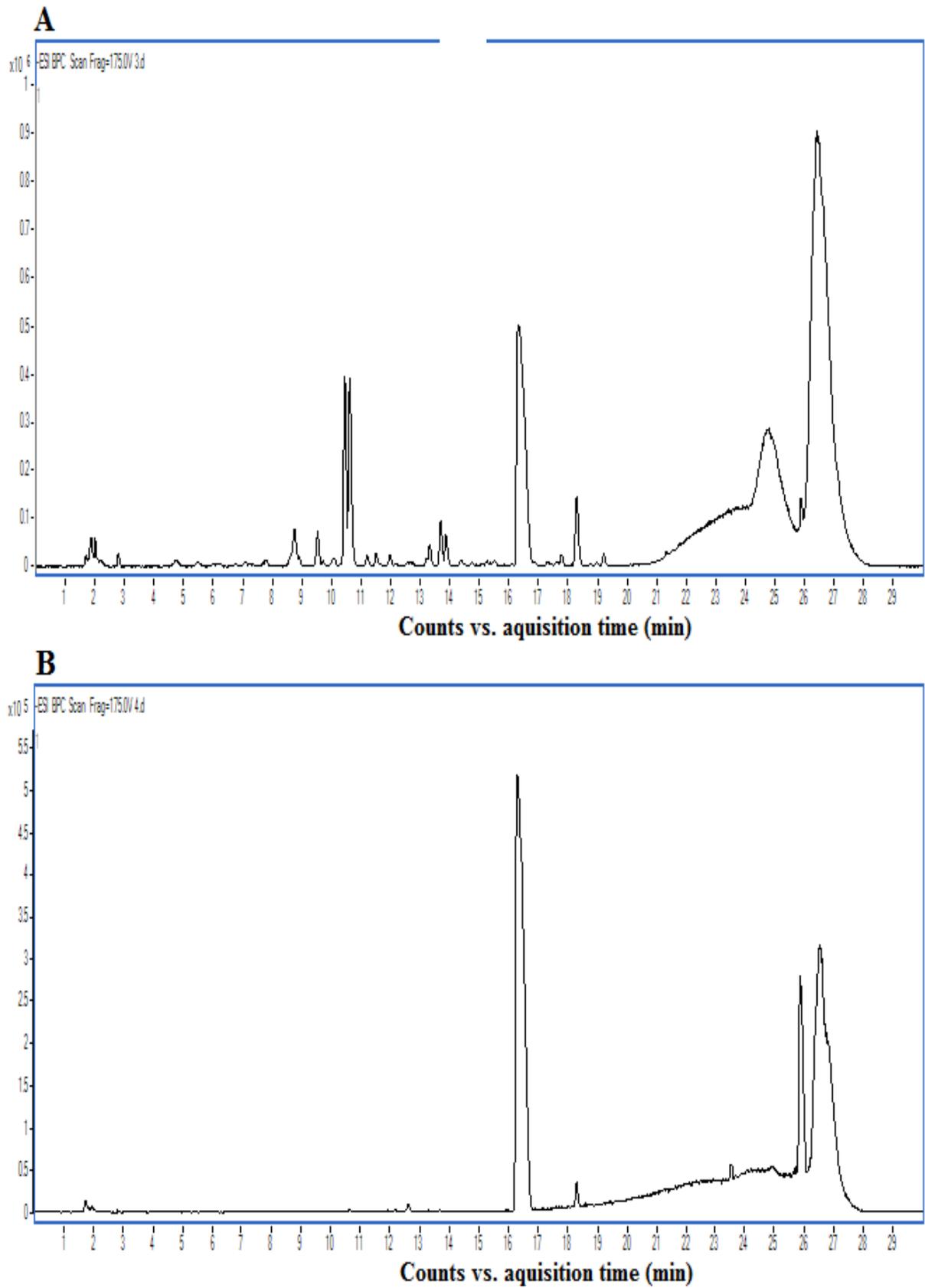
### II.1. Estimation de la DL<sub>50</sub>

Aucun signe de toxicité ni de mortalité n'a été observé avec les extraits de deux plantes (*H. cheirifolia* et *G. alypum*). Par conséquent, les deux extraits de ces plantes semblent être non toxique jusqu'à la dose de 5000 mg/Kg.

Cependant, après quelques minutes de l'administration par voie orale de doses croissantes de *C. salvifolius* (55, 175, 550, 1750 et 2000 mg/kg pc) et surtout pendant les premiers six heures d'observation, un manque d'appétit, des difficultés motrices, une dyspnée



**Figure 24.** Profil chromatographique de l'E.Met (A) et l'E.Aq (B) de *C. salvifolius* obtenu par HPLC-TOF-MS.



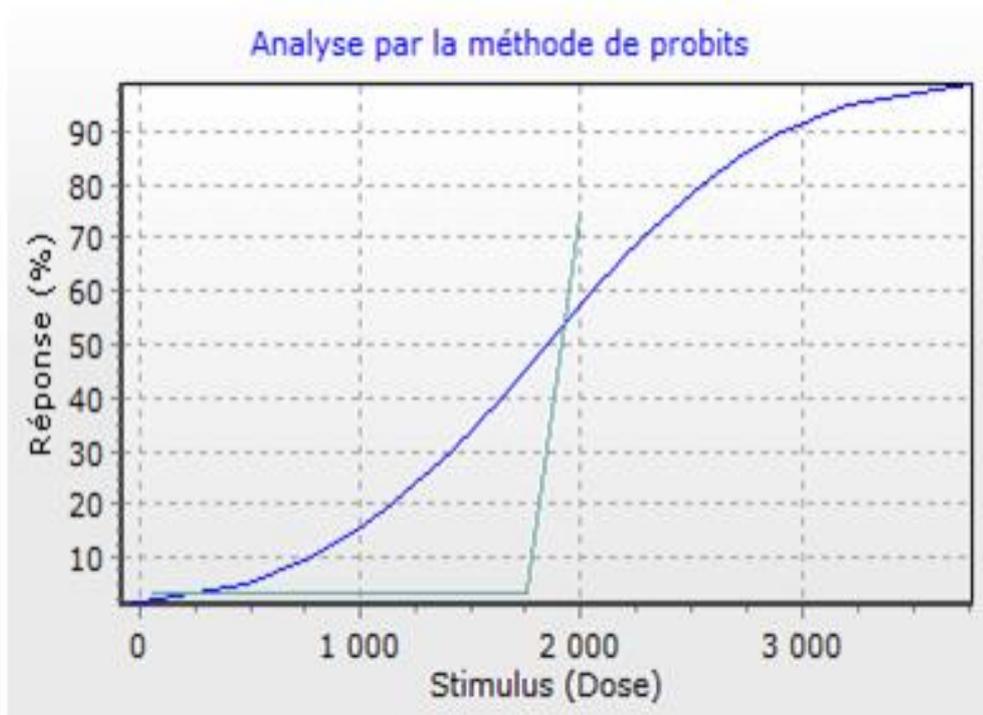
**Figure 25.** Profil chromatographique de l'E.Met (A) et l'E.Aq (B) de *H. cheirifolia* obtenu par HPLC-TOF-MS.

ainsi qu'un taux de mortalité ont été notés avec la dose 2000 mg/kg pc, mais des signes plus ou moins grave tels que l'isolement, la perte d'appétit et une faible activité ont été observés avec les autres doses. Les signes observés ont disparus vers le 2<sup>ème</sup> jour et non pas été reconstatés pendant les 12 jours restants. La dose de 2000 mg/kg pc a provoqué la mort de 6 souris sur 8 souris. Après 5-6 h d'administration de l'extrait, deux souris femelles sont mortes suite à des signes graves d'intoxication (respiration presque coupée, perte d'équilibre, contractions musculaires, une paralysie partielle). Trois jours après, la mort de 3 autres souris mâles a été enregistrée. Après neuf jours, une troisième femelle est morte. Le pourcentage de mortalité est de 75% pour la dose de 2000 mg/kg (**Tableau 7**).

**Tableau 7.** Taux de mortalité des souris traitées par l'E.Met de *C. salvifolius*

| Lots constitués         | Taux de mortalité par lot |         |         |         |         |         |
|-------------------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                         | 1                         | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       |
| Substance gavées        | eau                       | extrait | extrait | extrait | extrait | extrait |
| Dose (mg/kg) PC         | 0.5 ml/25g                | 55      | 175     | 550     | 1750    | 2000    |
| Nombre de souris        | 8                         | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       |
| Nombre de souris mortes | 0                         | 0       | 0       | 0       | 0       | 6       |
| Mortalités (%)          | 0                         | 0       | 0       | 0       | 0       | 75      |

La  $DL_{50}$  de *C. salvifolius* déterminé par la méthode de probits-méthode des moindres carrés, est de l'ordre de  $1845.55 \pm 41.37$  mg/kg, elle est représentée dans la courbe dose/réponse (**Figure 26**). La valeur de la plus faible concentration létale (LCL) est de 867.14 mg/kg et celle de la plus forte concentration létale (UCL) est de 2823.96 mg/kg (**Tableau 8**). D'après la classification de **Diezi (1989)**, l'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius* est faiblement toxique car la  $DL_{50}$  est incluse entre  $500 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 5000 \text{ mg/kg}$ .



**Figure 26.** Courbe dose-réponse chez les souris traitées par l'extrait méthanolique de *C. salvifolius*

**Tableau 8.** Détermination des différentes doses létales (DL) de l'E.Met de *C. salvifolius* chez les souris par la méthode de probits des moindres carrés (distribution normale).

| DL     | Dose (mg/kg) |
|--------|--------------|
| DL 10  | 784.86       |
| DL 15  | 1018.01      |
| DL 50  | 1845.55      |
| DL 85  | 2673.09      |
| DL 90  | 2906.23      |
| DL 100 | 3086.86      |

## II.2. Evolution pondérale

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience de la toxicité aiguë par l'extrait méthanolique de *C. salvifolius* (**Figure 27**), n'a démontré aucun changement significatif durant les 14 jours du traitement dans tous les groupes par rapport au témoin.

L'examen macroscopique des différents organes prélevés, a montré que la taille et la forme sont normales, par contre une certaine augmentation non significative dans la masse relative des reins et de l'estomac et une diminution de la masse relative du foie et de la rate chez les deux sexes traités par rapport aux témoins ont été enregistrés (**Figure 28**).

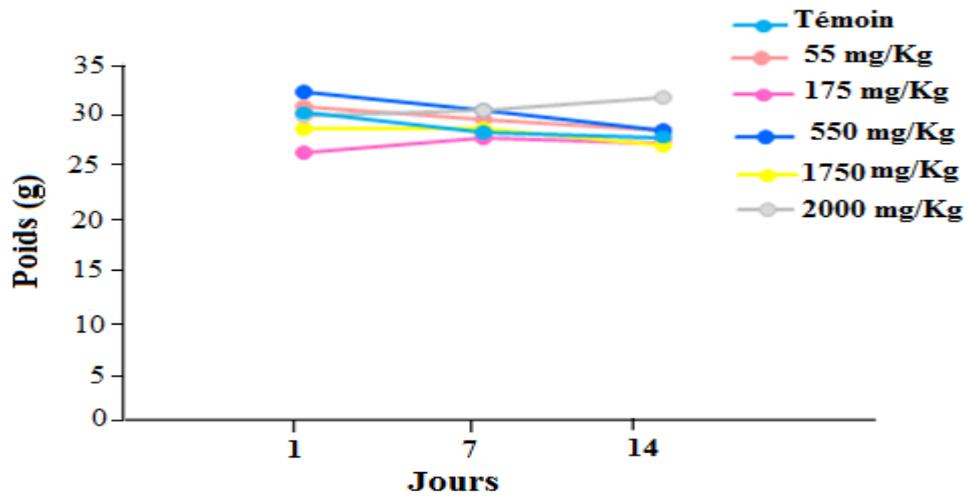


Figure 27. Evolution pondérale des souris durant les 14 jours de toxicité aigüe.

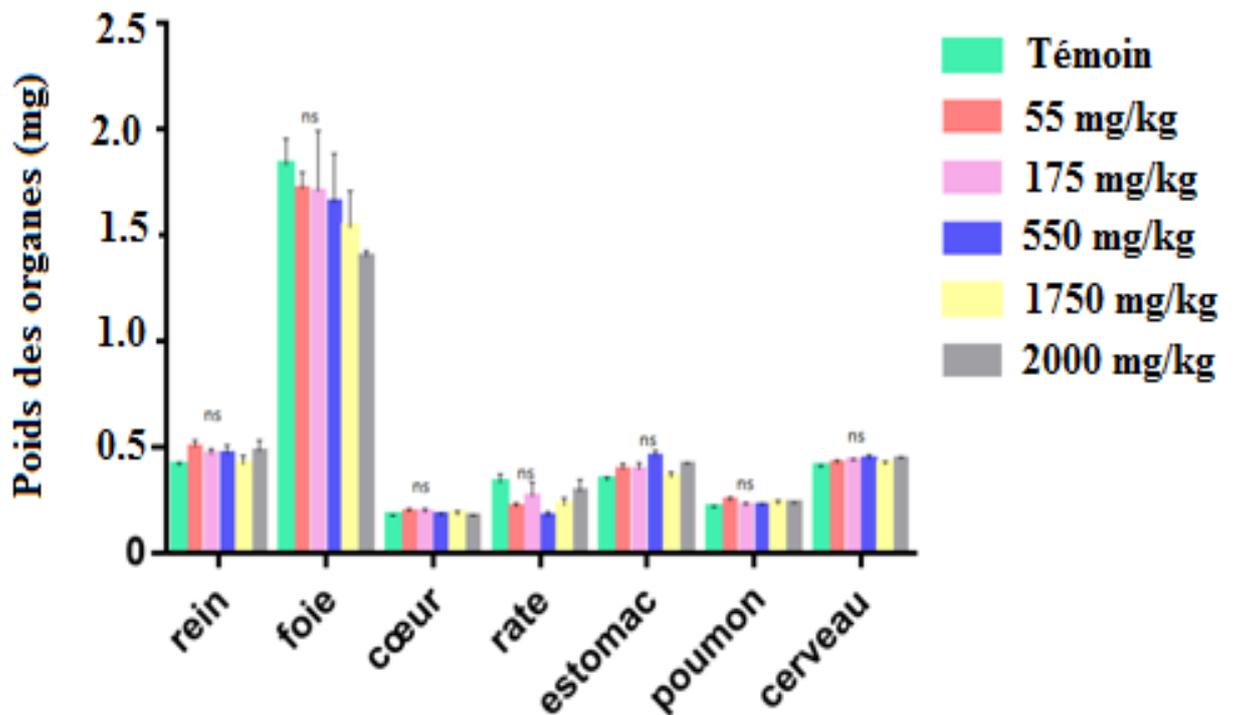


Figure 28. Masses relatives des organes des souris traités avec différentes doses d'E.Met de *C. salvifolius*. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 8).

### II.3. Effets de l'extrait méthanolique de *C. salvifolius* sur quelques paramètres biochimiques

Les souris traitées par différentes doses de l'E.Met de *C. salvifolius* ne manifestent aucun changement significatif des paramètres sériques pendant les 14 jours de traitement (**Tableau 9**).

**Tableau 9.** Effet de l'extrait méthanolique de *C. salvifolius* sur quelques paramètres biochimiques des souris.

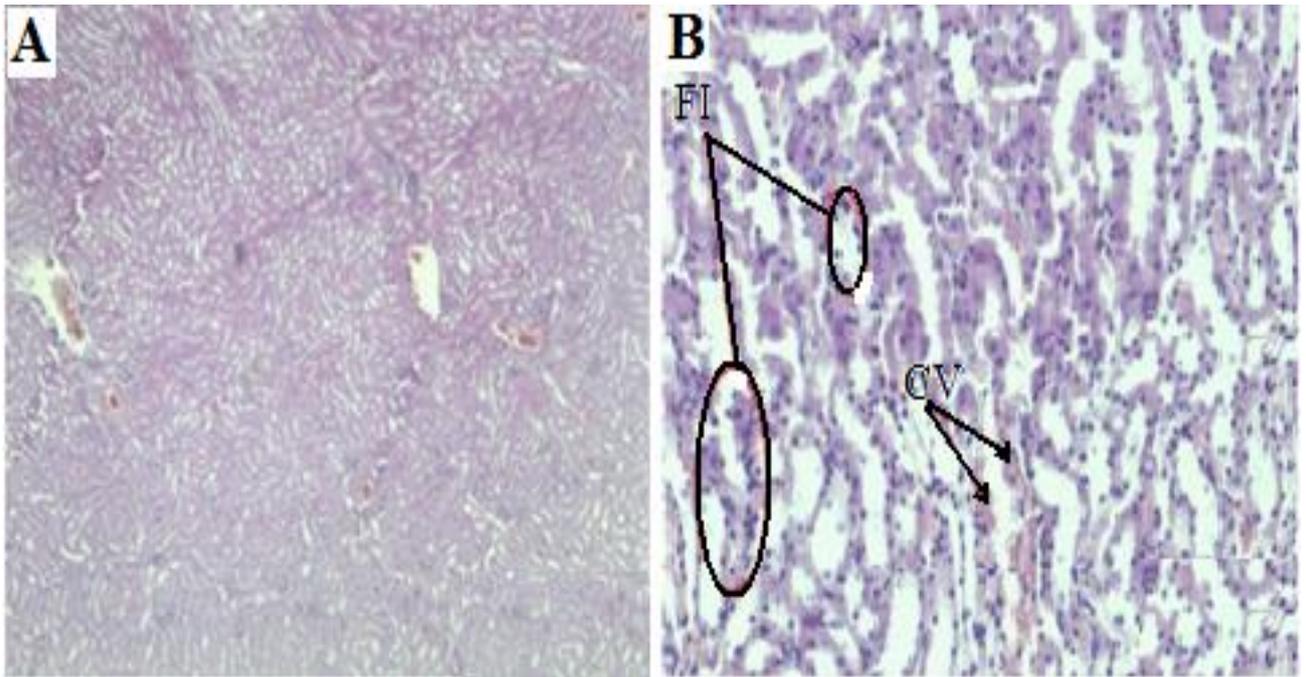
| Paramètres    | Témoin       | 55 mg/kg     | 175 mg/kg   | 550 mg/kg   | 1750 mg/kg | 2000 mg/kg |
|---------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Cholestérol   | 0.86 ± 0.05  | 0.85 ± 0.04  | 0.92 ± 0.04 | 0.93 ± 0.04 | 0.8 ± 0.06 | 0.9±0.05   |
| Triglycérides | 0.84 ± 0.07  | 0.75±0.05    | 0.84±0.07   | 0.92±0.03   | 0.8±0.05   | 0.6±0.03   |
| PAL           | 91.14 ± 9.56 | 83.42±12.58  | 80.14±18.03 | 94±6.07     | 96.5±18.5  | 85.5±9.25  |
| ASAT          | 153.83±12.1  | 154.66 ±2.35 | 156±17.56   | 162.4±8.98  | 165.6±14   | 230.5±35.7 |
| ALAT          | 53.83±6.21   | 57.83±65     | 60±1.04     | 50.87±3.96  | 49±2.20    | 64±10.5    |
| Creatinine    | 3.03±0.07    | 2.65±0.06    | 3.02±0.08   | 2.89±0.13   | 2.9±0.08   | 3.07±0.11  |
| Glucose       | 1.29±0.07    | 1.06±0.01    | 1.27±0.12   | 1.40±0.03   | 1.3±0.08   | 1.40±0.02  |

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=8). PAL, phosphatase alcaline ; ASAT, Aspartate transaminase ; ALAT, Alanine amino transférase

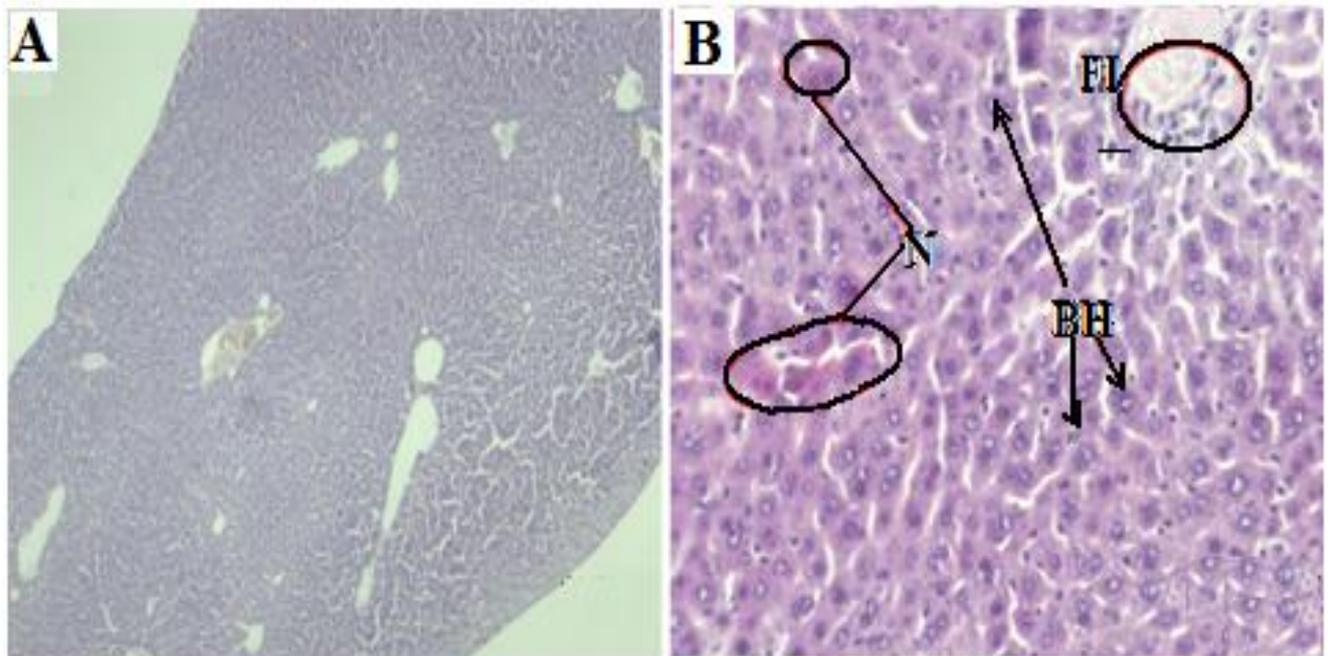
### II.4. Effets de l'extrait méthanolique de *C. salvifolius* sur l'histologie du rein et du foie

Les coupes histologiques du rein n'ont pas montré de modifications de la structure par rapport au groupe témoin. Cependant, une congestion vasculaire plus au moins importante autour des vaisseaux de certaines souris traitées avec la dose 2000 mg/kg de *C. salvifolius* et un infiltrat inflammatoire entre les tubes rénaux ont été observées (**Figure 29**).

Toutefois, l'observation histologique du foie des souris traitées avec les doses 175, 550, 1750 et 2000 mg/kg a montré la présence d'infiltrats inflammatoires surtout avec la dose 2000 mg/kg. Les coupes des souris traitées avec les doses 550, 1750 et 2000 mg/kg ont montré une péliose au niveau des vaisseaux sanguins et les hépatocytes ont augmentés de taille et leur cytoplasme est clarifié, considérés comme en voie de destruction (**Figure 30**).



**Figure 29.** Photomicrographies du rein des souris. (A) témoin, (B) traitée avec 2000 mg/kg, (FI) filtrat inflammatoire, (CV) congestion vasculaire.



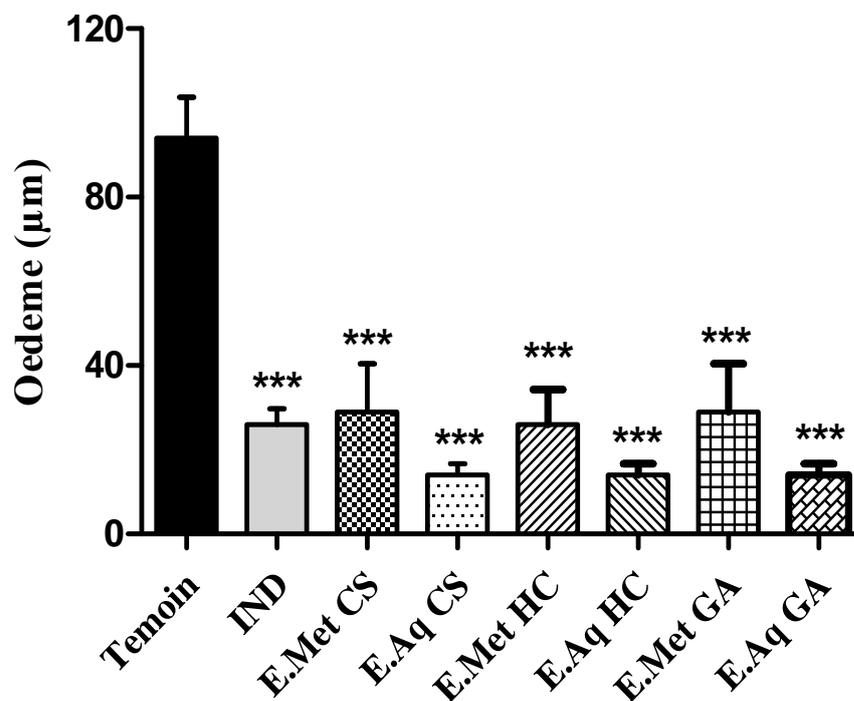
**Figure 30.** Photomicrographies d'une coupe du foie des souris. (A) témoin, (B) traitée par 2000 mg/kg, (BH) balonisation des hépatocytes, (FI) filtrat inflammatoire, (N) nécrose.

### III. Activité anti-inflammatoire

#### III.1. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

##### III.1.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

Les souris du groupe témoin ont développé au bout de 6 heures un œdème d'oreille de 90  $\mu\text{m}$ . Le traitement par 2 mg/oreille des de *H. cheirifolia*, *C. salvifolius* et *G. alypum* a induit une atténuation très significative, avec une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$  seulement. Les taux d'inhibition exercés par ces extraits des 3 plantes sont très proches (78.7%, 77% et 79% respectivement). De même, Les extraits aqueux de ces mêmes trois plantes ont exercé des inhibitions similaires. Ces pourcentages d'inhibitions sont supérieurs à celui obtenu avec l'indométacine (72%) utilisé comme anti-inflammatoire de référence (**Figure 31**).



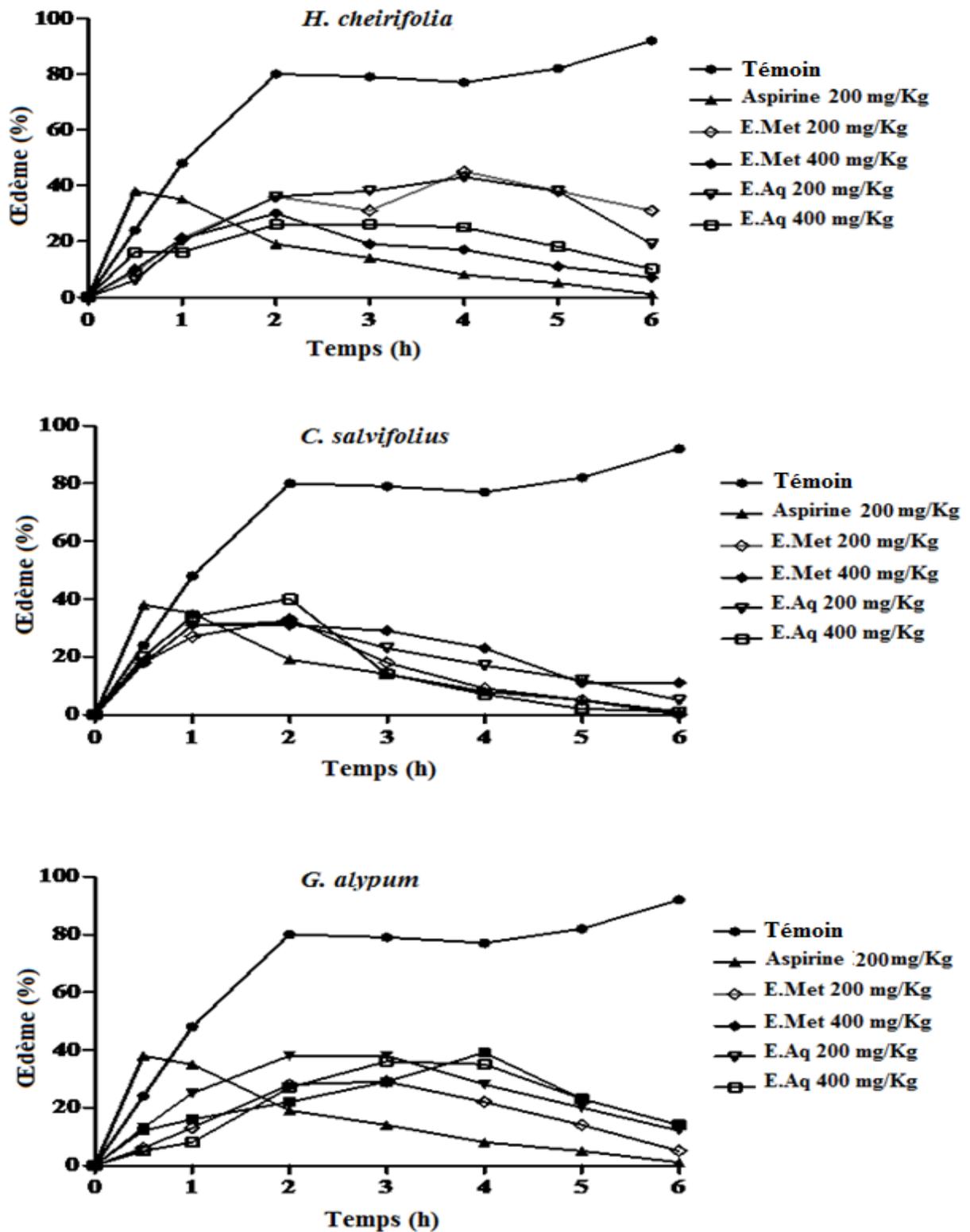
**Figure 31.** Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *H. cheirifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA) sur l'œdème de l'oreille. L'œdème est induit par application topique de 80  $\mu\text{g}$  de l'huile de croton. Les souris sont traitées par 2 mg/oreille d'E.Aq ou E.Met ou par 0.5 mg/oreille d'indométacine (IND). L'épaisseur de l'oreille est mesurée 6 heures après l'induction de l'œdème. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n=8). \*\*\* :  $p < 0.001$  vs témoin.

### I.1.2. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat

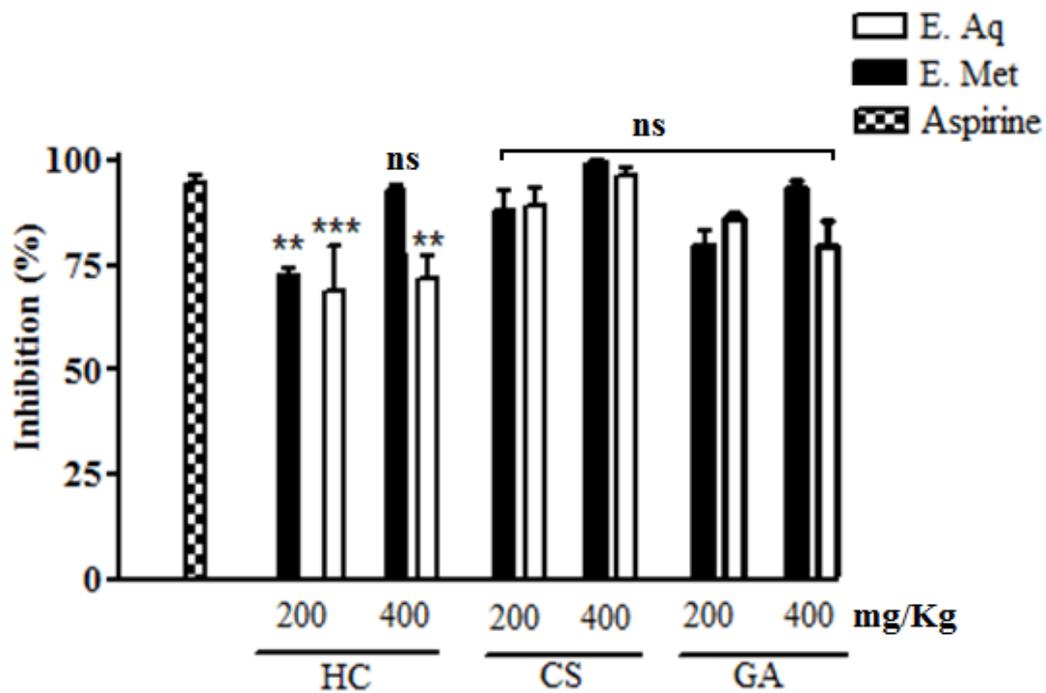
L'injection sous-plantaire de la carragénine a provoqué un œdème dont le maximum du volume après 4 heures l'induction de l'inflammation est de  $1.05 \pm 0.30$  ml, soit un taux d'œdème de 77 % (**Figure 32**). Les deux extraits de *H. cheirifolia* ont exercé des effets anti-œdémateux d'une manière dose-indépendante. En effet, le prétraitement des rats par l'E.Aq de *H. cheirifolia* aux doses de 200 et 400 mg/kg prévient de façon significative l'œdème avec 29% et 56% d'inhibition successivement, tandis que l'E.Met a diminué l'œdème avec des taux d'inhibition de 30% et 74% respectivement. Le prétraitement des rats par les mêmes doses de l'E.Aq et l'E.Met de *C. salvifolius* prévient de façon significative l'œdème. Après 4 heures, les inhibitions exercées par l'E.Aq sont de 73% et 91% successivement et celles exercées par l'E.Met sont de 67% et 86% respectivement elles préviennent de façon significative ( $p < 0.01$ ) la formation de l'œdème. A 4 heures, les taux d'inhibition obtenus avec 200 et 400 mg/kg de l'E.Aq de *G. alypum* sont de 44% et 59% successivement et de 60% et 67% avec l'E.Met (**Figure 33**). L'aspirine (100 mg/kg) utilisée comme anti-inflammatoire de référence, a montré une inhibition très élevée (87%).

### III.1.3. Effet des extraits sur la poche d'air

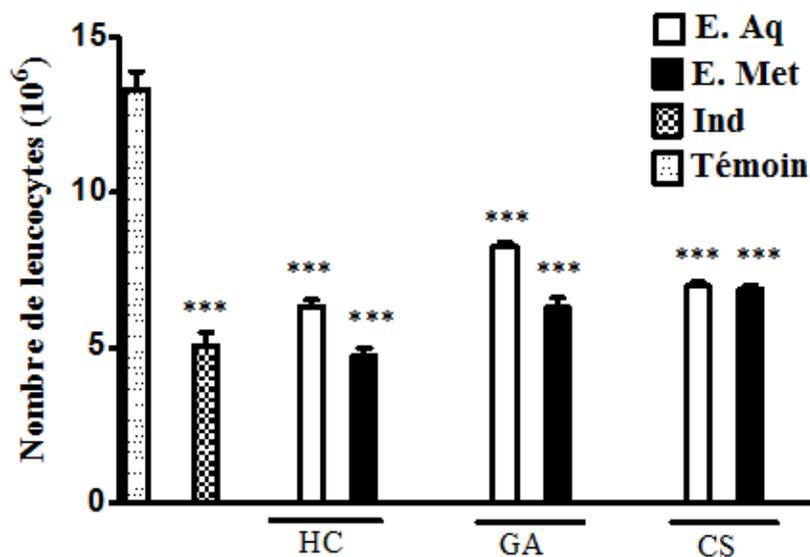
Quatre heures après l'injection de 0.1 ml de  $\lambda$ -carragénine dans la poche d'air, les souris du groupe témoin ont développés une inflammation aiguë caractérisée par une infiltration de  $12.8 \pm 0.94 \times 10^6$  leucocytes/ml dans l'exsudat. Le traitement avec 1 mg/poche d'E.Met ou E.Aq des trois plantes, réduit significativement le nombre de leucocytes infiltrés. Le meilleur taux de réduction est celui obtenu avec l'E.Met et l'E.Aq de *H.cheirifolia* (64.63% et 52.77% respectivement) suivis par l'E.Met de *G. alypum* (52.47%), l'E.Met de *C. salvifolius* (48.42%), l'E.Aq de *C. salvifolius* (45.54%) et finalement l'E.Aq de *G.alypum* (38.21). L'inhibition exercée par l'E.Met de *H.cheirifolia* est meilleure de celle obtenue avec 0.1 mg/poche d'indométacine (61.93%) (**Figure 34**).



**Figure 32.** Effets des extraits aqueux (E. Aq) et méthanoliques (E. Met) des feuilles de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius* 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 l'aspirine (200 mg/kg), les E. Aq ou les E. Met (200 et 400 mg/kg). Les rats du groupe témoin sont injectés par la carragénine et non traités. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n=7).



**Figure 33.** Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (CS) sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. L'œdème a été induit après le traitement oral des rats par 200 ou 400 mg/kg d'E. Aq ou l'E. Met, ou par 200 mg/kg d'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 vs témoin.



**Figure 34.** Effet des extraits aqueux (E.Aq) et des extraits méthanolique (E.Met) de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* CS sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air. L'inflammation est induite par l'injection de 0.1 ml de  $\lambda$ -carrageenan (1%) dans la poche d'air. Une heure avant l'induction de l'inflammation, les souris sont traitées par 1 mg/poche d'extraits ou 0.1 mg/poche d'indométacine (Ind). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 7). \*\*\* :  $p < 0.001$  vs témoin.

### III.1.4. Granulome au pellet de coton

Les résultats obtenus montrent que le traitement par 200 mg/kg d'extraits aqueux ou méthanoliques pendant 7 jours a inhibé de manière significative la formation du granulome au niveau des pellets de coton implantés (**Tableau 10**). En effet, à 200 mg/kg, l'E.Met de *H. cheirifolia* et l'E.Aq de *C. salvifolius* ont entraîné une réduction maximale de la formation du tissu granulomateux avec une inhibition du poids sec de 41.85% et 39% respectivement. Cette inhibition était meilleure que celle obtenue avec 2.5 mg/kg de dexaméthasone (36.36 %) suivis dans l'ordre de E.Met de *C. salvifolius* (35%), l'E.Aq de *G. alypum* (29.40%), l'E.Aq de *H. cheirifolia* (22.48%) et finalement l'E.Aq de *G. alypum* (17.45%). Le poids humide du tissu granulomateux a été réduit de 61.55% et 57% par l'E.Met de *H. cheirifolia* et l'E.Met de *C. salvifolius* respectivement. Cette inhibition est supérieure à celle obtenue par la dexaméthasone (52.70%). L'E.Aq de *G. alypum* a exercé 40.60% suivi dans l'ordre de l'E.Aq de *H. cheirifolia* (28.86%), l'E.Aq de *C. salvifolius* (23%) et finalement l'E.Met de *G. alypum* (11.83%).

**Tableau 10.** Effet des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius* sur la formation du granulome induit par les pelletes en coton chez le rat.

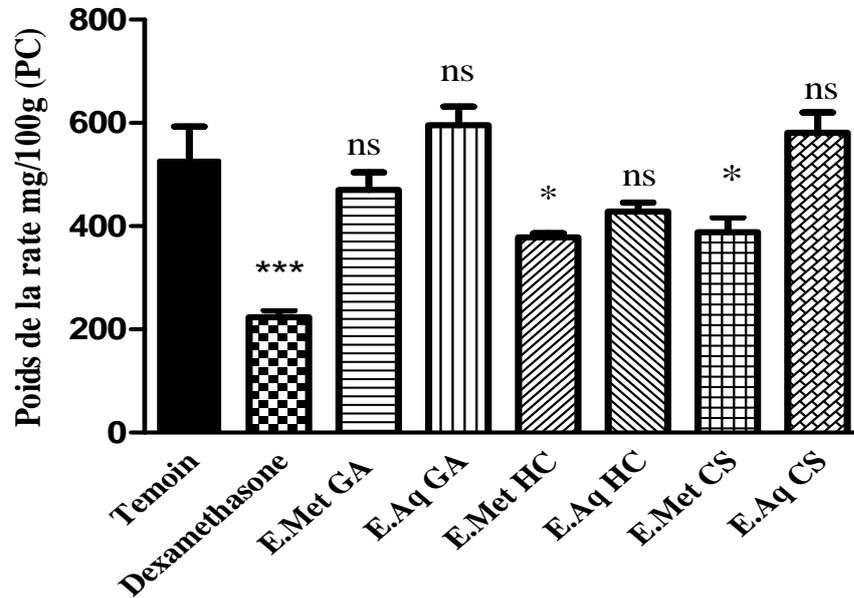
| Groupes       | Poids humide du granulome (mg) | % Inhibition | Poids sec du granulome (mg) | % Inhibition |
|---------------|--------------------------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| Témion        | 94.05 ± 11.96                  | -            | 26.59 ± 6.375               | -            |
| Dexamethasone | 44.48 ± 9.173 **               | 52.70        | 16.92 ± 3.53                | 36.36        |
| E. Met de HC  | 36.16 ± 4.88                   | 61.55        | 15.46 ± 2.76                | 41.85        |
| E .Aq de HC   | 66.90 ± 6.19                   | 28.86        | 20. 61 ± 0.75               | 22.48        |
| E. Met de CS  | 59.9 ± 4.15*                   | 57           | 17.27 ± 1.90                | 35           |
| E .Aq de CS   | 72.35 ± 1.27                   | 23           | 16.20 ± 1.59                | 39           |
| E. Met GA     | 82.92 ± 2.33                   | 11.83        | 21.95 ± 1.76                | 17.45        |
| E .Aq de GA   | 55.85 ± 5.44*                  | 40.61        | 18.71 ± 1.77                | 29.63        |

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM. (n = 6). \* $P < 0.05$  vs. le témoin.

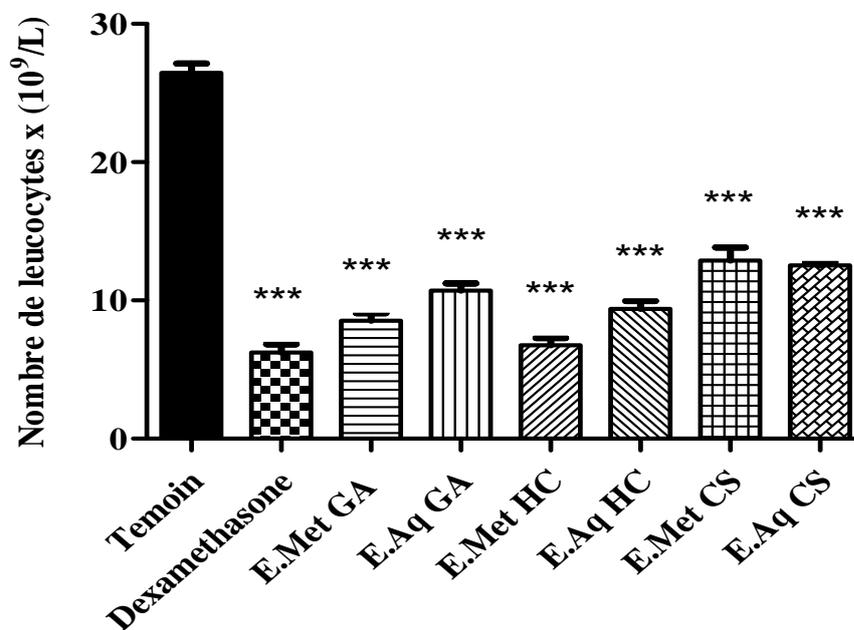
Durant l'inflammation le poids de la rate a augmenté dans le groupe témoin. Tous les extraits à 200 mg/kg excepté l'E.Aq de *G. alypum* et de *C. salvifolius* ont produit une atténuation dans le poids de la rate (**Figure 35**).

En outre, les résultats montrent que les extraits ont un effet sur le nombre des globules blancs. Une augmentation maximale du nombre des globules blancs dans le groupe témoin au 7<sup>ème</sup> jour par rapport aux animaux sains. L'anti-inflammatoire standard (dexaméthasone) et les extraits méthanoliques et aqueux de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius* à 200 mg/kg

diminuent significativement la migration des globules blancs vers le site enflammé (Figure 36).



**Figure 35.** Effet des extraits aqueux (E.Aq) et des extraits méthanoliques (E.Met) de *H. cheirifolia*, *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (CS) sur le poids de la rate/100g poids corporel (PC) durant les huit jours de traitement. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6), \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  vs témoin.



**Figure 36.** Effet des extraits aqueux (E.Aq) et des extraits méthanoliques (E.Met) de *H. cheirifolia* (HC), *G. alypum* (GA) et *C. salvifolius* (SC) sur le nombre total des globules blancs durant les huit jours de traitement. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6):\*\*\*  $p < 0.001$  vs témoin.

### III.1.5. Activité cicatrisante

Le traitement avec les E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius* a permis d'obtenir une guérison presque complète des plaies au bout de 15 jours de traitement. Les superficies des plaies mesurées aux jours 3, 6, 9, 12 et 15 après l'excision dans tous les groupes traités par les pommades préparées à base d'extraits étaient inférieures à celles du témoin (Tableau 11). L'E.Met et l'E.Aq de *G. alypum* et *C. salvifolius* ont montré un effet cicatrisant de plus de 50% au bout de 6<sup>ème</sup> jour. Cet effet est meilleur que celui de la Mycocide. L'effet de cicatrisation des mêmes extraits a augmenté au 9<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour pour atteindre 80% et 90% respectivement. Au dernier jour (15<sup>ème</sup> Jour), une cicatrisation complète a été obtenue avec tous les extraits et une réapparition des poils a été remarquée au niveau des cicatrices.

**Tableau 11.** Effet cicatrisant des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA).

| Groupe             | Zone des plaies (mm <sup>2</sup> ) et le pourcentage de contraction de la plaie |                            |                          |                         |                         |                        |
|--------------------|---|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
|                    | J1  | J3                         | J6                       | J9                      | J12                     | J15                    |
| <b>Témoin</b>      | 254.58±0.82   | 234.64±5.79<br>(8.23%)     | 201.90±5.53<br>(20.68%)  | 145.84±6.73<br>(42.70%) | 80.42±2.52<br>(68.41%)  | 57.08±2.52<br>(77.56%) |
| <b>Mycocide</b>    | 242.14±12.92  | 186.39 ± 15.22<br>(23.28%) | 171.31±13.16<br>(29.41%) | 50.78±7.19<br>(79.23%)  | 42.33±5.04<br>(82.29%)  | 21.43±3.76<br>(91.06%) |
| <b>E.Met de HC</b> | 240.21±9.31   | 182.73±16.20<br>(23.89%)   | 133.73±9.61<br>(44.10%)  | 52.95±6.53<br>(78.14%)  | 28.07±2.22<br>(88.31%)  | 13.32±1.28<br>(94.55%) |
| <b>E.Aq HC</b>     | 247.59±7.33   | 199.63±20.47<br>(20.05%)   | 153.68±18.56<br>(38.30%) | 83.69±14.64<br>(66.65%) | 58.12±12.86<br>(76.76%) | 29.94±4.73<br>(87.90%) |
| <b>E.Met de CS</b> | 235.49±9.21   | 184.78±9.21<br>(22.13%)    | 107.06±13.52<br>(54.57%) | 43.70±2.63<br>(81.34%)  | 22.42±3.82<br>(90.59%)  | 9.59±0.47<br>(95.88%)  |
| <b>E.Aq de CS</b>  | 245.36±9.38   | 174.21±19.11<br>(29.00%)   | 116.87±19.13<br>(52.22%) | 70.90±12.60<br>(70.92%) | 36.02±4.36<br>(85.14%)  | 7.33±1.89<br>(96.76%)  |
| <b>E.Met de GA</b> | 251.22±7.08   | 232.71±14.02<br>(7.72%)    | 122.38±26.10<br>(54.01%) | 55.23±8.91<br>(80.22%)  | 28.93±3.82<br>(89.67%)  | 10.79±1.08<br>(95.56%) |
| <b>E.Aq de GA</b>  | 234.39±10.06  | 209.55±11.55<br>(10.72%)   | 93.74±10.09<br>(59.59%)  | 44.67±8.50<br>(80.91%)  | 18.70±5.69<br>(92.13%)  | 9.22±3.45<br>(95.91%)  |

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=8).

### III.1.6. Activité analgésique

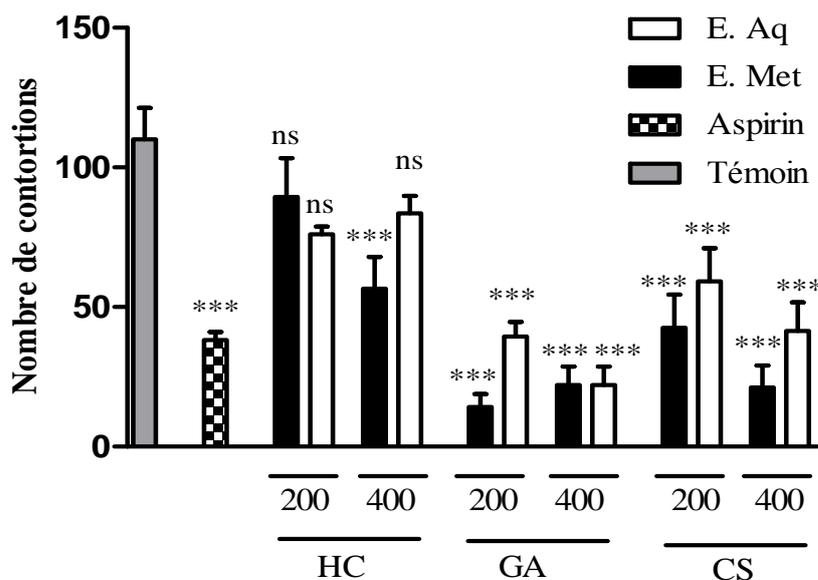
#### III.1.6.1. Effet sur la douleur induite par l'acide acétique

Les résultats présentés dans la figure 37 montrent que l'administration de 200 et 400 mg/kg des extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes et 100 mg/kg d'aspirine ont

exercés un effet protecteur vis-à-vis la douleur provoquée par l'acide acétique. Le puissant effet inhibiteur des contractions abdominales est enregistré avec les E.Met des trois plantes à la dose plus élevée (400 mg/kg). Le meilleur effet inhibiteur enregistré est celui de l'E.Met de *G. alypum* (87%) à 400 mg/kg suivi dans l'ordre par l'E.Met de *C. salvifolius* 80%. l'E.Met de *G. alypum* à 200 mg/kg exerce aussi un effet puissant de 80%. Ces effets sont meilleurs que celui de 100 mg/Kg de l'aspirine (65.67%). Cependant, l'E.Met de *H. cheirifolia* à 200 mg/kg exerce un très faible effet (18%) (**Tableau 12**).

### III.1.6.2. Effet sur la douleur induite par le formaldéhyde

La Figure 38 montre que la douleur induite par le formaldéhyde est inhibée par les extraits méthanoliques et aqueux de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius* et la morphine. Dans la première phase (0-5 min), l'injection du formaldéhyde témoin produit une réponse analgésique caractérisée par de morsure et de léchage de la patte injectée avec une durée totale de  $123 \pm 7$  secondes. L'administration de 200 et 400 mg/kg des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia*, et *C. salvifolius* a produit une inhibition dose-dépendante de la réaction analgésique avec effet de pic à la dose la plus élevée (400 mg/kg) de l'E.Met de *H. cheirifolia* (80%). Cependant, à la même dose, les E.Met et E.Aq de *G. alypum* ont présentés une inhibition faible. Cet effet est nettement inférieur à celui exercé par 5 mg/kg pc de morphine qui présente 95,4% d'inhibition. Dans la deuxième phase (15-30 min), la durée totale de la réaction analgésique dans le groupe témoin était de  $172 \pm 9$  secondes. L'effet de la morphine (97.90 %) est significativement similaire à celui obtenu avec de la dose la plus efficace des extraits de *H. cheirifolia* et *G. alypum*.

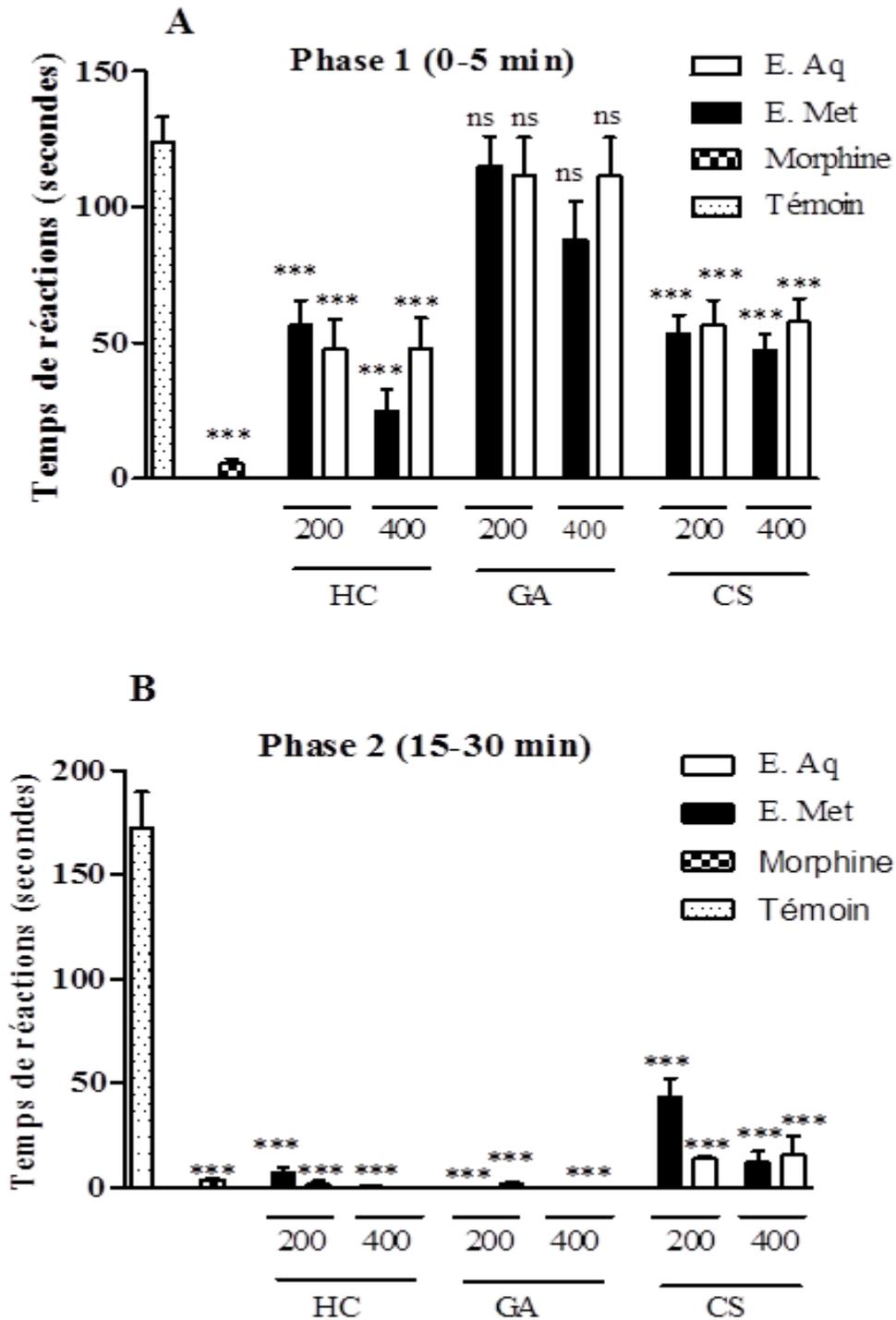


**Figure 37.** Effet de l'extrait aqueux (E.Aq) et l'extrait méthanolique (E.Met) de *H. cherifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA) sur le nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique. La douleur est induite par injection intra-péritonéale de 100 µl d'acide acétique (0.6%). Une heure avant l'injection d'acide acétique, les souris sont traitées par 200 ou 400 mg/Kg d'extraits ou 100 mg/kg d'aspirine. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 6). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs témoin.

**Tableau 12.** Effet des E. Met et E .Aq de *H. cherifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA) et l'aspirine sur les contorsions induites par l'acide acétique chez la souris.

| Traitement   | Dose (mg/Kg) | Nombres de contortions      | Inhibition (%) |
|--------------|--------------|-----------------------------|----------------|
| Témoin       | -            | 110 ± 11.36                 | -              |
| E.Aq de HC   | 200          | 83.6 ± 6.2 <sup>ns</sup>    | 24             |
|              | 400          | 76.0 ± 2.81 <sup>ns</sup>   | 30.90          |
| E. Met de HC | 200          | 89.4 ± 3.89 <sup>ns</sup>   | 18.72          |
|              | 400          | 56.6 ± 1.35 <sup>***</sup>  | 48.54          |
| E. Aq de GA  | 200          | 44.8 ± 6.88 <sup>***</sup>  | 59.27          |
|              | 400          | 39.4 ± 5.29 <sup>***</sup>  | 64.18          |
| E. Met de GA | 200          | 22 ± 6.73 <sup>***</sup>    | 80             |
|              | 400          | 14.2 ± 3.36 <sup>***</sup>  | 87.09          |
| E. Aq de CS  | 200          | 59.2 ± 1.86 <sup>***</sup>  | 46.18          |
|              | 400          | 41.4 ± 5.30 <sup>***</sup>  | 62.36          |
| E. Met de CS | 200          | 42.6 ± 1.26 <sup>***</sup>  | 61.27          |
|              | 400          | 21.2 ± 7.26 <sup>***</sup>  | 80.72          |
| Aspirine     | 100          | 38.2 ± 2±.90 <sup>***</sup> | 65.27          |

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n=6). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$



**Figure 38.** Effet analgésique des extraits aqueux (E.Aq) et des extraits méthanolique (E.Met) de *H. cherifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA) sur le temps de réaction de la douleur induite par le formaldéhyde. **A** : phase 1 (0-5 min), **B** : phase 2 (15-30 min). La douleur est induite par l'injection de 20 µl de formaldéhyde (2.5%) dans la patte postérieure droite. Une heure avant l'injection de la solution de formaldéhyde, les souris sont traitées par 200 ou 400 mg/kg d'extraits ou 5 mg/kg de morphine. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6). \*\*\* : p < 0.001 vs témoin.

## III.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

### III.2.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains

Les résultats obtenus montrent que les extraits des trois plantes étudiées à une concentration de 3 mg/ml protègent les érythrocytes humains contre l'hémolyse. Tous les extraits inhibent la lyse de la membrane érythrocytaire induite par la solution hypotonique avec des pourcentages d'inhibition entre 15 et 96 %. L'E.Met de *C. salvifolius* a donné le taux d'inhibition de l'hémolyse le plus élevé (96 %) contre 37.92% exercé par 0.1 mg/ml l'aspirine, tandis que le taux d'inhibition le plus faible (15.16 %) est observée avec 1mg/ml de l'extrait aqueux de *H. cherifolia* (Figure 39).

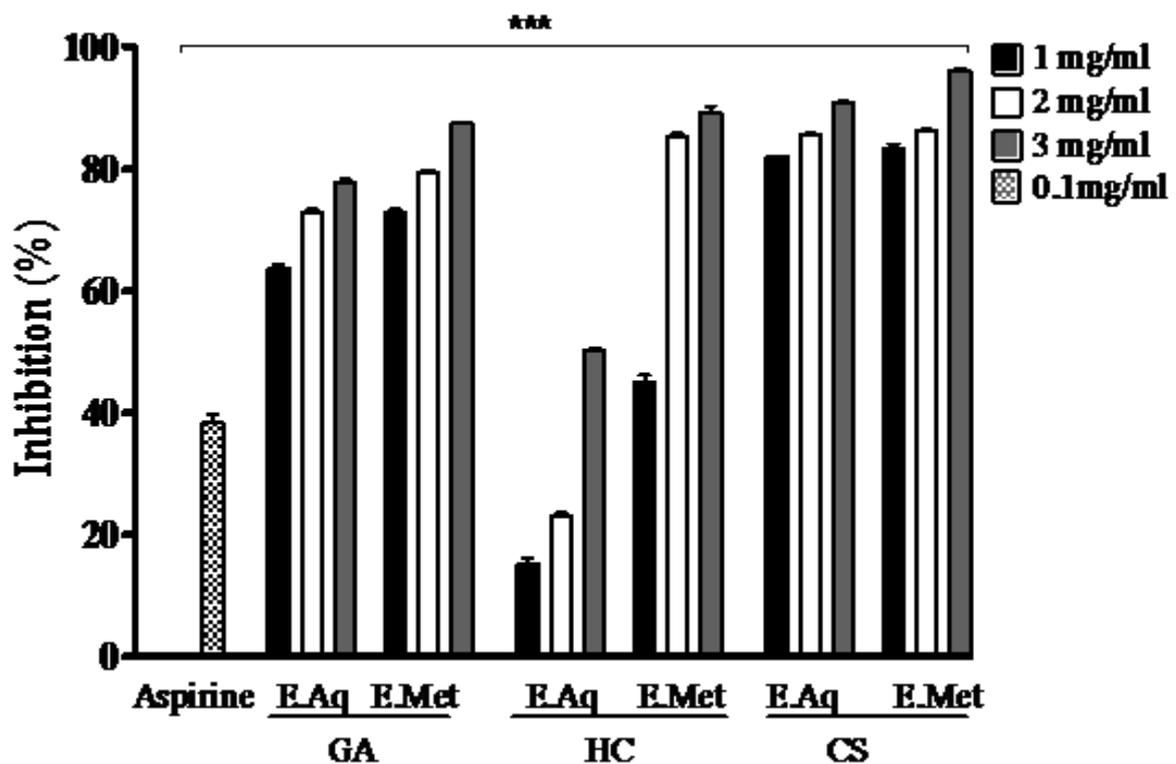
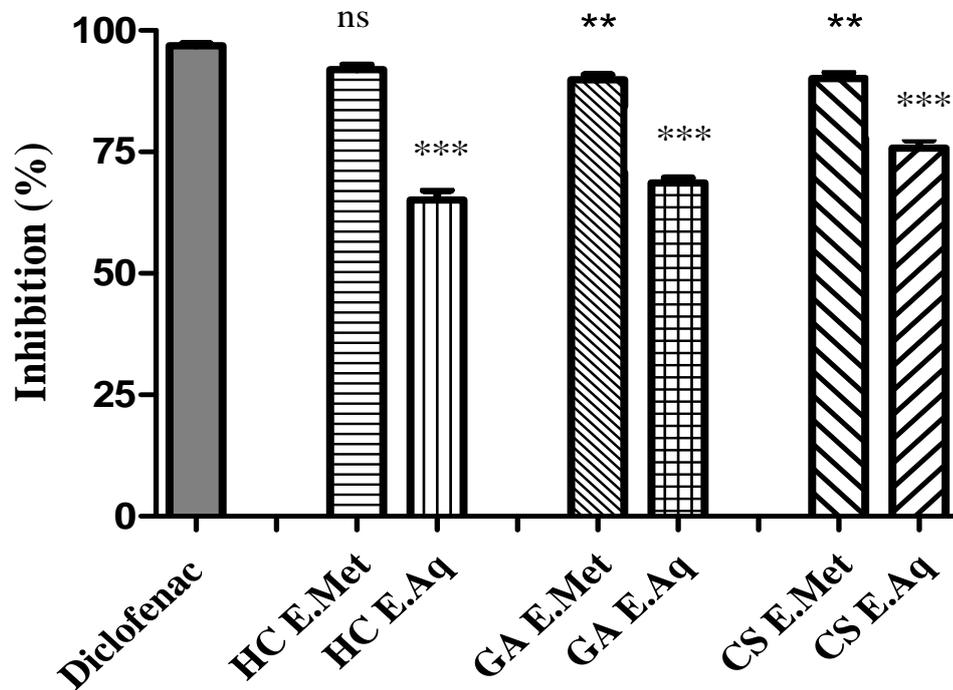


Figure 39. Effet des E. Met et E .Aq de *H. cherifolia* (HC), CS (*C. salvifolius*) et GA (*G. alypum*) sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\*\* :  $p < 0.001$  vs contrôle.

### III.2.2. Effet des extraits sur la dénaturation des protéines

Les résultats montrent que tous les extraits testés à 500  $\mu$ g/ml inhibent la dénaturation du BSA avec un intervalle allant de 65.68% à 91%. Le plus puissant effet inhibiteur a été obtenu avec l'E.Met de *H. cheirifolia*. Cette inhibition est statistiquement similaire à celle de l'anti inflammatoire de référence (Diclofénac) avec la même concentration (Figure 40).

L'E.Met de *G. alypum* et *C. salvifolius* ont aussi donné des taux d'inhibition élevés de l'ordre de 89.88% et 90.14 respectivement suivis dans l'ordre par l'E.Aq de *C. salvifolius* (75.78%), l'E.Aq de GA (68.63%) et l'E.Aq de *H. cheirifolia* (65.68%).



**Figure 40.** Effet des E.Met et E.Aq de *H. Cheirifolia* (HC), *C. salvifolius* (CS) et *G. alypum* (GA) sur la dénaturation de BSA. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  par rapport au Diclofenac.

### III.2.3. Effet des extraits sur la libération des cytokines

#### III.2.3.1. Effet sur la libération de TNF- $\alpha$

La stimulation des cellules mononucléaires périphériques par la concanavaleine A (Con-A) se traduit par une sécrétion massive du TNF- $\alpha$  ( $96.84 \pm 32.27$  pg/ml) par rapport aux cellules non stimulées. La sécrétion du TNF- $\alpha$  par ces cellules est significativement diminuée sous l'effet des faibles concentrations de l'E.Met de *H. cheirifolia* et *G. alypum* et des concentrations élevées des E.Met et E.Aq de *C. salvifolius*. La meilleure inhibition est obtenue avec 100  $\mu$ g/ml d'E.Met de *G. alypum* et *C. salvifolius* (**Figure 41**).

#### III.2.3.2. Effet sur la libération de l'IL-1

Le Concavalin A stimule fortement la production de l'IL-1 par les mononucléaires périphériques ( $127.76 \pm 2.68$  pg/ml). La sécrétion de l'IL-1 par les mononucléaires est

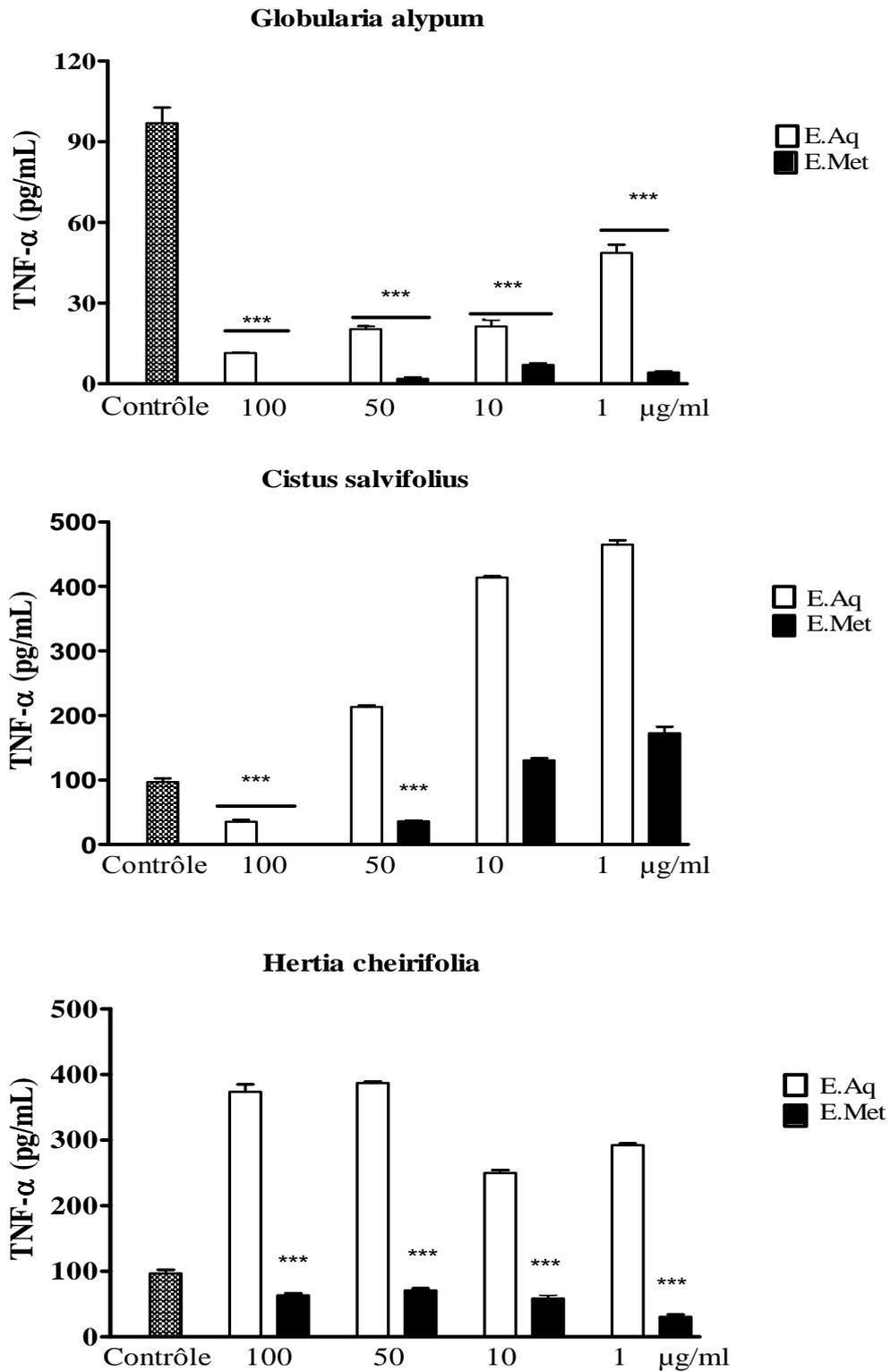
significativement diminuée ( $p < 0.01$ ) sous l'effet des trois extraits méthanoliques des trois plantes étudiées. Les meilleures diminutions ( $5.16 \pm 1.23$  pg/ml,  $5.9 \pm 0.8$  pg/ml et  $8.1 \pm 0.53$  pg/ml) sont obtenues avec les faibles concentrations (1  $\mu$ g/ml, 10 et 50  $\mu$ g/ml) de l'E.Met de *C. salvifolius* et les faibles concentrations (1, 10 et 50  $\mu$ g/ml) de l'E.Met de *G. alypum* ( $10.4 \pm 0.68$ ,  $12.5 \pm 0.68$  et  $18.8 \pm 0.46$  pg/ml). Les extraits aqueux des trois plantes n'ont donné aucun effet (**Figure 42**).

#### III.2.3.3. Effet sur la libération de l'IFN- $\gamma$

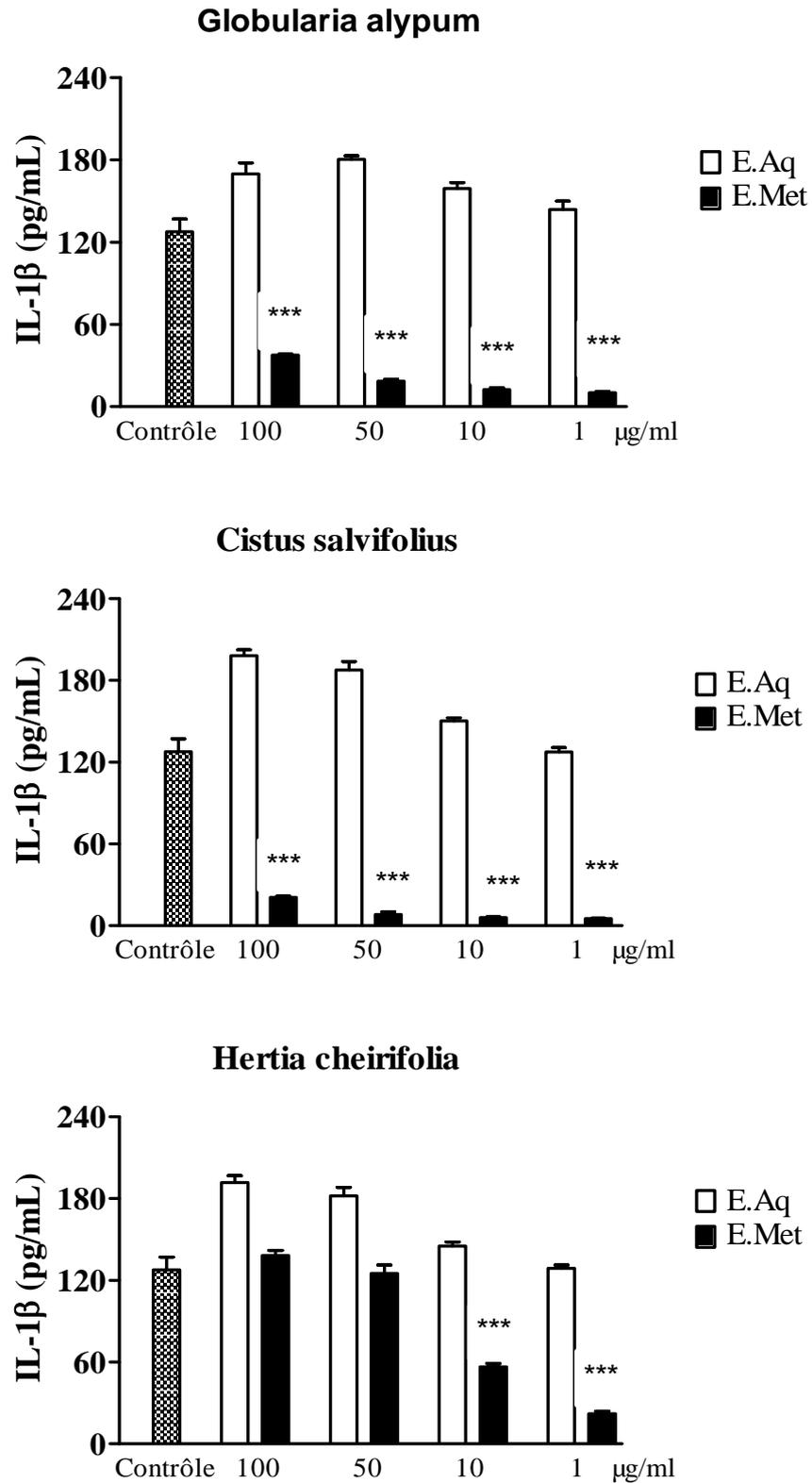
La production de l'IFN- $\gamma$  par les mononucléaires périphériques est fortement stimulée par Con A ( $327.33 \pm 5.71$  pg/ml), cette production est nettement supérieure à celle des cellules non stimulées. La sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les mononucléaires est significativement diminuée sous l'effet d'E. Met et Aq de *G. alypum* et *C. salvifolius*. La meilleure inhibition est obtenue avec les concentrations élevées (50 et 100  $\mu$ g/ml) de d'E. Met de *G. alypum*. Les deux extraits de *H. cheirifolia* à 100  $\mu$ g/ml ont donné un faible effet (**Figure 43**).

#### III.2.3.4. Effet sur la libération de l'IL-8

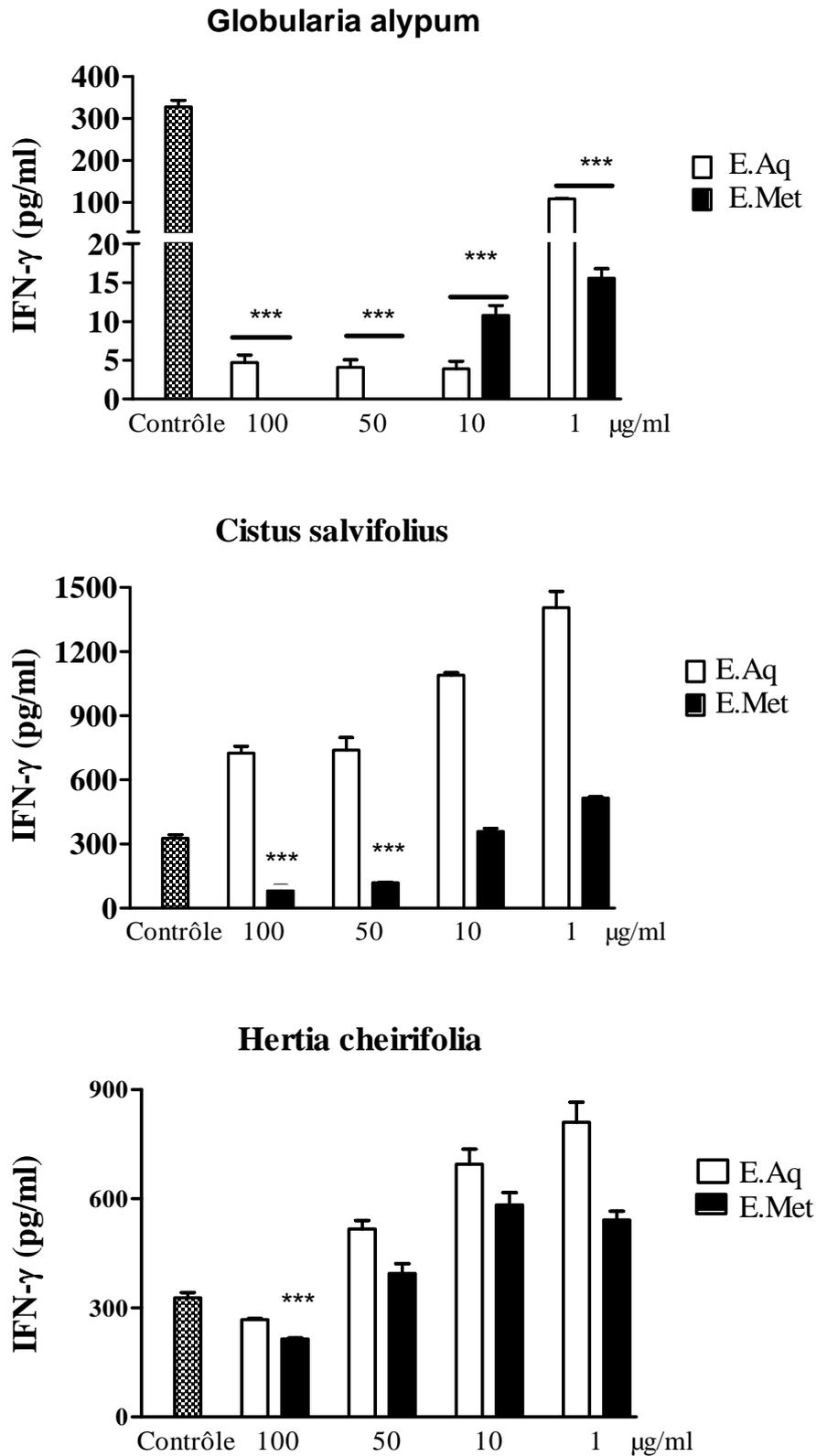
Les résultats obtenus montrent que 5  $\mu$ g/ml de Con A induisent une sécrétion très importante ( $1125 \pm 4.48$  pg/ml) de l'IL-8. Le taux de l'IL-8 n'est pas réduit par le traitement avec les différentes concentrations (1-100  $\mu$ g/ml) des trois extraits aqueux de *G. alypum* et *C. salvifolius* et *H. cheirifolia*. Les meilleures inhibitions sont obtenues avec les concentrations élevées (100  $\mu$ g/ml) des trois extraits méthanoliques, en particulier l'E.Met de *C. salvifolius* qui réduit la libération de l'IL-8 à  $530.79 \pm 4.53$  pg/ml (**Figure 44**).



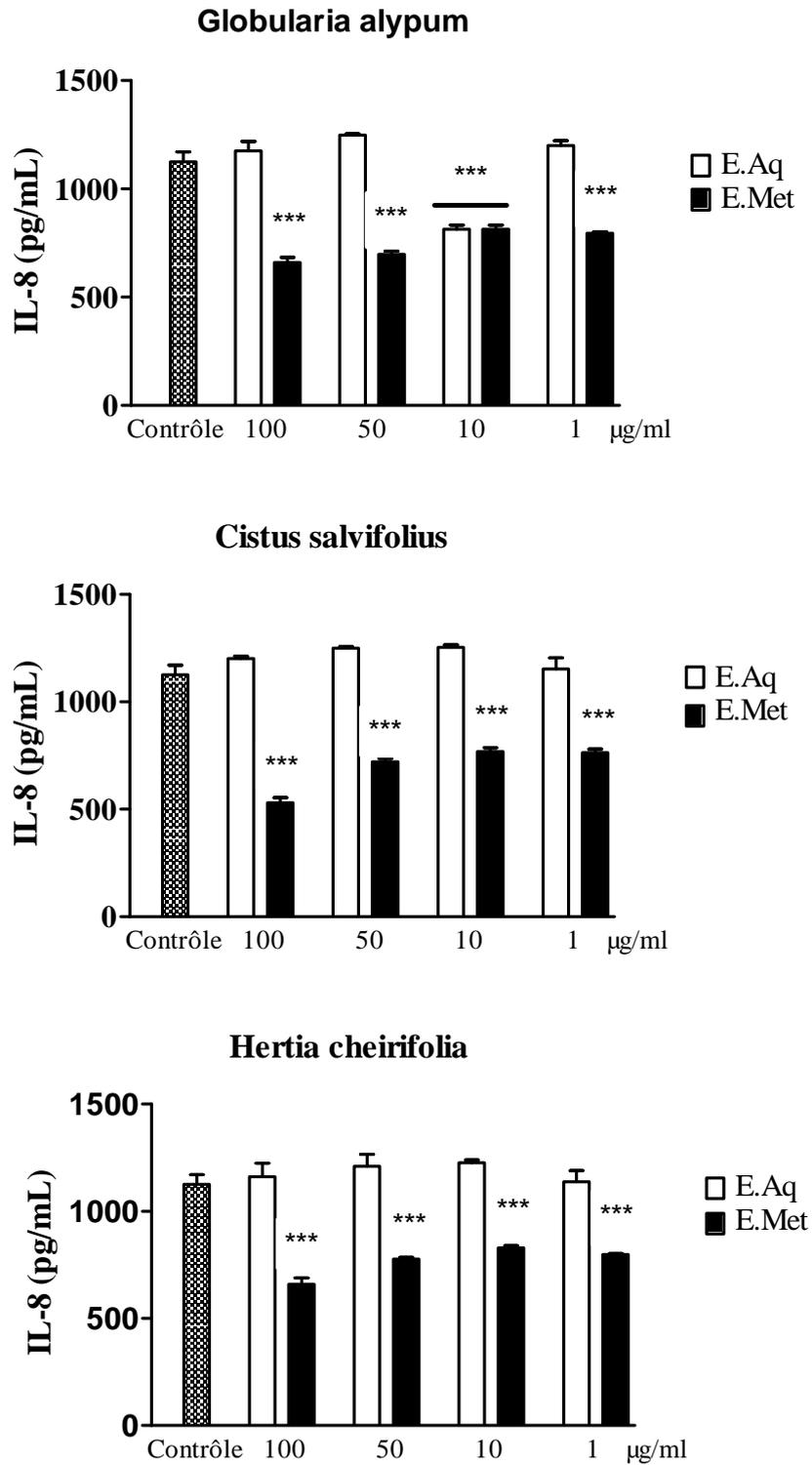
**Figure 41.** Effet des E.Met et E.Aq de *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* et *Hertia cheirifolia* sur la production du TNF- $\alpha$ . Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$  vs contrôle.



**Figure 42.** Effet des différentes concentrations des E.Met et E.Aq *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* et *Hertia cheirifolia* sur la production de l'IL-1. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n= 3). \*\*\* $p < 0.001$  vs contrôle.



**Figure 43.** Effet des différentes concentrations des E.Met et E.Aq de *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* et *Hertia cheirifolia* sur la production de l'IFN- $\gamma$ . Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n=3). \*\*\* $p < 0.001$  vs contrôle.



**Figure 44.** Effet des E.Met et E.Aq de *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* et *Hertia cheirifolia* sur la production de l'IL-8. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n=3). \*\*\* $p < 0.001$  vs contrôle.

## II.4. Activité antioxydante

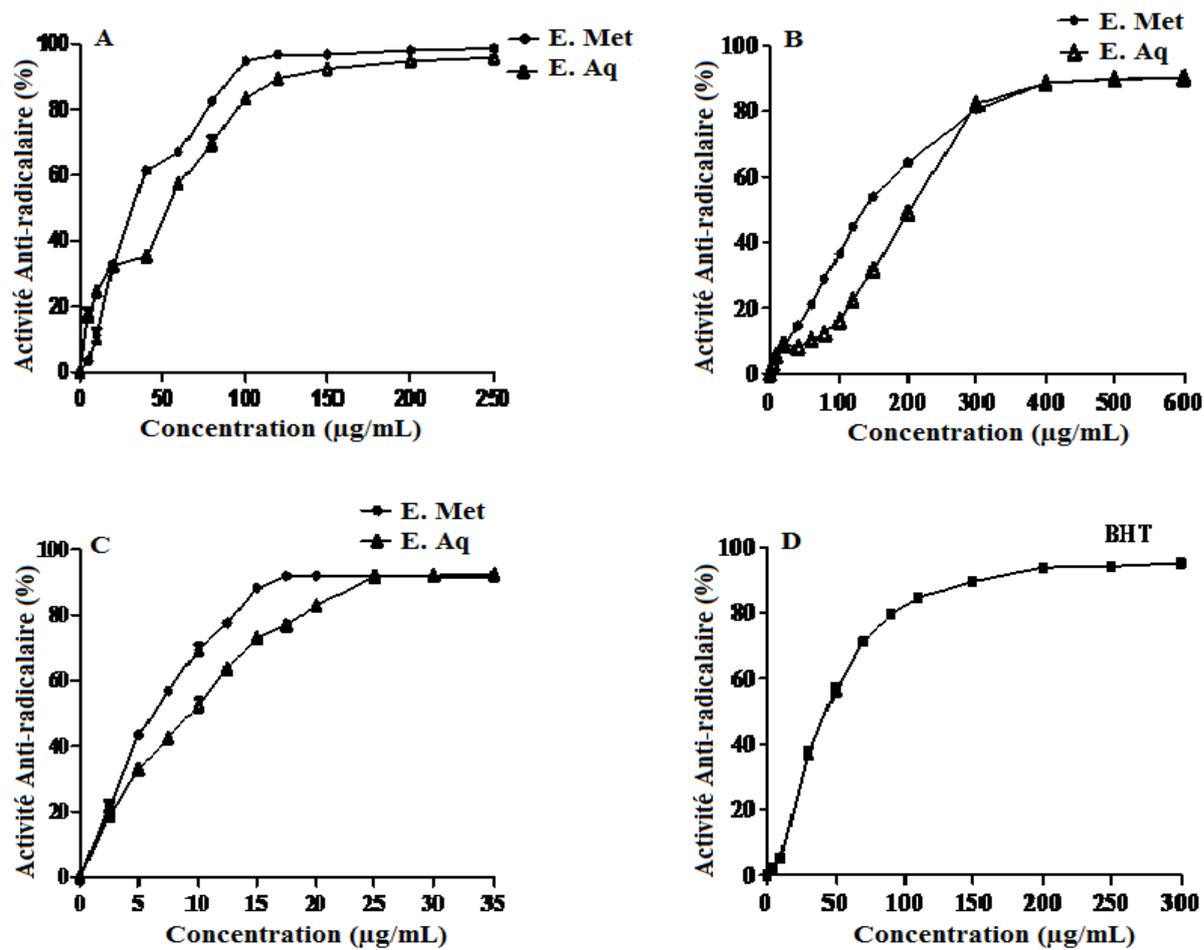
### II.4.1. Activité antiradicalaire

Les résultats montrent que les extraits aqueux et méthanoliques de *G. alypum*, *H. cheirifolia* et *C. salvifolius* possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que tous les extraits étudiés ont une activité antiradicalaire significative ( $p < 0.05$ ) et concentration dépendante (**Figure 45**). A 25  $\mu\text{g/ml}$ , l'E. Aq et l'E. Met de *C. salvifolius* ont montré un effet nettement supérieur à ceux des autres extraits ainsi que le BHT, tandis qu'à 100  $\mu\text{g/ml}$  l'effet de l'E. Met et l'E. Aq de *G. alypum* est très proche de celui obtenu par BHT. L'E. Aq et l'E. Met de *H. cheirifolia* ont montré un effet relativement inférieur.

Les concentrations qui présentent 50% d'inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ), la concentration effective à 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) qui prend en considération la concentration du DPPH dans le milieu réactionnel ( $\text{EC}_{50} = \text{IC}_{50}/\text{mg DPPH/ml}$ ) et le pouvoir antiradicalaire (PAR) qui est inversement proportionnel à l' $\text{EC}_{50}$  ( $\text{PAR} = 1/\text{EC}_{50}$ ) sont représentés dans le **tableau 13**.

### II.4.2. Effet chélateur du fer ferreux

Les effets chélateurs envers les ions ferreux des extraits méthanoliques et aqueux de *G. alypum*, *H. cheirifolia* et *C. salvifolius* sont concentration dépendants et statistiquement significatifs ( $p < 0.01$ ) (**Figure 46**). A 250  $\mu\text{g/ml}$ , l'E. Aq et E. Met de *G. alypum* ont montré un effet chélateur important (97.54%) et (82.74%) et semblable à celui obtenu par l'E. Aq de *H. cheirifolia* (97.77%). L'E. Met de *H. cheirifolia* a montré 69.49% d'effet. Par contre l'effet par obtenu l'E. Met et l'E. Aq de *C. salvifolius* est moins important avec 43.11% et 12.83% respectivement (**Tableau 14**). L'EDTA utilisé comme chélateur de référence a exercé une chélation maximale de 99 % à la concentration de 14  $\mu\text{g/ml}$ .

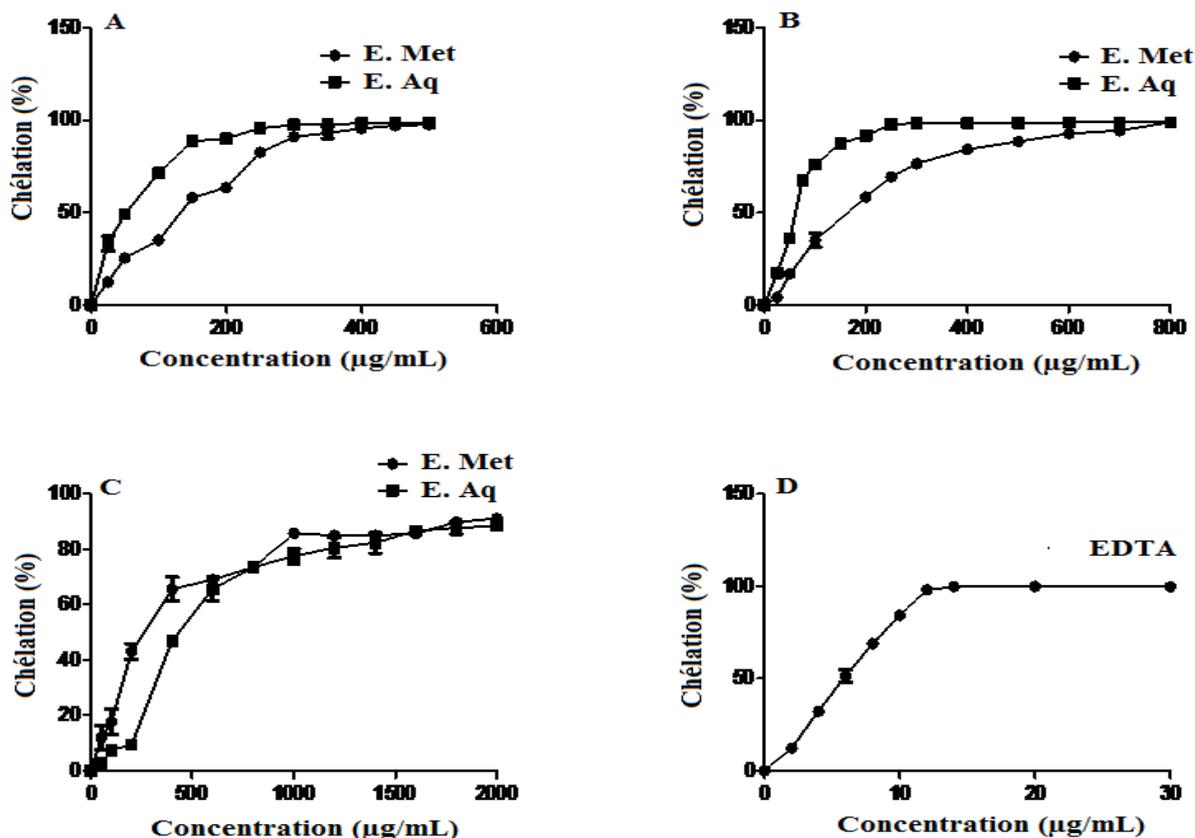


**Figure 45.** Activité antiradicalaire des extraits aqueux (E. Aq) et méthanoliques (E. Met) de *G. alypum* (A), *H. cheirifolia* (B), *C. salvifolius* (C) et du BHT (D) vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

**Tableau 13.** Valeurs des IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et PAR des E.Met et E.Aq de *C. salvifolius* (CS), *G. alypum* (GA), *H. cheirifolia* (HC) et du BHT

| Echantillon | IC <sub>50</sub> (µg/ml) | EC <sub>50</sub> (µg/µg DPPH) | PAR             |
|-------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|
| CS E.Met    | 6.76 $\pm$ 0.83          | 0.086 $\pm$ 0.01              | 3.57 $\pm$ 0.00 |
| CS E.Aq     | 9.37 $\pm$ 1.04          | 0.12 $\pm$ 0.01               | 8.33 $\pm$ 0.01 |
| GA E.Met    | 48.41 $\pm$ 0.95         | 0.62 $\pm$ 0.01               | 1.61 $\pm$ 0.01 |
| GA E.Aq     | 51.97 $\pm$ 0.67         | 0.66 $\pm$ 0.01               | 1.51 $\pm$ 0.83 |
| HC E.Met    | 137.96 $\pm$ 1.13        | 1.76 $\pm$ 0.01               | 0.56 $\pm$ 0.83 |
| HC E.Aq     | 196.60 $\pm$ 1.23        | 2.52 $\pm$ 0.01               | 0.39 $\pm$ 0.03 |
| BHT         | 44.35 $\pm$ 1.89         | 0.56 $\pm$ 0.02               | 1.78 $\pm$ 0.01 |

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.



**Figure 46.** Activités chélatrices des extraits aqueux (E. Aq) et méthanoliques (E. Met) de *G. alypum* (A), *H. cheirifolia* (B), *C. salvifolius* (C) et de l'EDTA (D) vis-à-vis du fer ferreux. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

**Tableau 14.** Valeurs IC<sub>50</sub> et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits de *G. alypum*, *H. cheirifolia*, *C. salvifolius* et de l'EDTA.

| Echantillon                  | IC <sub>50</sub> (µg/ml) | Activité chélatrice (mg EDTA/g d'extrait) |
|------------------------------|--------------------------|---|
| E. Met <i>G. alypum</i>      | 148.15 $\pm$ 0.80        | 40.16                                     |
| E. Aq <i>G. alypum</i>       | 52.69 $\pm$ 4.59         | 112.92                                    |
| E. Met <i>C. salvifolius</i> | 321.70 $\pm$ 1.79        | 18.55                                     |
| E. Aq <i>C. salvifolius</i>  | 644.15 $\pm$ 6.90        | 9.26                                      |
| E. Met <i>H. cheirifolia</i> | 169.75 $\pm$ 1.66        | 25.16                                     |
| E. Aq <i>H. cheirifolia</i>  | 62.75 $\pm$ 4.87         | 95.13                                     |
| EDTA                         | 5.97 $\pm$ 0.29          | -   |

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

### II.4.3. Pouvoir réducteur

Tous les extraits méthanoliques et aqueux de *G. alypum*, *H. cheirifolia* et *C. salvifolius* possèdent un pouvoir réducteur remarquable ( $p < 0.05$ ) et concentration-dépendant (Figure 47). A 12.5 et 25 µg/ml, les E.Met et E.Aq de *C. salvifolius* ont montré un pouvoir réducteur meilleur que celui obtenu avec les 100 µg/ml d'E.Met et 150 µg/ml d'E.Aq de *G. alypum* et *H. cheirifolia*. Le BHT montre une activité réductrice maximale à 30 µg/ml. Les EC<sub>50</sub> sont représentées dans le tableau 15.

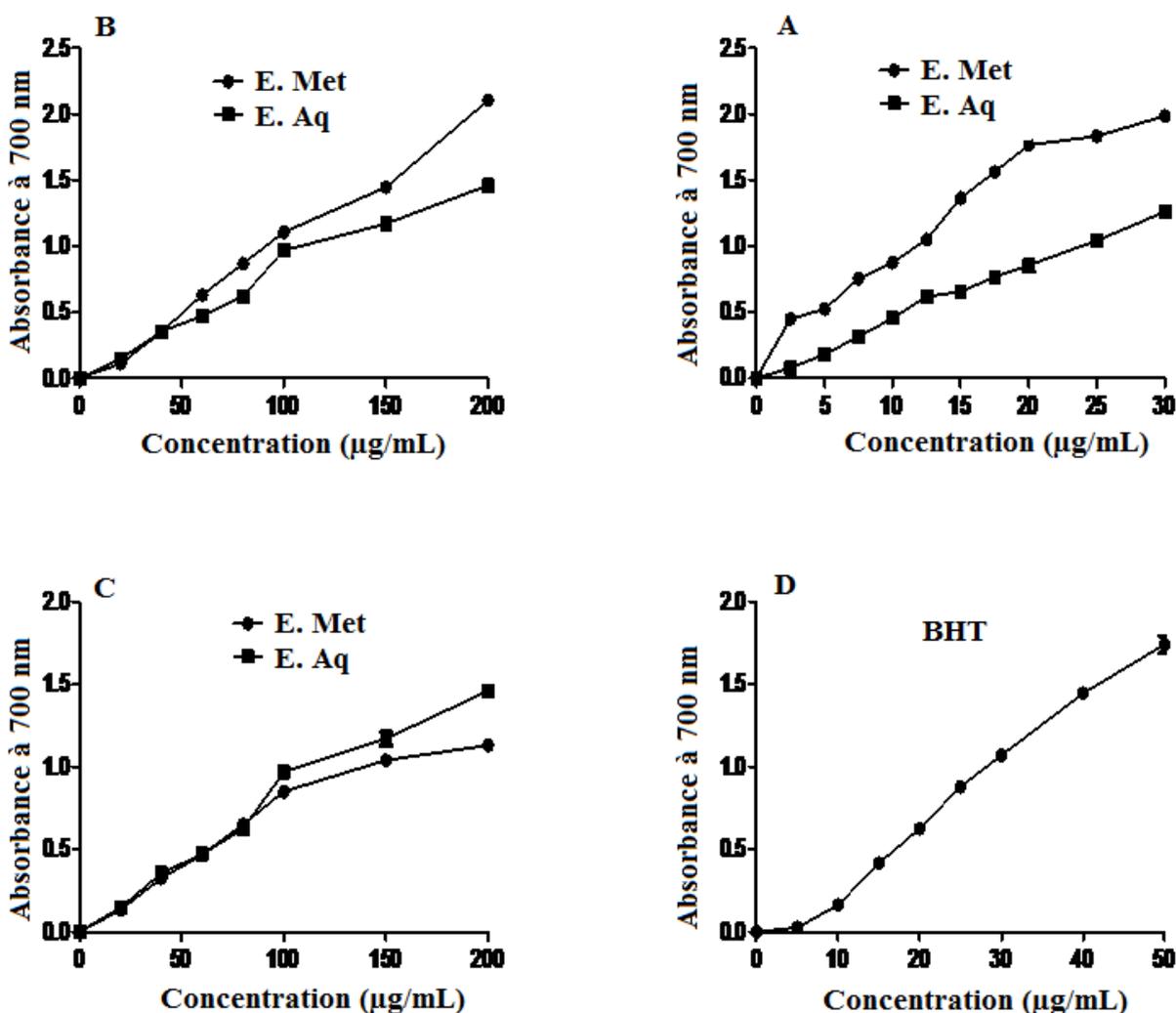


Figure 47. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *G. alypum* (A), de *C. salvifolius* (B), de *H. cheirifolia* (C) et de BHT (D). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.

**Tableau 15.** Les EC<sub>50</sub> des E.Met et des E.Aq de *G. alypum*, *C. salvifolius*, *H. cheirifolia* et du BHT.

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

| Echantillon                    | EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) |
|--------------------------------|--------------------------------|
| E.Met de <i>G. alypum</i>      | 50.10 $\pm$ 1.33               |
| E.Aq de <i>G. alypum</i>       | 64.16 $\pm$ 1.17               |
| E.Met de <i>C. salvifolius</i> | 5.30 $\pm$ 0.06                |
| E.Aq de <i>C. salvifolius</i>  | 11.64 $\pm$ 0.22               |
| E.Met de <i>H. cheirifolia</i> | 61.50 $\pm$ 1.31               |
| E.Aq de <i>H. cheirifolia</i>  | 193.63 $\pm$ 4.08              |
| BHT                            | 16.99 $\pm$ 0.29               |

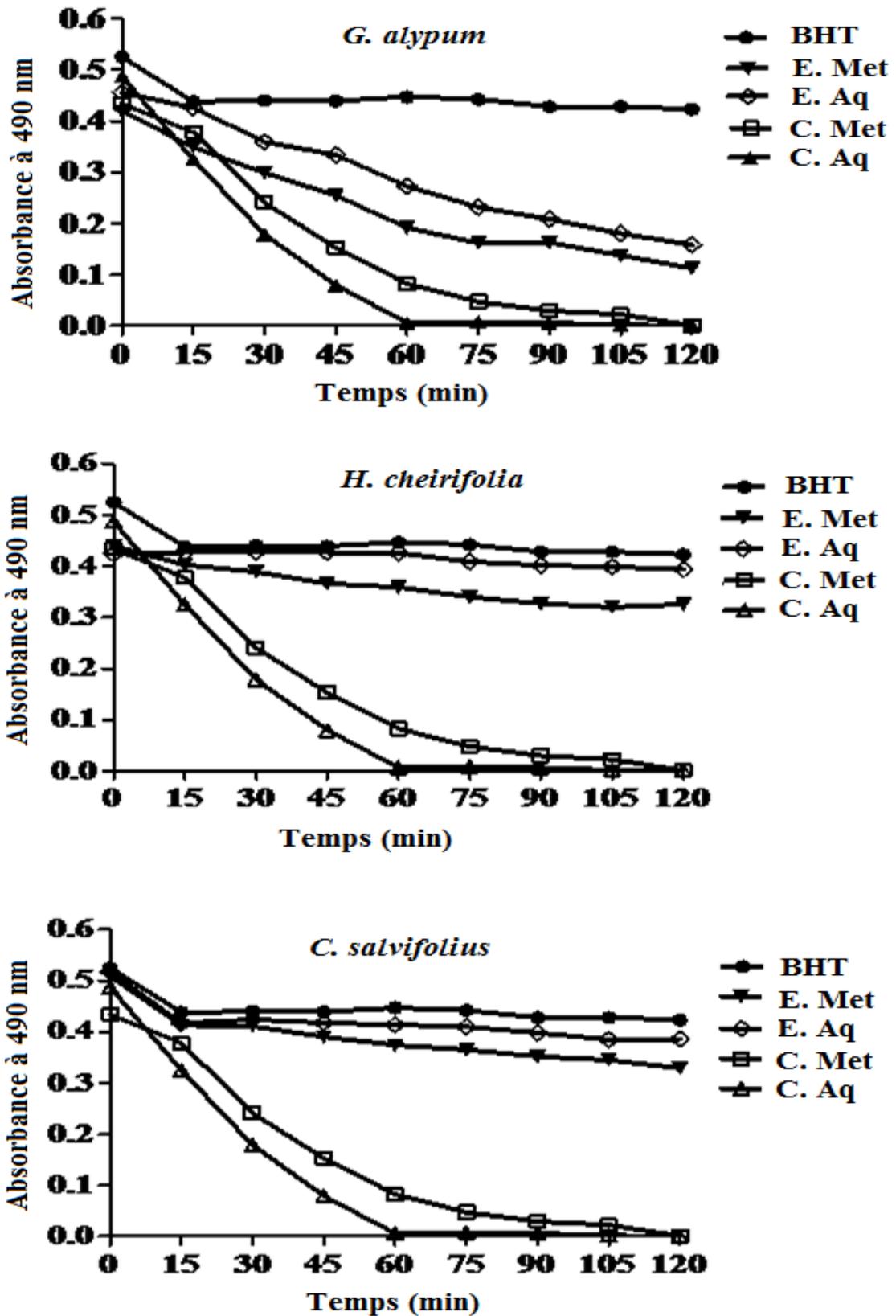
#### II.4.4. Blanchiment du $\beta$ -carotène

La cinétique de blanchiment de  $\beta$ -carotène en présence et en absence des extraits méthanoliques et aqueux de *G. alypum*, *C. salvifolius*, *H. cheirifolia* et de BHT montre que tous les extraits ainsi que le BHT inhibent de manière significative ( $p < 0.05$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique/ $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif (**Figure 48**). Le changement de l'absorbance à différents intervalles de temps a montré que l'E.Met de *H. cheirifolia* semble être le meilleur inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique avec 94%. Cette inhibition est meilleure que celle obtenue avec le BHT (78%), suivi dans l'ordre par l'E.Aq de *H. cheirifolia* avec 74%, l'E.Aq de *C. salvifolius* avec 73% et finalement l'E.Aq de *C. salvifolius* avec 58%. L'E.Met et l'E.Aq de *G. alypum* ont montré une inhibition faible par rapport aux autres extraits avec des taux de 29% et 39% respectivement.

#### II.4.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN

Les résultats montrent que tous les extraits méthanoliques et aqueux de *G. alypum*, *C. salvifolius*, *H. cheirifolia* protègent l'ADN contre l'oxydation avec des taux allant de 76% - 98%.

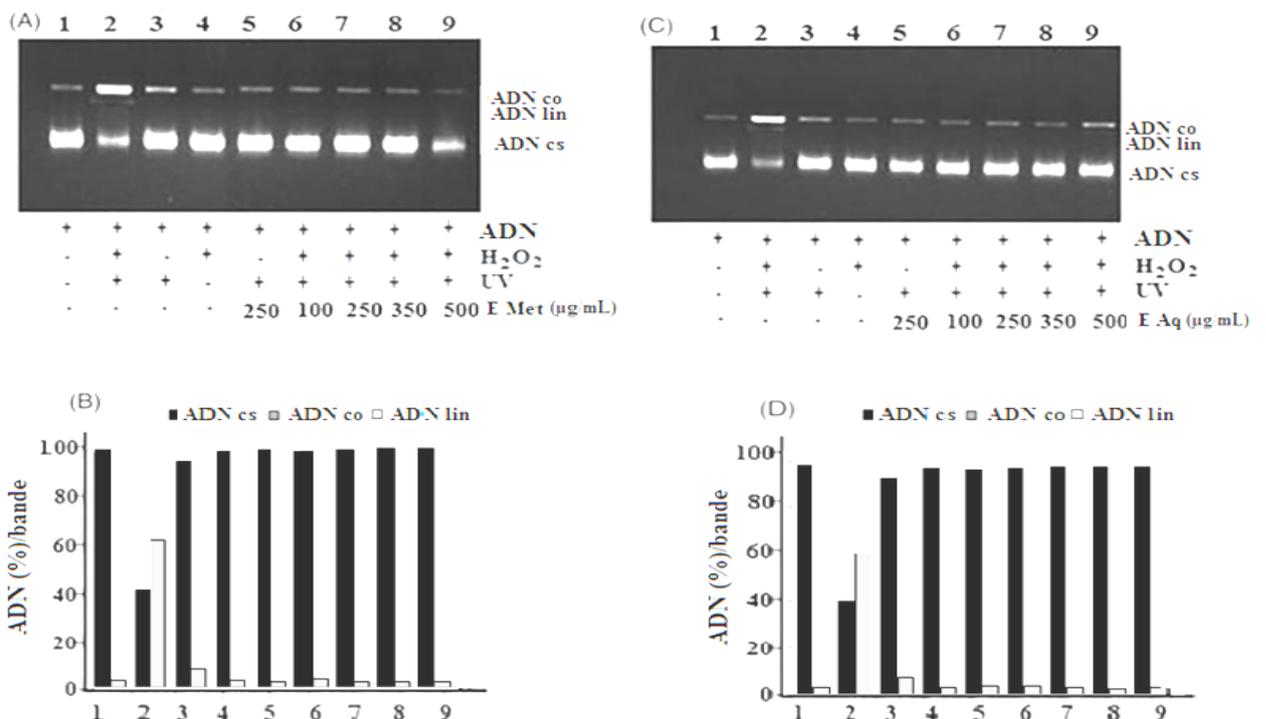
Les figures 49-51 présentent les profils électrophorétiques de l'ADN après une lyse induite par le système UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des différentes concentrations (100, 250, 350 et 500  $\mu$ g/ml) d'E.Met et d'E.Aq des trois plantes. La conversion de l'ADN circulaire surenroulé (ADNcs) en forme circulaire ouverte (ADNco) provenant de l'ADN plasmidique pBluescript M13<sup>+</sup> se traduit par l'apparition de deux bandes sur le gel d'électrophorèse (raie 1).



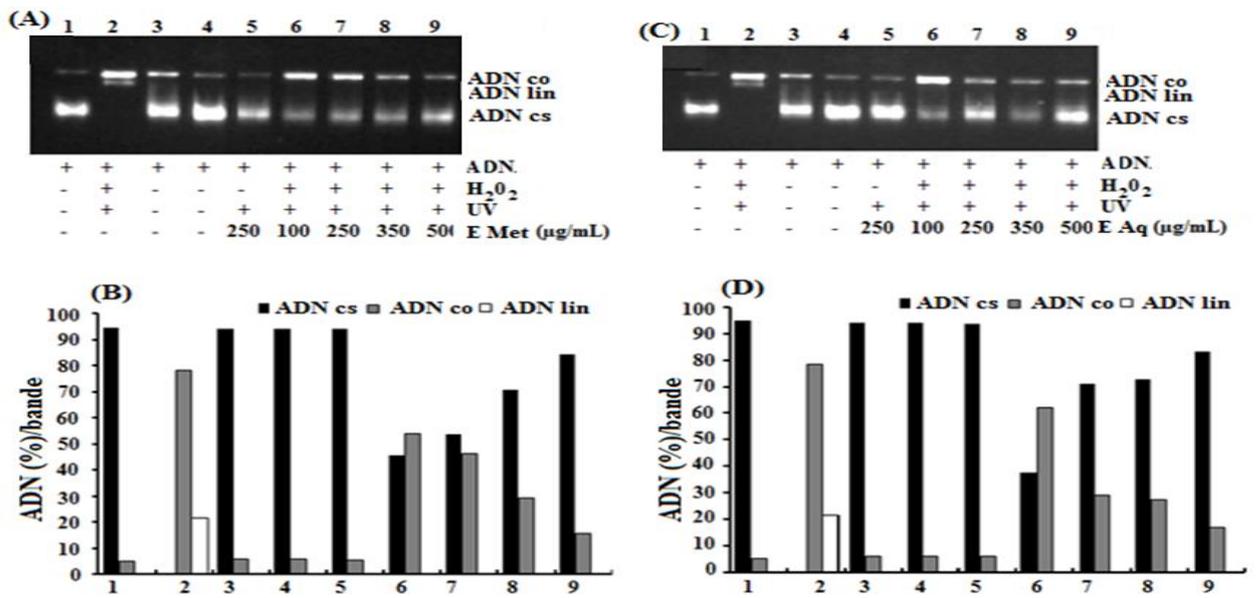
**Figure 48.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en présence et en absence des E.Met et E.Aq de *G. alypum*, *H.cheirifolia*, *C.salvifolius* et du BHT. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SD.

La forme native de l'ADNcs migre plus rapidement que l'ADNco. L'irradiation de l'ADN par les UV en présence du peroxyde d'hydrogène (raie 2) entraîne le clivage de l'ADN et sa conversion en forme circulaire (ADNc) et forme linéaire (ADNlin). D'autre part, les rayonnements UV seuls (raie 3), le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul (raie 4) et les UV en combinaison avec la concentration 250 µg/ml des extraits (raie 5) n'altèrent pas la structure de l'ADN.

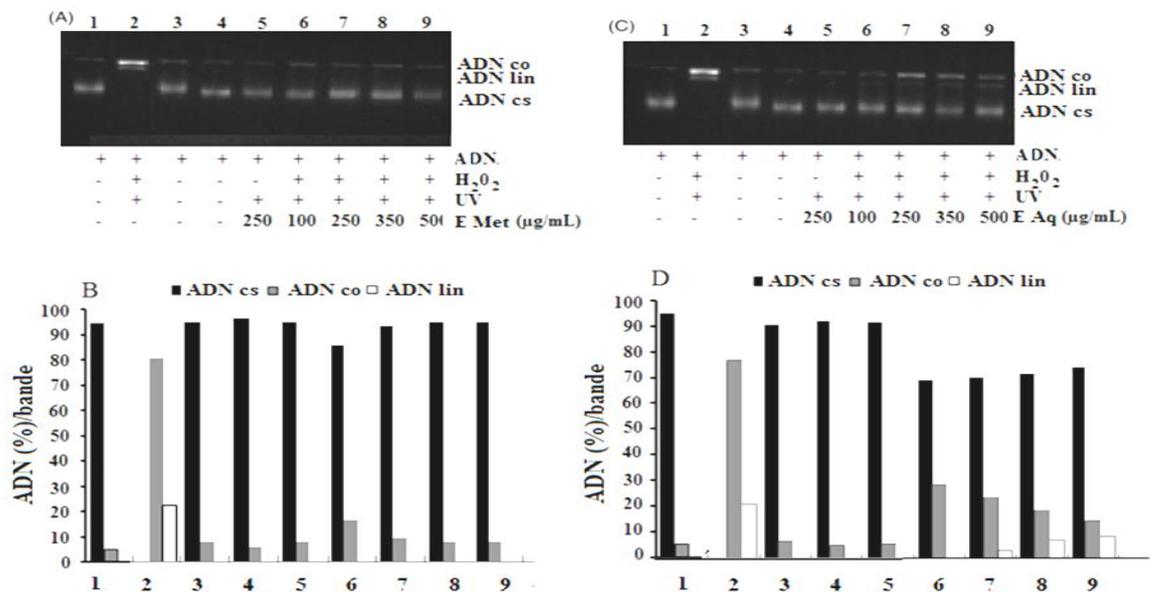
L'addition de l'E.Met de *H. cheirifolia* (raies 6-9, **Figure 49 A et B**) et l'E.Aq (raies 6-9, **Figure 49 C et D**) induit une restauration partielle de l'ADNcs. Les différentes concentrations des deux extraits exercent une protection significative. En effet, l'intensité des bandes de l'ADNcs montre que les différentes concentrations des deux extraits protègent l'ADN contre la scission de ses brins de la même manière avec un pourcentage de 96-98%. De même l'addition de 500 µg/ml de l'E.Met de *G. alypum* (raies 6-9, **Figure 50 A et B**) et l'E.Aq (raies 6-9, **Figure 50 C et D**) au milieu réactionnel induit une restauration partielle de l'ADNcs avec des pourcentages de 83 et 84% respectivement. Les différentes concentrations des deux E.Aq et E.Met de *C. salvifolius* exercent aussi une protection significative, mais l'E.Met exerce un effet plus puissant par rapport à l'E.Aq (**Figure 51 A et B**). Le pourcentage de l'ADNcs dans le cas de traitement avec l'E.Met à 500 µg/ml est plus élevé (92.69%) que celui de l'E.Aq (76.3%) à la même concentration.



**Figure 49.** Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de *H. cheirifolia* contre l'oxydation de l'ADN. **A et B** représentent les profils électrophorétiques de l'ADN plasmidique pBluescript M13+ après photolyse induite par UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM). **C et D** représentent le pourcentage de l'ADN circulaire surenroulé (cs), l'ADN circulaire ouvert (co) et l'ADN linéaire (lin) quantifié par le logiciel (Discovery Series Quantity, BioRad, USA).



**Figure 50.** Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de *G. alypum* contre l'oxydation de l'ADN. A et B représentent les profils électrophorétiques de l'ADN plasmidique pBluescript M13+ après photolyse induite par UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM). C et D représentent le pourcentage de l'ADN circulaire surenroulé (cs), l'ADN circulaire ouvert (co) et l'ADN linéaire (lin) quantifié par le logiciel (Discovery Series Quantity, BioRad, USA).



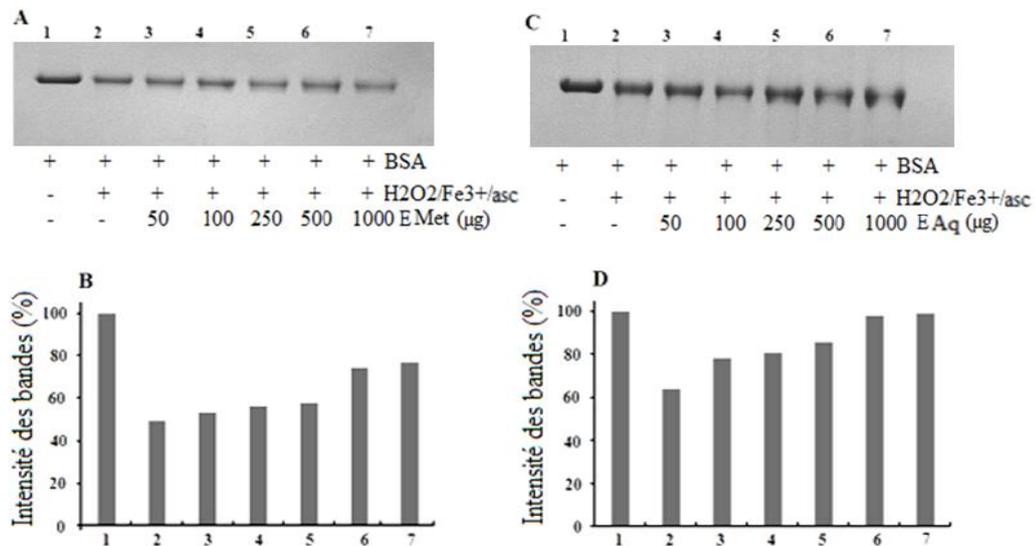
**Figure 51.** Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique de *C. salvifolius* contre l'oxydation de l'ADN. A et B représentent les profils électrophorétiques de l'ADN plasmidique pBluescript M13+ après photolyse induite par UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM). C et D représentent le pourcentage de l'ADN circulaire surenroulé (cs), l'ADN circulaire ouvert (co) et l'ADN linéaire (lin) quantifié par le logiciel (Discovery Series Quantity, BioRad, USA).

### II.4.5. Effet sur l'oxydation des protéines

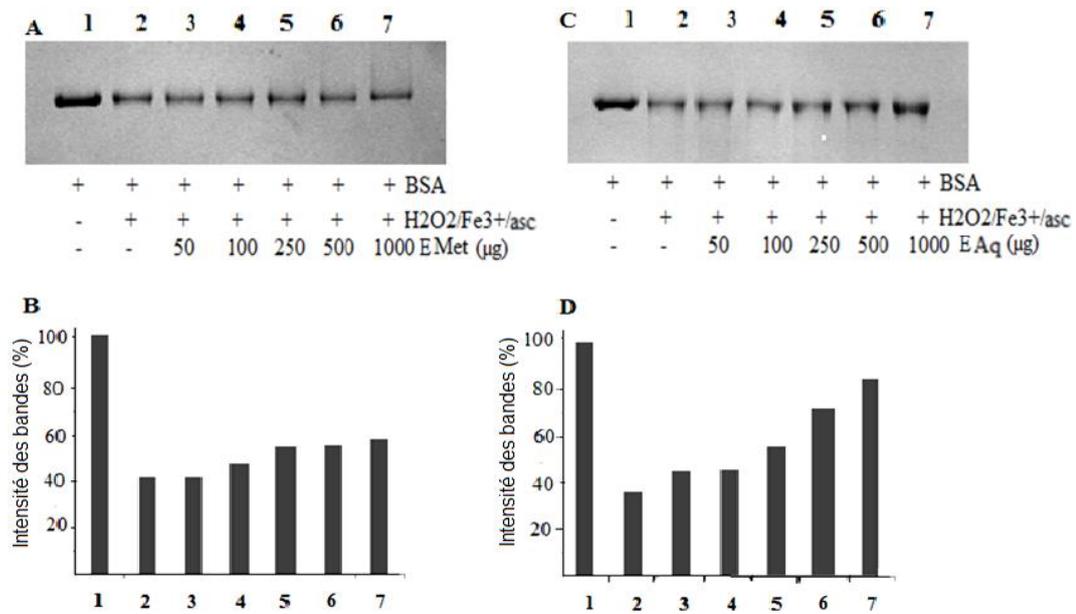
Tous les extraits méthanoliques et aqueux de *G. alypum*, *C. salvifolius*, *H. cheirifolia* protègent la BSA contre l'oxydation.

Les figures 52-54 (A et C) montrent les profils électrophorétiques de la BSA après 3h d'incubation avec le système dénaturant ( $Fe^{3+}/H_2O_2$ /acide ascorbique) en présence ou en absence des différentes concentrations des E.Met et E.Aq de *H. cheirifolia*, *G. alypum* et *C. salvifolius*. La densité des bandes électrophorétiques est présentée dans la figure 52-54 (B et D). La densité de la bande de BSA dénaturée (raie 2) diminue de  $45.9 \pm 3.61\%$ .

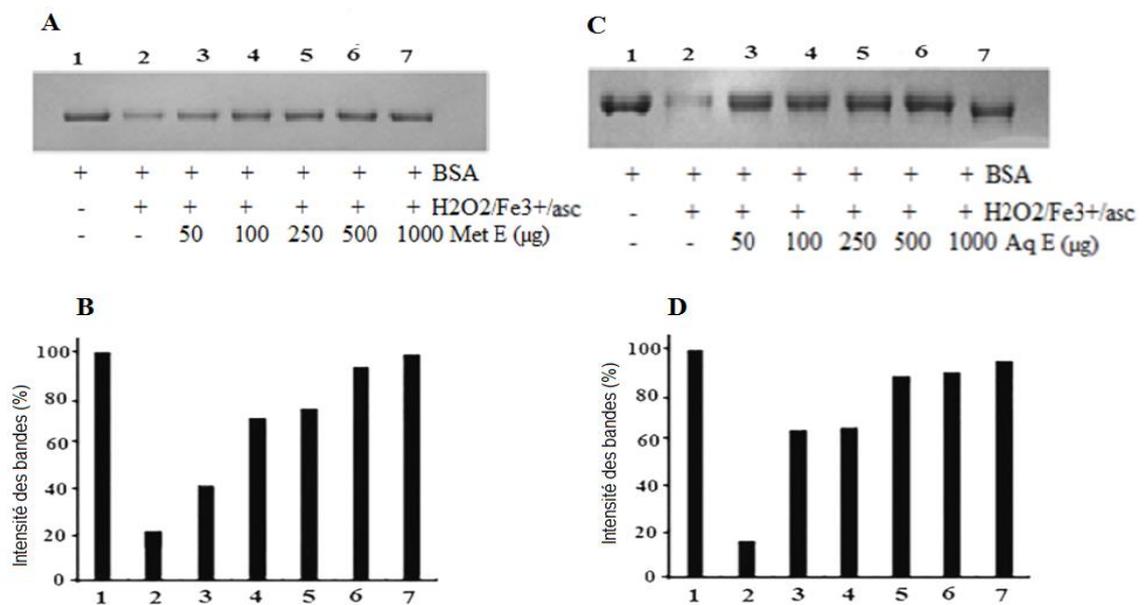
Le traitement avec les différentes concentrations (50 à 1000  $\mu g/ml$ ) des trois extraits de *C. salvifolius*, *G. alypum* et *H. cheirifolia* (raies 3-7) protège la BSA de la dénaturation de manière concentration dépendante. A des concentrations maximales de 1000  $\mu g/ml$  de l'E.Met et l'E.Aq de *H. cheirifolia*, l'intensité des bandes de BSA a été restaurée par 96.62% et 94.49%, respectivement. L'E.Aq et l'E.Met de *G. alypum* restaurent l'intensité des bandes de BSA à la même concentration par 98.83 et 76.97%, tandis que l'E.Met de *C. salvifolius* a montré une protection plus faible de 56.41% contre 84.3% de l'E.Aq.



**Figure 52.** Activité protectrice des extraits aqueux (EAQ) et méthanolique (EMet) de *G. alypum* contre l'oxydation de la BSA. A et B représentent les profils électrophorétiques de la BSA suite à l'oxydation induite par le système dénaturant  $H_2O_2/Fe^{3+}$ /acide ascorbique (Asc). C et D représentent le pourcentage de la BSA quantifiée par le logiciel (Discovery Series Quantity BioRad, USA).



**Figure 53.** Activité protectrice des extraits aqueux (EAQ) et méthanolique (EMet) de *C. salvifolius* contre l'oxydation de la BSA. **A** et **B** représentent les profils électrophorétiques de la BSA suite à l'oxydation induite par le système dénaturant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique (Asc). **C** et **D** représentent le pourcentage de la BSA quantifiée par le logiciel (Discovery Series Quantity, BioRad, USA).



**Figure 54.** Activité protectrice des extraits aqueux (EAQ) et méthanolique (EMet) de *H. cheirifolia* contre l'oxydation de la BSA. **A** et **B** représentent les profils électrophorétiques de la BSA suite à l'oxydation induite par le système dénaturant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique (Asc). **C** et **D** représentent le pourcentage de la BSA quantifiée par le logiciel (discovery series Quantity One programme; version 4.5.2, BioRad, Ca, USA).

#### IV. Activité antibactérienne

Les résultats révèlent que les extraits méthanoliques et aqueux de *C. salvifolius* à 200 et à 300 mg/ml exercent un effet antibactérien considérable sur 8 souches (**Tableau 16**) parmi les dix souches bactériennes testées. Cet effet est plus important que celui de l'amoxicilline, utilisé comme référence et celui des extraits méthanoliques et aqueux de *H. cheirifolia* et *G. alypum*.

L'extrait aqueux de *G. alypum* a montré un effet antibactérien plus faible que celui de l'E. Met avec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, mais très proche de celui de l'amoxicilline pour la souche de *Proteus mirabilis* ATCC 35659. Cet effet est moins important que l'amoxicilline avec *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452. L'E. Met de *H. Cheirifolia* exerce un effet inhibiteur modéré sur *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, tandis que l'extrait aqueux n'a aucun effet sur ces deux souche (**Tableau 16**).

Par ailleurs une très faible activité a été observé contre les levure (des zones d'inhibition entre 2-4 mm) et aucune activité contre les moisissures. De plus, l'activité de l'antibiotique de référence clotrimazole a été testée et les diamètres d'inhibition étaient de  $15.85 \pm 0.32$  mm avec *Aspergillus niger*,  $23.86 \pm 1.15$  mm avec *Aspergillus flavus* et  $44.25 \pm 0.49$  mm.

**Tableau 16.** Effet des extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *H. cheirifolia*, *G. alypum*, *C. salvifolius* et l'amoxicilline sur la croissance bactérienne.

| Bactéries                             | Extrait               | Zone d'inhibition (mm) |            |            |            |              |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------|------------|------------|--------------|
|                                       |                       | E. Met                 |            | E. Aq      |            | Amoxicilline |
|                                       |                       | 200mg/ml               | 300mg/ml   | 200mg/ml   | 300mg/ml   | 30µg/disque  |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>        | <i>H. cheirifolia</i> | 7.0±0.2                | 7.0±0.5    | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 15.44±0.19             | 15.44±0.5  | 10.33±0.33 | 11.11±0.19 |              |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 10.33±0.33             | 11.55±0.19 | 14.88±0.19 | 15.22±0.19 |              |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>          | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | 12.55±0.38             | 12.22±0.38 | 10.22±0.19 | 11.0±0.33  |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | -                      | -          | -          | -          |              |
| <i>Proteus mirabilis</i>              | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | 10.32±0.58   |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | 9.55±0.19              | 10.0±0.33  | 9.33±0.57  | 10.0±0.33  |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 20.22±0.19             | 20.88±0.19 | 19.55±0.19 | 20.44±0.19 |              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 12.44±0.19             | 14.21±0.5  | 10.44±0.5  | 12.00±0.05 |              |
| <i>Salmonella typhimurium</i>         | <i>H. cheirifolia</i> | 11.66±0.33             | 14.00±0.2  | -          | -          | 19.66±0.58   |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | 11.22±0.38             | 13.33±0.33 | 12.44±0.19 | 12.44±0.19 |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 27.44±0.19             | 27.22±0.19 | 8.0±0.86   | 8.22±0.69  |              |
| <i>Bacillus cereus</i>                | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 13.22±1.26             | 16.55±0.19 | 11.66±1.15 | 12.11±0.19 |              |
| <i>Enterococcus faecalis</i>          | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | 12.0±0.0     |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | 9.22±0.19              | 10.22±0.19 | 7.0 ±0.19  | 7.77±0.38  |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 12.66±0.57             | 12.77±0.38 | 15.55±0.50 | 16.88±0.19 |              |
| <i>Staphylococcus aureus</i>          | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | -                      | -          | -          | -          |              |
| <i>Listeria monocytogenes</i>         | <i>H. cheirifolia</i> | -                      | -          | -          | -          | -            |
|                                       | <i>G. alypum</i>      | -                      | -          | -          | -          |              |
|                                       | <i>C. salvifolius</i> | 10.22±0.19             | 10.33±0.33 | 11.33±0.57 | 12.33±0.33 |              |

Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n=3), - : sans effet

# Discussion

## DISCUSSION

La caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir d'extraits de plantes, qui sont des mélanges complexes, fait intervenir différentes étapes dont les principales sont l'extraction, l'identification de ces molécules bioactives par des analyses phytochimiques et enfin l'évaluation de leurs activités biologiques par différents tests *in vivo* et *in vitro*.

Dans la présente étude trois plantes largement utilisées en médecine traditionnelle ont été choisies pour évaluer leurs activités biologiques. Ces trois plantes sont d'origine géographique commune et sont peu étudiées.

### I. Extraction et analyse phytochimique

L'extraction par les solvants organiques et inorganiques est une étape essentielle pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, le choix des solvants d'extraction influence les rendements en métabolites secondaires des extraits. En effet, Khoddami *et al.* (2013) 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. L'utilisation des feuilles de plantes sous forme de poudre rend l'extraction plus efficace, car l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant devient plus grande, la pénétration à l'intérieur des cellules est plus facile. La dilipidation augmente aussi le rendement d'extraction en composés phénoliques (khoddami *et al.*, 2013).

Dans la présente étude, deux méthodes d'extraction ont été utilisées. La décoction qui correspond à l'usage traditionnel des plantes étudiées, permet d'extraire préférentiellement les composés polaires, comme, elle peut aussi extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kingon, 2005). Dans la deuxième méthode, l'extraction est faite par un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau). Le méthanol est capable 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 (Seidel, 2005). Selon Markham (1982), l'extrait aqueux contient des flavonoïdes glycosylés et des tannins, tandis que l'extrait hydro-alcoolique contient des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins.

Dans cette étude, les rendements du mélange hydro-méthanolique étaient plus élevés que ceux de la décoction. Il a été démontré que l'addition de l'eau au solvant organique augmente la solubilité des composés par modulation de la polarité de ces derniers, probablement à cause de l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). Les rendements d'extraction dépendent de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, le temps de macération, la température, le choix du

solvant (Tabart *et al.*, 2007 ; Tiwari *et al.*, 2011 ; Terblanche *et al.*, 2017). La chaleur peut cependant conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Cheaib *et al.*, 2018). L'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage influencent également le rendement d'extraction (Liu *et al.*, 2015). En effet, Khlifi *et al.* (2011) ont obtenu à partir des extraits de *Globularia alypum* originaire de Tunisie un rendement de 37% avec le méthanol 75%. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans cette étude (37.85%) avec le méthanol 80%. De même, Barrajon-Catalan *et al.* (2010), ont obtenu à partir de l'extrait aqueux de deux genres de *Cistus* (*C. ladanifer* et *C. populifolius*) de Portugal un rendement similaire de 7-10% contre 9.45% obtenu dans cette étude.

Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins a été effectué dans cette étude, car la majorité des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à ces substances (Amarowicz, 2007; Gulcin *et al.*, 2010). Les résultats montrent que les extraits méthanoliques des feuilles du *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* sont plus riches en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins que les extraits aqueux. Cela est attribué probablement à la différence de solubilité de ces composés dans le méthanol et l'eau. Selon Falleh *et al.* (2008) et Terblanche *et al.* (2017) une meilleure récupération de polyphénols et de flavonoïdes est obtenue avec le méthanol. Cependant, l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires et leur mélange extrait particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins (Seidel, 2005). Ce qui explique en grande partie la richesse des extraits hydro-méthanoliques par rapport aux extraits aqueux.

Les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes. L'extrait méthanolique et aqueux de *Cistus salvifolius* sont les plus riches en polyphénols suivis dans l'ordre par les deux extraits de *Globularia alypum* et finalement les deux extraits de *Hertia cheirifolia*. Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait, il n'est pas spécifique aux polyphénols mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif en donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montrées que le genre *Cistus*, est considéré comme une source importante de composés phénoliques (Dimcheva et Carsheva., 2017; Mahmoudi *et al.*, 2016; Rebaya *et al.*, 2016; Barrajon-Catalan *et al.*, 2010). En plus, l'étude de Sayah *et al.* (2017) a montré des taux de polyphénols totaux variant de 336.51 à 408.43 mg EAG/g d'extrait de feuilles de *Cistus salvifolus*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans notre étude.

Les extraits de *Globularia alypum* sont plus riches en polyphénols que ceux de Taghzouti *et al.*, (2016) et Khantouche *et al.*,(2015). Selon Khantouche *et al.* (2015), *Globularia alypum* est considéré parmi les espèces du genre *Globularia* les plus riches en polyphénols totaux. Par contre, les taux des polyphénols obtenus à partir de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Hertia cheirifolia* sont inférieurs à ceux obtenus par Bousselsela *et al.* (2012) à partir de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Hertia cheirifolia* originaire de Tunisie. L'origine géographique pourrait en être la cause.

L'analyse phytochimique par HPLC-MS des extraits de trois plantes a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Deux grandes familles de composés ont été mises en évidence, il s'agit des acides phénols et des flavonoïdes. Certains composés sont présents en commun dans les extraits des trois plantes, il s'agit de la rutine, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide cinnamique. La différence entre la teneur en acides phénoliques et flavonoïdes dans les extraits de trois plantes a été notée. Certains composés sont présents dans les extraits méthanoliques et absents dans les extraits aqueux de la même plante, tels que l'acide cinnamique et l'acide ferullique chez *Cistus salvifolius* et *Hertia cheirifolia*.

Les meilleures méthodes pour doser les tanins sont celles qui visent à évaluer leur capacité à précipiter les protéines. Les résultats de cette étude montrent que les extraits méthanoliques de trois plantes sont les plus riches en tanins que les extraits aqueux. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les tanins condensés à haut poids moléculaire sont insolubles dans les phases aqueuses (Cheynier, 2005). Les teneurs en polyphénols et en tanins sont plus importantes que celles des flavonoïdes. Ceci est logique, car les flavonoïdes représentent une classe majoritaire des polyphénols. Les différences notées par rapport aux autres travaux peuvent-être dues à la différence entre les procédés et les conditions d'extraction d'une part et aux périodes de récolte et le climat d'autre part.

Les colorants naturels forment une gamme très étendue, la chlorophylle, le  $\beta$ -carotène et les lycopènes sont parmi les colorants les plus utilisés en industries agroalimentaire et pharmaceutique. Les extraits de *Hertia cheirifolia* ainsi que de *Globularia alypum* sont riches en ces composés et peuvent être utilisé comme source de ces molécules.

Tous les extraits étudiés dans le présent travail ont présentés des taux faibles en alcaloïdes. Ce qui explique en partie l'absence de l'effet toxique de ces extraits.

## II. Etude toxicologique

La toxicité aigüe est la première étape qui doit être réalisée sur une substance, lorsqu'on ne dispose que de peu d'information sur sa toxicité. La détermination de la  $DL_{50}$  en plus de

l'enregistrement du comportement général des animaux constitue l'un des paramètres critiques pour l'évaluation des premiers signes de toxicité (Lima *et al.*, 2016). La présente étude révèle que l'administration orale de 2000 et 5000 mg/kg des extraits de *Globularia alypum*, et *Hertia cheirifolia* n'a pas montré d'effets ni sur le poids corporel ni sur la consommation alimentaire et n'a provoqué aucun changement de comportement et la DL<sub>50</sub> est supérieur à 5000 mg/kg. Ces deux extraits peuvent être utilisés *in vivo* sans risque toxicologique aux doses inférieures à 5000 mg/kg. Par contre, l'administration orale de l'extrait de *Cistus salvifolius* aux souris, a donné des signes d'intoxication avec mortalité. Pour compléter cette étude, les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT et PAL), les triglycérides, le cholestérol et la créatinine ont été évalués. Les résultats ne montrent aucun changement significatif de tous ces paramètres pendant les 14 jours de traitement. Cela indique l'absence d'atteintes hépatiques, d'endommagement des voies biliaires ou de sécrétion et élimination. L'examen des coupes du rein a montré que l'intoxication des souris par l'extrait de *Cistus salvifolius* a provoqué des congestions vasculaires. Cependant, l'examen des tissus hépatiques ont montré un début de nécrose avec la dose 2000 mg/kg. D'après la classification de Diezi (1989), l'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius* est faiblement toxique avec une LD<sub>50</sub> comprise entre 500 et 5000 mg/Kg. Donc, l'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius* peut être utilisé sans risques aux doses inférieures à 500 mg/Kg.

Une étude de toxicité sur des troupeaux de moutons a montré l'apparition de différents symptômes d'intoxications dans certaines périodes liées à l'alimentation par *Cistus salvifolius*. Ces intoxications sont dues probablement à la quantité consommée par le troupeau (Yeruham *et al.*, 2002)

### **III. Activité anti-inflammatoire**

Dans la présente étude, les propriétés anti-inflammatoires de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* ont été étudiées dans différents modèles d'inflammation *in vivo* et *in vitro*.

#### **III. 1. Activité anti-inflammatoire *in vivo***

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris et l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat sont deux modèles expérimentaux largement utilisés pour le criblage d'anti-inflammatoires de synthèse ou naturels qui agissent à différents niveaux de l'inflammation (Ouedraogo *et al.*, 2012 ; Ishola *et al.*, 2015).

L'huile de croton est un agent phlogistique, son effet irritant est dû à la présence du TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) comme principe actif. L'application topique de cette huile induit une réponse inflammatoire aigüe caractérisée par une surproduction de médiateurs pro-inflammatoires à savoir TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MPO, NO synthase inductible (iNOS), COX-2 et PGE2. Comme elle augmente l'activité de la xanthine oxydase et de peroxydation lipidique (Rahman *et al.*, 2009). Le TPA provoque l'augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à la formation d'œdème qui atteint son maximum après 6h (Michel *et al.*, 2012). La phase cellulaire, caractérisée par l'infiltration des neutrophiles et la prolifération des cellules épidermiques, se déroule après 24-48 h (Delaporte *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2007). Selon Murakawa et ses collaborateurs (2006), ces évènements sont déclenchés par la protéine kinase C (PKC), qui favorise l'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 (Denning, 2004). Le traitement local des souris par les extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes étudiées réduit significativement le volume de l'œdème induit par le TPA chez les souris. Cet effet est meilleur que celui exercé par l'indométacine utilisé comme anti-inflammatoire de référence. L'important effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques est probablement dû à la présence de substances lipophiles douées d'activités anti-inflammatoires qui sont capables de traverser la barrière cutanée (Manga *et al.*, 2004 ; Okoli *et al.*, 2007). Les propriétés anti-inflammatoires de ces extraits pourraient être due à la présence d'antagonistes de l'histamine, d'inhibiteurs de la phosphodiesterase, de piègeurs de radicaux libres (Crummey *et al.*, 1987). Les espèces du genre *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum* et *Hertia cheirifolia* sont riches en tannins et polyphénols qui sont connus par leurs effets anti-inflammatoires (Mota *et al.*, 1985 ; Capiralla *et al.*, 2012 ; Quinone *et al.*, 2013 ; Alinjhad *et al.*, 2016). 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). De même, certains flavonoïdes aglycones tels que l'apigénine, la quercétine, la morine ainsi que les flavones et les flavonols glycosides exercent une activité anti-inflammatoire, lors d'une application topique et orale *in vivo* (Lee *et al.*, 1993).

La carragénine induit un œdème local qui atteint son maximum après 4 h. Le mécanisme moléculaire de cette inflammation est caractérisé par la libération de plusieurs médiateurs qui

sont à l'origine du processus inflammatoire (Ouedraogo *et al.*, 2012). L'activation des mastocytes libère la sérotonine et l'histamine, stimulant ainsi une cascade d'événements qui produisent plusieurs facteurs chimiotactiques tels que le C5a, les chimiokines et LTB<sub>4</sub>. Ces médiateurs conduisent à une migration leucocytaire intense vers le site enflammé (Laurent., 1987 ; Botting et Botting, 2000).

Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques des trois plantes à 400 mg/kg ont exercés un effet anti-œdémateux légèrement meilleur que celui des extraits aqueux. L'inhibition la plus élevée de l'œdème a été observée après 4h de l'induction de l'inflammation, ce qui suggère que l'activité anti-inflammatoire des extraits s'exerce davantage sur la synthèse des médiateurs lipidique (prostaglandines et leukotrienes) pro-inflammatoires durant la deuxième phase de l'inflammation (Ouedraogo *et al.*, 2012). En effet, Ammar et ses collaborateurs (2009) ont trouvé que le traitement des rats par des extraits hydrométhanoliques, chloroformiques et acetate d'éthyle des feuilles, de *Hertia cheirifolia*, inhibe l'œdème de la patte induit par la carragénine. Cet effet a été attribué à l'inhibition de COX-1, 12-LOX (Beara *et al.*, 2010).

La richesse du genre *Cistus* en phénols et en flavonoïdes explique en grande partie l'effet anti-inflammatoire de leurs extraits. En fait, *Cistus salvifolius* contient des flavonoïdes aglycones (Kaempferol, quercetine, myricetine), des flavonoïdes glycosylés des stéroïdes aglycones ( $\beta$ -sitostérol) et des stéroïdes glycosylés (Perihan *et al.*, 2015). L'epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4 B-8)-épigallocatechin et l'epigallocatechin-3-o-p-hydroxybenzoate-(4 B-6)-épigallocatechin-3-O-gallate isolés de l'extrait de *Cistus* inhibent fortement COX-2 et à un degré plus faible la COX-1 (Qa'dan *et al.*, 2011). 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- $\kappa$ B, essentiels pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6. En plus, les tanins ont la capacité d'inhiber la phospholipase A<sub>2</sub>, conduisant à l'inhibition des leukotriènes et des prostaglandines (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.

Le recrutement de leucocytes au niveau des tissus enflammés est essentiel à la réponse inflammatoire. Cela permet de nettoyer le foyer lésionnel et par le fait même une réparation tissulaire adéquate. Pour confirmer l'activité anti-inflammatoire des extraits étudiés, leur effet est testé sur la migration des leucocytes vers une poche d'air induite par la carragénine chez la souris. Les résultats de cette étude ont révélé que le traitement avec 1 mg d'extrait aqueux ou méthanolique des trois plantes réduit le nombre de leucocytes infiltrés dans la cavité de la poche d'air. L'inhibition exercée par les extraits méthanoliques est proche de celle obtenue avec 0.1 mg/poche d'indométacine. Les extraits méthanoliques des trois plantes ont montré un effet inhibiteur puissant en comparaison avec les extraits aqueux. Cela est probablement dû à la présence des substances de faible polarité dans les extraits méthanoliques douées de cette activité et qui peuvent agir en synergie avec les substances hydrosolubles. Les dosages effectués dans la présente étude ont révélé que les extraits des trois plantes sont riches en polyphénols et en flavonoïdes qui exercent un effet inhibiteur sur la migration des leucocytes (Selloum *et al.*, 2003 ; Bouriche *et al.*, 2016 ; Meziti *et al.*, 2017 ; Kernouf *et al.*, 2018). D'une manière générale, le mécanisme anti-inflammatoire de ces métabolites est dû à leurs actions sur plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire, en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de la transduction du signal impliquées dans l'activation des cellules inflammatoires (Iwalewa *et al.*, 2007), la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion et la génération des espèces réactives de l'oxygène (Mahat et Patil, 2007; Eteraf-Oskouei *et al.*, 2015).

Le granulome de pellette en coton est considéré comme un modèle pour étudier l'inflammation exsudative chronique et est considéré comme un modèle de la phase proliférative de la réaction inflammatoire (Parvataneni *et al.*, 2005). Dans ce modèle, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  ainsi que les facteurs de croissance induisent la croissance des cellules du muscle lisse, les fibroblastes et la formation du granulome (Mahat et Patil, 2007). Durant le processus inflammatoire les globules blancs migrent et la rate qui possède une activité phagocytaire augmente de taille (Mishra *et al.*, 2010).

Tous les extraits des trois plantes ont réduit la formation de granulome induit par les pellettes en coton et ont diminué le nombre des globules blancs ainsi que le poids de la rate chez les rats traités. Cela signifie que ces extraits peuvent être efficaces dans les inflammations chroniques. Cet effet est attribué à l'inhibition de la migration des cellules impliquées dans la phase proliférative de l'inflammation (macrophages, neutrophiles et fibroblastes) qui sont la source principale de la formation du granulome (Sokeng *et al.*, 2013). Mahat et Patil (2007) ont montré aussi que l'inhibition de la formation du granulome par

l'extrait méthanolique de *Phyllanthus amarus* est due à sa capacité d'inhiber l'induction des cytokines, de l'iNOS et du COX-2 *in vivo* et *in vitro*. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 et les facteurs de croissance influencent la prolifération des fibroblastes, des cellules du muscle lisse ainsi que le tissu granulomateux (Michel et Cotran, 2000). D'autre part, Saralla et Jegadeesan (2015), ont attribué l'effet anti inflammatoire de l'extrait de *Jasminum sambac* dans la phase proliférative des fibroblastes et la formation du granulome aux flavonoïdes.

Dans la présente étude, les propriétés cicatrisantes des extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes ont été mises en évidence en utilisant le modèle de l'excision de la peau. Le diamètre de la contraction de la plaie est un paramètre souvent employé pour évaluer une cicatrisation (Priya *et al.*, 2002 ; Lopes *et al.*, 2005 ; Suntar *et al.*, 2011 ; Ghashghaei *et al.*, 2017). La cicatrisation est un processus complexe déclenché par l'organisme en réponse aux dommages qui reconstituent la fonction des tissus endommagés et se résume en trois phases: une phase inflammatoire (0-3 jours), une phase de prolifération (3-12 jours) et une phase de remodelage (3-6 mois) (Priya *et al.*, 2002 ; Oleivera Ganzalez *et al.*, 2016). Au cours de ces différentes phases, ce processus est régulé par les facteurs de croissance (PDGF, TGF et FGF) secrétés par les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les plaquettes (Li *et al.*, 2007, Oleivera Ganzalez *et al.*, 2016). La cicatrisation est caractérisée aussi par d'importantes modifications de la matrice extracellulaire dans lesquelles interviennent la fibronectine, le fibrinogène et les intégrines (Suriyamoorthy *et al.*, 2014).

L'application topique des extraits étudiés a induit une diminution des diamètres des plaies. Cette diminution est importante du 6<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour du traitement. Tous les extraits des trois plantes ont montré un bon pouvoir cicatrisant, meilleur que celui de la Mycocide® (composée de Triamcinolone (antiinflammatoire), Néomycine (antibiotique) et Nystatine (antifongique)) utilisée comme standard. Plusieurs médicaments utilisés dans le traitement de la cicatrisation des plaies sont à base de plante. En effet, le Cicatrol®, qui favorise la cicatrisation, la régénération de l'épiderme et empêche l'infection des plaies grâce à son pouvoir antibactérien, est une association de plusieurs plantes (*Shorea robusta*, *Ficus infectoria*, *Jasadbhasma*, *Azadiachtaindica*, *Pongamiapinnata* et *Cassia tora*). L'effet cicatrisant des extraits de plantes peut être attribué à la présence de composés phénoliques, essentiellement les flavonoïdes et les tannins ayant la capacité d'accélérer le processus de régénération tissulaire par stimulation de la production de collagène et de fibronectine (Priya *et al.*, 2002 ; Lopes *et al.*, 2005 ; Suriyamoorthy *et al.*, 2014). Plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'une corrélation positive entre l'effet antibactérien (Adetutua *et al.*, 2011 ; Ikobi *et al.*, 2012 ; Suriyamoorthy *et al.*, 2014 ; Udegbumam *et al.*, 2014), l'effet antioxydant (Fitzmaurice *et al.*,

2011), l'effet anti-inflammatoire (Ghashghaie *et al.*, 2017) et la propriété cicatrisante des extraits de plantes.

Pour évaluer l'activité analgésique des extraits des trois plantes étudiées, deux tests largement utilisés ont été retenus (Haider *et al.*, 2011 ; Ishola *et al.*, 2011). L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale. Ces événements sont fortement liés à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs qui vont induire la synthèse des PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, sérotonine et histamine (Deraedt *et al.*, 1980 ; Soro *et al.*, 2009). Les substances dites analgésiques provoquent une diminution significative de ces contorsions. Les extraits méthanoliques et aqueux des trois plantes étudiées possèdent une activité analgésique comparable à celle obtenue par l'aspirine. Les extraits de plantes contiennent des flavonoïdes qui sont des inhibiteurs des prostaglandines et des phénomènes inflammatoires (Alaoui *et al.*, 1998). Deraedt *et al.* (1980) ont mis en évidence des proportions élevées de prostaglandines PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2</sub>α dans les exsudats péritonéaux des rats après injection de l'acide acétique. Les effets de ces extraits pourraient être liés à l'inhibition de la LOX/COX. En effet, l'inhibition de ces enzymes entraîne une diminution de la douleur périphérique (Ojewole, 2007).

Afin de confirmer ces résultats, une étude comparée avec le formaldéhyde comme inducteur de nociception a été réalisée, en utilisant la morphine comme référence. Dans ce test, deux phases sont distinguées, une phase précoce (0-5 min) due à l'activation des fibre-C et un stimulus périphérique causé par la formaldéhyde, la deuxième phase (15-30 min) est en relation avec la réponse inflammatoire causée par le formaldéhyde au cours de laquelle il y a libération de la sérotonine, histamine, bradikines et des prostaglandines qui provoquent la sensibilisation des neurones nociceptifs centraux (Milano *et al.*, 2008). Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs uniquement sur la deuxième phase (15-30 min) de la douleur, contrairement aux analgésiques centraux comme la morphine qui inhibent les deux phases du test de formaldéhyde (Tjolsen *et al.*, 1992 ; Vaseduvan *et al.*, 2007). Donc les extraits aqueux et méthanoliques des trois plantes sont des analgésiques périphériques. De ce fait, ces extraits auraient le même mécanisme d'action que l'aspirine, l'indométhacine et le phénylbutazone qui sont doués d'activités analgésiques périphériques. L'effet analgésique des extraits étudiés est dû à leur richesse en flavonoïdes qui sont des inhibiteurs de prostaglandines (Alaoui *et al.*, 1998) comme ils peuvent inhiber LOX et/ou COX (Ojewole *et al.*, 2007).

### III.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

La dénaturation protéique est un phénomène durant lequel la protéine perd sa structure tridimensionnelle ou secondaire, suite à son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique (Adarsh *et al.*, 2011) induisant l'exposition de certains sites qui vont devenir des auto-antigènes (Lanneau, 2010). Les mécanismes de dénaturation impliquent probablement une altération des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et disulfures dans les protéines (Madan *et al.*, 2011).

La dénaturation des protéines est une des causes de plusieurs maladies inflammatoires. En effet, la dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes des maladies auto-immunes telles que l'arthrite ou la production d'antigènes auto-immune peut être due à cette dénaturation (Umaphy *et al.*, 2010).

Plusieurs anti-inflammatoires ont la capacité d'inhiber la dénaturation des protéines induite thermiquement (Deattu *et al.*, 2012). Les composés inhibant la dénaturation des protéines avec un pourcentage supérieure à 20% sont considérés comme ayant des propriétés anti-inflammatoires (Williams *et al.*, 2008). Dans la présente étude, les extraits méthanoliques et aqueux de plantes étudiées (500 µg/ml) empêchent la dénaturation thermique des protéines, ce qui confirme leur activité anti-inflammatoire. Cette activité pourrait être due à l'interaction de certains composants avec deux sites de liaisons riches en tyrosine, thréonine et lysine (Williams *et al.*, 2008). Duganath et ses collaborateurs, (2010) ont rapportés que les composants des plantes médicinales utilisés en médecine traditionnelle, exercent leurs effets pharmaceutiques grâce à leur capacité de se lier aux protéines plasmatiques. En effet, selon l'étude effectuée par Dufour et ses collaborateurs, (2004) sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine, cette dernière possède une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

Selon Oyedapo (2010) et Yogannadam *et al.* (2010) le test de la protection de la membranaire des érythrocytes contre la lyse est utilisé pour l'étude préliminaire de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, étant donné que la membrane des globules rouge et la membrane des lysosomes sont de structure similaire. L'exposition des érythrocytes aux substances nocives telles que le milieu hypotonique conduit à la lyse de la membrane, accompagnée par l'oxydation et la dégradation de l'hémoglobine (Mohamed Saleem *et al.*, 2011). Agarwal et ses collaborateurs (2003) ont rapporté que la déstabilisation de la membrane cellulaire est attribuée à la production de radicaux libres, tels que les peroxydes de lipides.

Nos résultats montrent que tous les extraits protègent la membrane érythrocytaire humaine contre la lyse induite par la solution hypotonique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Debnath et ses collaborateurs (2013), qui rapportent que les différents extraits des feuilles de *Erioglossum rubiginosum* protègent la membrane érythrocytaire humaine contre la lyse. Les résultats de Lavanya et al., (2010) montrent que l'extrait méthanolique de *Anisomeles malabarica* protège contre la lyse des globules rouges avec un pourcentage de 98%. De même, d'autres études ont montré que les flavonoïdes et les saponines exercent un effet important sur la stabilisation des membranes lysosomales *in vitro* et *in vivo* et que les tanins et les saponines peuvent lier des cations et aident à la stabilisation des membranes des globules rouges (El-Shabrani et al., 1997 ; Oyedapo et al., 2004). Anilkumar et Jibin (2015), ont démontré la capacité de l'extrait méthanolique de *Litsea quinquiflora* à stabiliser la membrane des globules rouge et ont attribué l'effet contre la lyse membranaire à la présence de flavonoides, terpènes et phénols.

Plusieurs études physiopathologiques ont fortement suggéré l'implication des cytokines dans le mécanisme inflammatoire (Mateen et al., 2016 ; Noack et al., 2018). Par conséquent, la recherche de nouveaux produits d'origine végétale exerçant une action sur la synthèse ou l'activité de ces médiateurs inflammatoires fait l'objet de nombreuses recherches (Remila et al., 2015; Kernouf et al., 2018). Par conséquent, la détermination du taux d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  est utile pour le suivi de l'évolution des maladies inflammatoires (Smith et al., 2004). Dans le but d'examiner l'effet de *Cistus salvifolius*, *Hertia cheirifolia* et *Globularia alypum* sur la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 et INF- $\gamma$ ), les mononucléaires périphériques sont stimulés avec la Concavoline A. Ce dernier est un puissant mitogène utilisé le plus souvent pour induire la prolifération et la différenciation des leucocytes (Zhao et al., 2010 ; Zhang et al., 2011). Elle stimule les monocytes pour produire l'IL-1, par la suite l'IL-1 agit comme un co-stimulateur de la Concavoline A et induit l'activation des lymphocytes qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires (Conti et al., 1991). Les extraits méthanoliques (à 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ) des trois plantes diminuent la production de toutes les cytokines testées, tandis que les extraits aqueux n'ont montré aucun effet inhibiteur. L'activité anti-inflammatoire des extraits pourrait être due à la présence des composés bioactifs. En effet, Hwang et al. (2014) ont démontré que l'acide chlorogénique, présent dans des extraits atténue les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . De même Antoine et al. (2013) ont prouvé que le curcumin extrait des rizhomes de *Curcuma longa* inhibe la production de l'IL-8 *in vitro* et l'infiltration des neutrophiles dans la poche d'air *in vivo*. Shin et al. (2015) ont prouvé que l'acide caféique et ses dérivés inhibent la production du TNF- $\alpha$ . Le mamadi (un riz corean)

inhibe la production de l'IL-8 et réduit les taux de l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  produits par les mastocytes humaines (Kim *et al.*, 2004). D'un autre côté, il a été rapporté que les concentrations de TNF- $\alpha$  dans le côlon sont réduites par la curcumine (Camacho-Barquero *et al.*, 2007; Villegas *et al.*, 2011), le picéatannol (Lim, 2004), le resvératrol (Martin *et al.*, 2006; Sanchez-Fidalgo *et al.*, 2010), la quercitrine (Camuesco *et al.*, 2006), le verbascoside (Mazzon *et al.*, 2009). De la même manière, les taux d'IL-1 $\beta$  sont diminués par le resvératrol (Martin *et al.*, 2004), le verbascoside (Mazzon *et al.*, 2009). Le picéatannol (Kim *et al.*, 2008), le rutoside (Kwon *et al.*, 2005).

#### IV. Activité antioxydante

L'activité antioxydante se manifeste par diverses actions, telles que le transfert d'un hydrogène, la chélation des métaux de transition, l'inhibition des enzymes d'oxydation ou la détoxification enzymatique des ROS. Les activités antioxydantes devraient être évaluées par différentes méthodes afin de caractériser le potentiel antioxydant des principes actifs ou des extraits (Prior *et al.*, 2005; Popovici *et al.*, 2009). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, plusieurs méthodes *in vitro* (test de DPPH, chélation des métaux, test du pouvoir réducteur, test du  $\beta$ -carotène, tests de dénaturation de l'ADN et des protéines) ont été réalisées pour évaluer l'effet antioxydant des extraits méthanoliques et aqueux de *Hertia cheirifolia*, *Cistus salvifolius* et *Globularia alypum*.

##### IV. 1. Activité antiradicalaire

Cette étude révèle que les extraits des trois plantes étudiées possèdent une activité antiradicalaire. Les deux extraits de *Cistus salvifolius* possèdent un effet piègeur le plus remarquable vis-à-vis du radical DPPH suivi des deux extraits de *Globularia alypum* et enfin les deux extraits de *Hertia cheirifolia*. D'après ces résultats, l'extrait qui présente une forte activité antioxydante est celui qui possède une teneur élevée en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rebaya *et al.* (2016) qui ont rapporté une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et l'effet scavenger des extraits de *Cistus salvifolius* et les résultats de Taghzouti *et al.* (2016) sur des extraits de *Globularia alypum*. Des résultats similaires sur des extraits de *Hertia cheirifolia* ont été rapportés (Khlifi *et al.*, 2011 ; Bousselssela *et al.*, 2012). Il a été prouvé que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont principalement responsables de l'effet scavenger des radicaux libres (Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014; Zhang et Tsao, 2016). La différence

d'activité notée entre les extraits aqueux et organiques est souvent attribuée au fait que les extraits des solvants organiques sont plus riches en métabolites secondaires polaires, de moyenne et de faibles polarité (Kintzios *et al.*, 2010).

#### IV. 2. Activité chélatrice

Les métaux de transition principalement les ions  $\text{Fe}^{2+}$  qui jouent un rôle important dans le processus d'oxydation sont capables de générer des radicaux  $\text{OH}^\bullet$  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 les 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 des trois plantes étudiées a été évaluée par le test de la ferrozine. Le ferrozine, un réactif chélateur, peut former un complexe violet avec le  $\text{Fe}^{2+}$ . En présence d'éléments possédant une activité chélatrice, la formation du complexe fer ferreux-ferrozine est perturbée, ce qui entraîne une diminution de la couleur pourpre du complexe. Par conséquent, la mesure du taux de réduction de la couleur permet d'estimer l'activité chélatrice des échantillons testés (Ganesan et Benjakoul, 2011). 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 peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique (Elmastas *et al.*, 2006 ; Koheil *et al.*, 2011). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type  $\sigma$  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).

La présente étude montre que les extraits étudiés possèdent une activité chélatrice en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine. L'activité chélatrice élevée des extraits aqueux de *Globularia alypum* et *Hertia cheirifolia* par rapport aux extraits méthanoliques 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. L'activité de chélation des ions métalliques est

souvent attribuée aux flavonoïdes (Le *et al.*, 2007; Přemysl *et al.*, 2011) et aux acides phénoliques (Capecka *et al.*, 2005).

#### IV. 3. Activité réductrice

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans l'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité est appelée pouvoir réducteur. La présence de réducteurs dans les extraits, réduit le  $\text{Fe}^{3+}$  complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en suivant l'augmentation de l'intensité de la couleur qui est fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Chang *et al.*, 2008 ;Yadav *et al.*, 2012). Tous les extraits ont exercé une capacité réductrice, avec un pouvoir plus important avec les extraits méthanoliques. Cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres. Cette capacité pourrait être due à la présence de flavonoïdes qui sont des principaux donneurs d'électrons (Le *et al.*, 2007). Ozen *et al.* (2009) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Thymus praecox* était le plus actif. Cela pourrait indiquer qu'il existe de corrélation entre leur contenu en polyphénols et leur activité réductrice. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rebaya *et al.* (2016) qui ont mis en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en polyphénols et en flavonoïdes de *Cistus salvifolius* et son activité antioxydante et réductrice. De même, une corrélation réciproque entre la teneur des extraits en composés phénolique en flavonoïdes et leurs activité antioxydante dans les tests DPPH, ABTS et FRAP a été mise en évidence (Belkacem *et al.*, 2014 ; Ismail *et al.*, 2017; Parikh *et al.*, 2017). Ksouri *et al.* (2009) ont trouvé qu'il y a une forte corrélation entre le contenu en polyphénols et les flavonoïdes des extraits méthanoliques des fleurs et des feuilles de *Tamarix gallica* et leur activité antioxydante. Ces auteurs réfèrent l'activité antioxydante des extraits de cette plante à la présence d'acides phénoliques et des flavonoïdes ce qui supporte les résultats de la présente étude.

#### IV. 4. Effet sur la peroxydation des lipides

La peroxydation lipidique est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires, catalysée par les radicaux libres (Bougatef *et al.*, 2009). Dans ce système acide linoléique- $\beta$ carotène, les radicaux libres (hydroperoxydes) produits par l'oxydation de l'acide linoléique, provoquent l'oxydation de la  $\beta$ -carotène hautement insaturée ce qui conduit à sa décoloration (Prior *et al.*, 2005). Toutefois, la présence d'un antioxydant dans le milieu réactionnel pourrait soit inhiber l'oxydation de l'acide linoléique soit neutraliser les radicaux libres, ou les deux en même temps (Naidu *et al.*, 2011).

L'oxydation de la  $\beta$ -carotène a été fortement ralentie en présence des extraits des trois plantes, ce qui prouve leur capacité de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. Des résultats similaires ont été obtenus avec les extraits de *Hertia cheirifolia* (Bousselssela *et al.*, 2012) et *Globularia alypum* (Khantouche *et al.*, 2015). Les flavonoïdes et les polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Gao *et al.*, 2000 ; Ayala *et al.*, 2014). Ils inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce en scavengant les radicaux peroxydes, comme ils peuvent interrompre la chaîne de réactions radicalaires en donnant de l'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011). Il a été démontré aussi, que la structure et la propriété lipophile des polyphénols sont des facteurs favorisant la propriété anti-oxydante, probablement en facilitant l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2006 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014).

#### **IV. 5. Effet protecteur de l'ADN**

L'effet protecteur des extraits des trois plantes contre les dommages oxydatives de l'ADN induits par  $H_2O_2$ /UV a été étudiés sur l'ADN plasmidique pBluescript M13 (+). La photolyse de  $H_2O_2$  survient quand il absorbe une quantité significative de lumière d'une longueur d'onde inférieure à de 380nm. En raison de la formation des radicaux d'hydroxyles fortement réactifs et extrêmement oxydants, la configuration superenroulée d'ADN plasmidique (cs) change vers la forme circulaire ouverte (co) et la forme linéaires (lin), qui causent un changement de leurs propriétés et leurs mobilités électrophorétiques (Yasmeen et Gupta, 2016). Les radicaux hydroxyles se lient à l'ADN et réagissent avec les bases azotées produisant des radicaux basiques et des radicaux de sucres (Cadet *et al.*, 2015). Par conséquent, l'abstraction de l'atome d'hydrogène du désoxyribose par le radical  $OH\cdot$  conduit à la rupture du brin d'ADN au niveau de la liaison phosphodiester liant le phosphate et le désoxyribose, la fragmentation du désoxyribose et la modification des bases nucléotidiques (Pogozelski et Tullius, 1998 ; Cadet *et al.*, 2016). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de répllication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est impliqué dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Phaniendra *et al.*, 2015). La présente étude montre l'efficacité de tous les extraits testés à protéger l'ADN plasmidique contre les coupures induites par le système UV/ $H_2O_2$ . Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Verma et ses collaborateurs (2015) qui ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Carissa carandas* protège complètement l'ADN plasmidique pBR322 du stress oxydant induit par le système de photolyse UV/ $H_2O_2$ . Une autre étude comparative menée par Guha et

ses collaborateurs (2011) a montré que les différents extraits des différentes plantes étudiées ont protégé l'ADN contre l'oxydation. Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont connus par leurs rôles protecteurs au sein des plantes contre les dommages des rayonnements UV. En effet, Sevgi et ses collaborateurs (2015) ont montré l'effet protecteur de plusieurs acides phénoliques contre les dommages oxydatifs de l'ADN induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. Les antioxydants naturels comme les polyphénols et les flavonoïdes peuvent influencer le processus d'oxydation par l'inhibition des réactions radicalaires en chaînes, la liaison des catalyseurs d'ions métalliques de transition, la décomposition des peroxydes, la prévention de donation des atomes d'hydrogène et le piégeage des radicaux libres (Mayakrishnan *et al.*, 2012 ; Sowndhararajan et Kang, 2013). Plusieurs études ont également mis en évidence le rôle protecteur des flavonoïdes contre les dommages oxydatifs de l'ADN induit par des agents carcinogènes sur différentes lignées cellulaires (Piao *et al.*, 2013 ; Sevgi *et al.*, 2015 ; George *et al.*, 2017).

#### **IV. 2. Effet sur l'oxydation de protéine**

Les protéines sont des cibles privilégiées de l'oxydation. L'oxydation d'une protéine peut avoir plusieurs sites d'attaque comme les liaisons peptidiques ou les chaînes latérales des acides aminés. L'oxydation des protéines peut avoir plusieurs effets incluant l'oxydation des chaînes latérales, la fragmentation du squelette protéique, la dimérisation/agrégation, le déploiement ou les changements conformationnels, l'inactivation enzymatique et les altérations dans l'entretien et le renouvellement cellulaire (Davies, 2003 ; Gracanin *et al.*, 2009). Les protéines affectées perdent leur fonctions ce qui entraîne la perturbation des fonctions cellulaires (Höhn et Grune, 2013). Ces dommages peuvent jouer un rôle important dans le développement de la cataracte et de certains cancers (Davies, 2003 ; Gracanin *et al.*, 2009). De plus, un nombre croissant de preuves montre que les maladies neurodégénératives sont accompagnées par un phénomène d'oxydation des protéines (Höhn et Grune, 2013), tels que la maladie de Parkinson et l'Alzheimer (Mohsenzadegan et Mirshafiey, 2012; Blesa *et al.*, 2017)

Dans la présente étude, l'oxydation de l'albumine est induite par le système H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique qui réduit le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), conduisant à la régénération des radicaux hydroxyles qui attaquent la protéine (Emen *et al.*, 2009). Les protéines peuvent subir des modifications oxydatives à savoir la formation de réticulations intra- et inter-moléculaires et fragmentation des chaînes polypeptidiques conduisant à la formation de groupes carbonyles sur la protéine (Dalle-Donne *et al.*, 2003 ; Kizil *et al.*, 2011). Tous les extraits testés ont protégé la BSA contre l'oxydation en piégeant les radicaux

libres générés par le système Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/acide ascorbique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kizil et ses collaborateurs (2011) qui ont montré que les extraits éthanoliques de *Hypericum scabrum* et *Hypericum retusumaucher* protègent l'albumine contre la dégradation induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique, suggérant un effet protecteur via des propriétés de piégeage des radicaux libres. L'étude menée par Samudram et ses collaborateurs (2009) a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach* et des graines de *Piper longum* inhibe l'oxydation de l'albumine grâce à leurs contenus riches en antioxydants.

## V. Activité antibactérienne

Un extrait est considéré comme antibactérien lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Tekwi et al., 2012). L'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce de la plante, la méthode choisie pour la préparation de l'extrait, le solvant utilisé et la sensibilité des bactéries (Loziene et ses collaborateurs, 2006).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les deux extraits de *C. salvifolius* ont un effet inhibiteur de la croissance de la plupart des souches bactériennes testées, mais aucun effet n'est remarqué avec les souches fongiques. Mahmoudi et ses collaborateurs (2016) ont rapporté que l'extrait hydro-éthanolique de *Cistus salvifolius* inhibe la croissance des bactéries Gram<sup>-</sup> ainsi que les bactéries Gram<sup>+</sup>, mais contrairement aux résultats de la présente étude ils ont trouvé que cet extrait inhibe la croissance de deux souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*). Barrajón-Catalán et ses collaborateurs (2010) ont rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne des Cistaceae peuvent être les ellagitannins et l'acide gallique, qui sont les composés de l'extrait aqueux de Cistaceae. Les activités antimicrobiennes des deux extraits des feuilles de *Cistus salvifolius* sont comparables à une gamme d'extraits organiques et aqueux de *Cistus incanus* et *Cistus monspeliensis* du même genre (Bouamama et al. 2006). Des études antérieures ont signalé que les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles aux huiles végétales et aux extraits que les bactéries Gram<sup>-</sup> (Mahboubi et Haghi, 2008; Boukhalti et al., 2011), en raison de la présence de lipopolysaccharides hydrophobes dans la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup> qui fournit une protection contre plusieurs agents antimicrobiens. Cependant, aucun des extraits de *Cistus* n'a montré une activité antimicrobienne sélective.

L'extrait aqueux et méthanolique de *Globularia alypum* ont montré un effet antibactérien avec *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella*

*typhimurium* mais ils n'ont pas inhibé la croissance des souches fongiques. Des travaux de Taghzouti et al. (2016) sur l'extrait méthanolique et de l'acétate d'éthyl de *Globularia alypum* ont montré aussi que ces extraits n'ont pas d'activité inhibitrice sur *C. albicans* ainsi que sur les bactéries Gram- (*E. coli* et *P. aeruginosa*) par contre ils inhibent la croissance des bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*). Il a été rapporté aussi par Abdelsalem et al. (2007) que les extraits de *Globularia alypum* présentent une activité antibactérienne remarquable en particulier contre les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*).

L'extrait méthanolique de *Hertia cheirifolia* a exercé un effet inhibiteur modéré seulement sur deux souches Gram- (*Acinetobacter baumannii* et *Salmonella typhimurium*) tandis que l'extrait aqueux n'a aucun effet. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Bousselssela et al. (2012) qui ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux, des feuilles de la même plante ne possèdent aucune activité contre la croissance de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Par contre, ces résultats sont différents de ceux de Majouli et al. (2017) qui ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyl des racines de *Hertia cheirifolia* inhibe la croissance de presque toutes les souches Gram+ et Gram- testées mais il était inefficace contre la croissance des souches fongique testées.

L'activité antibactérienne des plantes médicinales est attribuée à leur contenu en métabolites secondaires, principalement les composés phénoliques et les huiles essentielles (Bayoub et al., 2010). Les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits de plantes envers les microorganismes (Cowan, 1999). L'épigallocatechine, la catéchine, la myrcétine, la quercétine et lutéoline sont des substances antibactériennes importantes (Shan et al., 2007 ; Askun et al., 2009). 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 des extraits étudiés avec celles obtenue par 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).

# Conclusion & perspectives

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la présente étude trois plantes *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* ont été choisis afin de trouver de nouvelles voies d'application tant dans le domaine médical et pharmaceutique que dans le domaine alimentaire et cosmétique. L'objectif de ce travail était d'adopter des bases scientifiques pour la validation de certaines propriétés biologiques attribuées à trois plantes médicinales, choisies sur la base de leur usage traditionnel. Dans cette étude, les extraits des feuilles de ces plantes semblent présenter un intérêt réel et potentiel dans le traitement de l'inflammation aiguë et chronique, la protection contre les effets du stress oxydatif ainsi que l'inhibition de la croissance de certaines bactéries.

Le mélange hydro-méthanolique s'est avéré comme le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques, grâce à sa capacité d'extraire les molécules polaires et apolaires ce qui s'est traduit par les bons rendements obtenus avec ce solvant.

L'analyse phytochimique a montré que l'E.Met de *Cistus salvifolius* possède les teneurs les plus élevées en polyphénols et flavonoïdes. Par ailleurs, la détermination de la teneur en pigments liposolubles révèle la richesse de l'E.Met de *Hertia cheirifolia* en  $\beta$ -carotène, lycopène et en chlorophylle a et b, par contre tous les extraits ont montré une teneur faible en alcaloïdes.

L'étude de la toxicité aiguë des extraits des trois plantes a permis de conclure que les extraits méthanoliques des feuilles de *Hertia cheirifolia* et *Globularia alypum* ne sont pas toxiques et que l'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius* peut être classé dans la catégorie des plantes faiblement toxiques par voie orale.

Les extraits des trois plantes exercent des effets anti-œdémateux importants, soit par application locale ou par administration par voie orale. Ces extraits inhibent aussi le recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire. D'un autre côté tous les extraits présentent des propriétés analgésiques et cicatrisantes justifiant ainsi leur usage traditionnel.

Les extraits méthanoliques des trois plantes étudiées réduisent la production des cytokines (IL-1, de TNF- $\alpha$ , d'INF- $\gamma$  et d'IL-8) par les cellules inflammatoires, protègent la membrane des hématies contre l'hémolyse ainsi que la dénaturation de l'albumine.

D'autre part, Tous les extraits possèdent une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres, chélatant les métaux et protégeant les macromolécules contre l'oxydation.

Les extraits de *Cistus salvifolius* et *Globuularia alypum* ont montré une activité antibactérienne considérable vis-à-vis de quelques souches testées. L'extrait méthanolique de *Cistus salvifolius* donne le meilleur effet.

Les résultats de la présente étude supporte l'usage traditionnel des trois plantes étudiées 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 molécules responsables des activités précédentes, en étudiant les mécanismes d'action sur les médiateurs inflammatoires, les enzymes impliquées dans la production des ROS et sur les systèmes antioxydants *in vivo*.

Il serait très intéressant d'étudier l'activité antibactérienne des extraits de *Cistus salvifolius* 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

## Reférences Bibliographiques

- Abay G, Altun M, Koldaş S, Tüfekçi A.R, Demirtas I. (2015). Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb Chem High T Scr*, **18**, (5) 1- 12.
- Adarsh V.M, Ajay K.P, Kavitha D, Anurag K.B. (2011). Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in vitro. *Int J Pharm Biol Sci*, **2**,1-6.
- Abdelsalam H., Bogdadi A., Kokoska L., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Vorisek K. (2007). Antibacterial activity of *Globularia alypum* methanol extracts. *Pharm. Biol.* 45 386.
- Aclinou P, Benkouider A, Massiot G, Le Men-Olivier L (1991). Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, **30**, 2083-2084.
- Adetutu A, Morgan W.A, Corcoran O. (2011). Antibacterial, Antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf a wound healing plant of Nigeria. *J Ethnopharmacol*, **133**, 116-119.
- Agarwal C, Singh R.P, Dhanalakshmi S, Tyagi A.K, Tecklenburg M, Sclafani R.A, Agarwal R. (2003). Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*, **22**, 8271-8282.
- Alaoui K, Lagorce J.F, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H, Roquebert J. (1998). Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*, in : *Annales pharmaceutiques françaises*, pp. 220-228.
- Albano S.M, Miguel M.G. (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind Cro Prod*, 1-6.
- Alinjhad D, Asayesh M.A, Mariyam A. (2016). Determination of the Anti-inflammatory Property of Tannins from the Rind of Calamansi (*Citrus microcarpa*, Rutaceae). *J Int Oral Health*, **8**, 546-53.
- Alinkumar M, Jibin J. (2007). Evaluation of in vitro anti-Inflammatory activity of the methanolic extract of *Litsea quinqueflora* (Dennst.) suresh. *J Pharm Biol Sci*, **10(2)**, 32-36.
- Es-Safi, N, Khelifi, S, Lucien, K, Albert, K, Ducrot P.H. (2005). Antioxidant Constituents of the Ariel Parts of *Gloularia alypum* Growing in Marocco. *J Nat Prod*, **68**, 1293-1296.
- Amarowicz R. (2007). Tannins: The new natural antioxidant. *Eur J Lipid Sci Technol*, **109**, 549-551.
- Ammar S, Edziri H, Mahdjoub M.A, Chatter R, Bouraoui A, Mighri Z (2009). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, **16**, 1156-1161
- Amessis-Ouchemoukh N, Abou-reidah I.M, Quirantes-Piné R, Rodriguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2014). Tentative characterisation of

- Iridoids, phenylithanoid glucosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochem Anal*, **25** (5), 389-98.
- Amro B.I, Haddadin R.N, Tawaha K, Mohammad M, Mashallah S, M Assaf A. (2013). In vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of Jordanian plant extracts: a potential target therapy for Acne vulgaris. *Afr J Pharm Pharmacol*, **7**, 2087–2099.
- Antoine F, Simard J.C, Girard D. (2015). Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol*, **17**, 1101-1107.
- 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.
- 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.
- Askun T, Tumen G, Satil F, Ates M. (2009). Characterization of the phenolic composition and antimicrobial activities of Turkish medicinal plants. *Pharm Biol*, **47** (7), 563-571.
- Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S. (2004). "Cistus incanus and Cistus monspeliensis inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle," *J Ethnopharmacol*, **92**( 2-3): 245–250.
- Attia S, Grissa-Lebdi K, Mailleux A.C, Heuskin S, Lognaye G, Hancea T (2012). Acaricidal activities of Santolina Africana and Hertia cheirifolia essential oils against the two-spotted spider mite (Tetranychus urticae). *Pest Mang Sci*, **68** (7), 1069-1076.
- Attia S, Grissa-Lebdi K, Raki A, Hance T, Mailleux A.C. 2015. Persistence de la toxicité de quatre extraits naturels de plantes sur Tetranychus urticae et sa variation avec l'ajout du Tween®20. *Tunisian Journal of Plant Protection* 10: 35-44.
- Autier J, Miyara M, Buyse S (2004). Module 8: immunopathologie, réaction inflammatoire. item 112, editor. Issy-les-Moulineaux: Estem, 192.
- Ayala A, Munoz M.F, Arguelles S (2014). Lipid peroxidation : Production, Metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, **2014**, 1-41.
- Baba Aissa F. (2011). Encyclopédie des plantes utiles. Flore Méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale), Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. El Maarifa, 171 p.
- 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.
- Baheti R, Gill H. (2011). Cyber-physical systems, In T. Samad and A.M. Annaswamy (eds.), *The Impact of Control Technology*, 161-166.
- Balaban S, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, **120**, 483-495
- Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Saura D, Guillén E, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, Vicent M. (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol*, **48**, 2273-2282.
- 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, 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.
- Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci I.A, Boucherit Z (2014). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of various *Punica granatum* L Peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie*. **12(6)**, 372-379.
- Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*, **35**, 123-143.
- Bellakhdar J (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Ibiss. press*, 764 p.
- Beniston N.T, Beniston W.S (1984). Fleurs d'Algérie, E. N. L. Alger.
- Berger M.M (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nut Clin Metabol*, **20**, 48-53.
- 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.
- 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.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Diléone M, Lopez-Ganzalez N, Hémandez L.F, Obeso J.A. (2017). Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exper Neurol*, **298**, 148-161.
- Bock B. (2014). *Cistus salvifolius L*, eFlore, la flore électronique de Tela Botanica: 1-7.

- 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.
- Bordt E.A, Polster B.M. (2014). NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair. *Free Rad Biol Med*, **76**, 34-46.
- 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.
- Bouriche H, Saidi A, Ferradji A, Belambri S.A, Senator A. (2016). Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Pistatia lentiscus* extracts. *J Appl Pharm Sci*, **6(7)**, 140-46.
- Bousselsela H, Benhouda A, Yahia M, Benbia S, Ghecham A, Zidani A. (2012). In vitro evaluation of antioxidant and antibacterial activities of extracts of *Hertia cheirifolia*'s leaves. *Nat Sci*, **4**, 825-831.
- Botting R.M, Botting J.H (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clin Drug Investig*, **19**, 1-7.
- Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana, M. (2006) . Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J Ethnopharmacol*, **104**, 104–107.
- Boukhabti H, Chaker A.N, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D.( 2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharm Letters*, **3**, p. 267-275,
- Buckley C.D, Gilroy D.W, Serhan C.N. (2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*, **40**, 315-327.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J.L. (2015). Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA Radiation. *Photochem Photobiol*, **91**, 140-155
- [Camacho-Barquero L](#), [Villegas I](#), [Sánchez-Calvo J.M](#), [Talero E](#), [Sánchez-Fidalgo S](#), [Motilva V](#), [Alarcón de la Lastra C](#). (2007). Curcumin, a curcuma longa constituent acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, **7(3)**, 333-342.
- [Camuesco D.M](#), [Comalada A](#), [Concha A](#), Nieto A, [Lorente M.D](#), [Zaruelo A](#), [Galvez G](#),. (2006). Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr*, **25**, 466-476.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chem*, **93**, 223-226.
- Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P. (2012). Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. *J Neurochem*, **120**: 461-472.

- Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M. (2012). Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Afr J Ecol*, **51**(2), 343-347.
- Connor T.J, Starr N, O'Sullivan J.B, Harkin A, (2008). Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma, *Neurosci Lett*, 441, 29-34.
- Conti P, Reale M, Panara M.R, Barbacane R.C, Bongrazio M, Dempsey R.A, (1991). Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist inhibits lymphocyte blastogenesis induced by concanavalin A. Restorative effect of hrIL-1. *FEBS Lett*, **286**, 137-141.
- 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 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.
- Charles N.S, Peter A.W, Derek W.G (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.
- Cheaib D, El Dara N, Rajha H.N, El-Ghazzawi I, Maroun R.G, Louk N. (2018). Effect of the Extraction Process on the Biological Activity of Lyophilized Apricot Extracts Recovered from Apricot Pomace. *Antioxidants*, **7**(11), 1-10.
- Cheyrier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Amer J Chim Nut*, **81**, 223-229.
- Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M (2011). Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Afr J Ecol*, **51**, 343-34.
- 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.
- [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.
- 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.
- 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.
- Daglia M (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, **23**, 1-8.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, **329**, 23-38.
- Dalto A, Matte J J. (2017). Pyridoxine (Vitamin B6) and the Glutathione Peroxidase System; a Link between One-Carbon Metabolism and Antioxidation. *Nutrients*, **9(189)**, 1-13.
- Damerджи A. (2012). La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale). *Afr Sci*, **08 (1)**: 79 – 87.
- Dangoumau J. (2006). Pharmacologie générale. Edition 2006 Département de pharmacologie. Université.Victor.Segalen.Bordeaux.2.<http://www.scribd.com/doc/24947187/pharmacologie-generale>.
- 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.
- Daum-Badouard C. (2006). Les lésions d'acides nucléiques : détection par HPLC-SM/SM dans les milieux biologiques humains et interet comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat. Grenoble. Université Joseph-Fourier.
- Davies M.J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its cancequences. [\*Biochem Biophys Res Commun\*, \*\*305\(3\)\*\*,761-70.](#)
- Deattu N, Narayanan N, Suseela L. (2012). Evaluation of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Polyherbal Extract by In Vitro Methods. *Res J Pharm Biol Chemical Sci*, **3 (4)**, 727-732.
- Debnath P.C, Das A, Islam A, Islam M.A, Hassan M.M, Gias Uddin S.M. (2013). Membrane stabilization-A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *J Pharmacognosy*, **5**, 104-107.
- Delaporte R.H, Sarragiotto M.H, Takemura O.S, Sanchez G.M, Filho B.P.D and Nakamura C.V. (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*, **95**, 229–233..
- 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.
- Deraedt R, Jougney S, Benzoni J, Peterfalvi M. (1980). Release of prostaglandins E and F in allergic reaction and its inhibition, *Eur J Pharmacol*, **61**, 17–24.
- Diezi J (1989). Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. in "pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Ed.Slatkine-Geneve, 33-44 p.
- Dimcheva V, Carsheva M. (2017). Antioxidant activity and polyphenolic content of the bulgarian wild herb *cistus incanus* l. stored under different conditions. *J Chem Tech Metall*, **52(5)**, 781-790.
- 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.
- Dorward D.A, Lucas C.D, Rossi A.G, Haslett C, Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharm Ther*, 135, 182-199.
- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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.
- Duganath, N., Rubesh Kumar, S., Kumanan, R et Jayaveera, K.N. (2010). Evaluation Of Anti-Denaturation Property And Anti-Oxidant Activity Of Traditionally Used Medicinal Plants. *J Pharm Bio Sci*, **1(2)**, 1-7.
- Elmastas M, Gulcin D, Isildak O, Kufrevioğlu O.D, Dbaoglu K, Aboul-Enein H.Y. (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *J Iran Chem Soc*, **3**, 258-266.
- El-Shabrany O.A, El-Gindi O.D, Melek F.R, Abdel-Khalk S.M, Haggig M.M. (1997). Biological properties of saponin mixtures of *Fagonia cretica* and *Fagonia mollis*. *Fitotherapia*; LXVIII: 219-222.
- 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.
- Emen S, Çeken B, Kızıllı G, Kızıllı M. (2009). DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of *Cyclotrichium niveum*. *Pharm Biol*, **47**, 219-229.

- 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.
- Eteraf-Oskouei T, Allahyari S, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Delazar A, Pashaii M, Gan SH, Najafi M. (2015). Methanolic extract of *Ficus carica* Linn. Leaves exerts antiangiogenesis effects based on the rat air pouch model of inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*. **760405**, 1-9.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol*, **331**, 372-379.
- Farahpour H, Habibi M. (2008). Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of Ceylon cinnamon in mice. *Vet Med*, **57(1)**, 1-5.
- 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.
- Favier A (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes poses par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* **55**, 9-16.
- Fehri B, Aiach M, Mueem K. (2012). Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* aqueous leaf extract, *Pharmacogn Res*, **4(3)**,138-14.
- Ferreira A. Proenc C. Serralheiro MLM, Ara'ujo MEM. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, **108**, 31–37.
- 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.
- Fitzmaurice S.D, Sivamani R.K, Isseroff R.R. (2011). Antioxidant Therapies for Wound Healing: A clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol*, **23**, 113-126.
- Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Uggla M. (2000). Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agre*, **80(14)**,2021–2027.
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2010). Phenolic compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, **15**, 8813–8826.
- 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.
- George V.C, Dellaire G, Rupasinghe H.P.V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem*, **45**, 1-14.

- Ghashghaii A, Hashemnia M, Nikousefat Z, Zangeneh2 M.M, Zangeneh A. (2017). Wound Healing Potential of Methanolic Extract of *Scrophularia striata* in Rats, *Pharm Scie*, **23**, 256-263.
- 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.
- Gobert M, Martin B, Ferlay A, Chiliar, 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.
- Goto S, Radak Z (2013). Implication of oxidative damage to proteins and DNA in aging and it's intervention by caloric restriction and exercise. *J sport health Sci*, **2**, 75-80.
- Gonzales M V M, Tolentino AG. (2014). Extraction and Isolation of the Alkaloids from the Samanea Saman (Acacia) Bark: Its Antiseptic Potential. *Int J Scien Technol Res*, **3(1)**: 119-124.
- 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.
- Gracanin M, Hawkins C.L, Pattison D.I, Davies M.J. (2009). Singlet oxygen mediated-amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic Biol Med*, **47(1)**, 92-102.
- Guha G, Rajkumar V, Kumar R.A, Mathew L. (2011). The antioxidant and DNA protection potential of Indian tribal medicinal plants. *Turk J Biol*, **35**, 233-242.
- Guide illustre de la flore algérienne (2009).
- Guillemot D.(2003). Approche pharmaco-épidémiologique de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Revue Française des Laboratoires*, **354** : 53-55.
- 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.
- Gürbüz P, Demirezer LÖ, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz1 A, Kazaz C (2015). Isolation and Structure Elucidation of Uncommon Secondary Metabolites from *Cistus salviifolius* L.. *Rec Nat Prod*, **9 (2)**: 175-183.
- Haider S, Nazreen S, Alam M.M, Hamid H, Alam M.S. (2012). Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Platanus orientalis* Linn. and its ulcerogenic risk evaluation. *J Ethnopharmacol*, **143**, 236-240.
- 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.
- Haouat A.C, Sqalli H, Farah A, Haggoud A, Iraqui M. (2013). Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytothérapie*, **11**, 365-372.
- 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.
- Headland S.E, Norling L.V (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, 1-12.
- 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.
- Henrotin Y, Deby-Dupont G, Reginster J.Y (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Rev Med Liege*, **566**, 433-442.
- Henzen C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum Med Suisse*, **3 (9)**, 442-446.
- 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.
- Hohn A, Grune T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol*, **1(1)**, 140-144.
- Holbrook NJ, Ikeyama S. (2002). Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem Pharmacol*, **64**, 999-1005.
- Hong J.R, Lin G.H, Lin C.G, Wang W.P, Lee C.C, Lin T.L, Wu J.L.. (2002). Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. *Development*, **131(21)**, 5417-5427.
- Hooks J.J, Chan C.C, Detrick B. (1988). Identification of the Lymphokines, Interferon-gamma and Interleukin-2, in Inflammatory Eye Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Scie*, **29(9)**, 1444-1451.
- Howcroft T.K, Campisi J, Louis G.B, Smith M.T, Wise B, Wyss-Coray T, Augustine A.D., McElhaney J.E, Kohanski R, Sierra F. (2013). The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY)* **5**, 84-93.
- Hurd T.R, DeGennaro M, Lehmann R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol*, **22**, 107-115.
- Hwang H, Kim Y.W, Park Y, Hwang S.J, Kim Y.W, Park Y, Lee H.J, Kim K.W. (2014). Antiinflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res*, **63**, 81-90.

- Hywood V.H .(1996). Les plantes à fleurs, 306 familles de la flore mondiale. Nathan, Paris, 218 .
- Ikobi E, Igwilo C.I, Awodele O, Aaubuiké C. (2012). Antibacterial and Wound Healing Properties of Methanolic extract of dried fresh *Gossypium barbadense* leaves. *Asia J Biomed Pharm Sci*, **2** (13), 32-37.
- Iserin P. (2001). Encyclopedie des plantes medicinales. Paris-France: Larousse Bordas, 14.
- Ishola I.O, Akinyede A, Lawal S.M, Popoola T D, Lawal A.M. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Olax subscorpioidea* Oliv. (Olacaceae) leaf extract in rodents: possible mechanisms of antinociceptive action. *W Afr J Pharm*, **26** (1), 99-112.
- Ishola I.O, Akindele A.J, Adeyemi O.O (2011). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea Vahl* ex DC (Connaraceae) methanolic root extract. *J Ethnopharmacol*, **135**, 55-62.
- Ismail T, Osinga R, Todorov A, Haumer A, Tchang L.A, Epple C, Allafi N, Menzi N, Largo R.D, Kempfen A, Martin I, Scafer D.J, Scherberich A. (2017). Engineered, axially-vascularized osteogenic of grafts from human adipose-derived cells to treat avascular necrosis of bone in a rat model.. *Acta Biomater*, **63**,236-245.
- Iwalewa E.O, McGaw L.J, Naidoo V, Eloff G.N (2007). Inflammation: The foundation of of diseases and disorders: a review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr J Biotechnol*, **6** (25), 2868-85.
- Jayasena T, Poljak A, Smythe G, Braidy N, Münch G, Sachdev P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's Disease. *Ageing Res Rev*, **12**, 867-883.
- 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.
- Jouad H, Maghrani M, Eddouks M (2002). Hypoglycaemic effect of *Ribes fruticosus* L.and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **81** (3), 351-6.
- Jones W.P, 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.
- Judy O, Jenni P, Sharon S. (2014). Immunologie. 7<sup>ème</sup> Ed Dunod, Paris: 800p.
- Kamat J.P, Bolor K.K, Devasagayam T.P. (2000). Chllorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex-vivo. *Biochem Biophys Acta*, **1487** (2-3), 113-127.
- Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh A M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur J Pharmacol*, **735**, 150- 168.

- Kessel L, Tendal B, Jorgensen K.J, Erngaard D, Flesner P, Andresen J.L, Hjortdal J. (2014). Post cataract prevention of flammation and macular edema by steroid and non steroidal anti-inflammatory eye drops. *Ophthalmol*, **121**, 1915-1924.
- Kernouf N, Bouriche H, Kada S, Messaoudi D, Assaf A.M, Senator A. (2018). Anti-inflammatory and Immuno-modulatory Effects of Capparis spinosa Flower Bud Extract. *Ann Res Rev Biol*, (**25**)**3**, 1-11.
- Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K. (2014). Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 52, 177-182.
- Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS ONE*, **5**, 953-959.
- Khantouche L, Motri S, Mejri M, Benabderabba M. (2015). Evaluation of polyphenols and antioxidant properties of extracts *Globularia alypum* leaves. *J New Sci*, **24** (1), 1086-1090.
- Khelifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard J.P, Couderc F, Bouajila J. (2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. *Molecules*, **16**, 10592-10603.
- Khoddami A, Wilkes M.A, Roberts T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, **18**, 2328-2375.
- Khor B, Gardet A, Xavier R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 307-317.
- Kim H.K, Namgoong S.Y, Kim H.P (1993). Antiinflammatory Activity of Fiavonoids:Mouse Ear Edema Inhibition. *Arch Pharm Res*, **16**, 18-24.
- Kim M.S, Yi J.M, Kim S.H, Hong S.H, Kim H.M. (2004). Madimadi, Korean folk medicine, blocks TNF-a, IL-1b, and IL-8 production by activated human immune cells. *Cytokines*, **25**, 179-186.
- 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.
- Kim Y.H, Kwon H.S, Kim D.H, (2008). Piceatannol, a stilbene present in grapes attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int immuopharmacol*, **8**, 1695-1702.
- 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.
- Kizil G, kizil M, Ceken B, Yavuz M, Demir H. (2011). Protective activity of ethanol extracts of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum retusum* Aucher against the protein oxidation and DNA damage. *Int J Food Propert*, 14, 926-940.

- Koheil M.A, Hussein M.A, Othman SM, El-Haddad A. (2011). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* seeds. *Free Radical Antioxid*, **1**(2), 49-61.
- 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.
- 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.
- Koster R, Anderson M, De Beer J, (1959). Acetic acid for analgesic screening, *Federal Proceeding*, **8**, 412-417.
- Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms M.A, van Hogezaand R.A, Lamers C.B, et al. (2003). Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol*, **201**, 17-27.
- Krishna M, Upendra K. (2012). Enhancement of wound healing with roots of *Ficus racemosa* L. in albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2**, 276-80.
- Kumar V, Abul K A, Nelson F, Richard M (2007). Robbins Basic Pathology, 8th Edition, Elsevier, Philadelphia, 20-60.
- 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.
- Kwon K.H, Murakami A, Rayashi R. (2005). Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 647-654.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**,680-685.
- Lahmidani N, Mellouki I, El Yousfi M, Aqodad N, El Abkari M, Ibrahimi 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.
- Lambole V, Upendra K. (2012). Effect of *Moringa oleifera* Lam. on normal and dexamethasone suppressed wound healing. *Asian Pac J Tropic Biomed*, **2**, 219-223.
- Lanneau, D. (2010). Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. Thèse de Doctorat medecine. Université de Bourgogne.

- Laurent P.E and Perrin L.F (1987). L'inflammation, Physiopathologie. *Objectif médical*, No spécial.
- Lavanya R, Maheshwari S.U, Harish G, Raj J.B, Kamali S, Hemamalani D,Varma J.B, Reddy C.U. (2010). Investigation of in-vitro anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritic activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, **1(4)**,746-752.
- Le K, Chiu F, Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, **105**, 353-363.
- 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.
- Lee H.N, Surh Y. J (2012). Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol*, **84**, 1340-1350.
- Lees J.R. (2014). Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. *Cytokine*, **74(1)**, 18-26.
- Leitch A.E, Duffin R, Haslett C, Rossi A.G. (2008). Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol*,**1**, 350-363.
- Leporati M.L, Ghedira K, Haslett C, Rossi A.G. (2009). Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and tunisia. *Ethnobiol Ethnomed*,**5**, 35-38.
- Lewis S.M, Margeret M, Heitkemper S, Dirksen R. (2011). Soins infirmiers: Médecine-Chirurgie. De boek, 305.
- Leza J.C, García-Bueno B, Bioque M, Arango C, Parellada M, Do K, O'Donnell P, Bernardo M (2015). Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neurosci Biobehav R*, **55**, 612-626.
- 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.
- Li J, Chen J, Kirsner R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*, **25**, 9-18.
- Li J, Holbrook N.J. (2003). Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging. *Free Radic Biol Med*. **35**, 292-299.
- Libby P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*, **65(12)**:S140-6.
- Lloyd M.M., Grima M.A., Rayner B.S., Hadfield K.A., Davies M.J., Hawkins C.L. (2013). Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, **65**, 1352-1362.

- Lima B.O, (2004). Efficacy of wogonin in the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 2505-2511.
- Lima A.L.A, Alves A.F, Xavier A.L, Mozzini-Monteiro T, Oliveira T.R.R, Leite F.C, Matias W.N, Branco M.V.S.C, Souza M.F.V, Piuvezam M.R, (2016). Anti-inflammatory activity and acute toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Herissantia tiubae*. *Rev Bras Farmacogn*, **26**, 225-232.
- Linda S, Einbonda, Kurta R, Xiao-Dongluoa, Margaretj B, Edward J and Kennelly (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*, **84**, 23-28.
- Liu W, Liu J, Yin D, Zhao X. (2015). Influence of Ecological Factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PLOS One*, **10(4)**, 1-22.
- 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.
- Loizzo M.R, Ben Jemia M, Senatore F, Bruno M, Menichini F, Tundis R (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem Toxicol*, **59**, 586–594.
- Lopes G.C, Sanches A.C.C, Nakamura CV, Filbo B.P.D, Hernandez L, De Mello J.C.P. (2005). Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Ethnopharmacology*, **99**, 265–272.
- Lowe D.B, Storkus W.J. (2011). Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy*, **3(10)**:1265-74.
- 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.
- Madan S, Prashant S, Neeraj U, Yogesh S, (2011). In-vitro Anti-arthritis Activity of *Manilkara zapota* Linn. *Asian J Pharm Tech*, **1(4)**, 123-124.
- 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-carcinogenic formulations. *Fitoterapia*, **80**, 313-319.
- Mahat M.A, Patil B.M. (2007). Evaluation of Antiinflammatory activity of methanol extract of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models. *Ind J Phar Scie*, **26**, 33-36.
- Mahboubi M, Haghi G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol*, **119( 2)**, 325–327.
- Mahmoudi H, Aouadhi C, Kaddour R, Gruber M, Zargouni W, Zaouali G, Ben Hamida N, Ben Nasri M, Ouerghi Z, Hosni K. (2016). Composition of antioxidant and antimicrobial

- activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Bioscien J Uberlandia*, **32(1)**, 226-237.
- Majdalawieh A.F, Fayyad M.W. (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *Int Immunopharmacol*, **28**, 295-304.
- Majouli K, Hamdi A, Besbes Hlila M (2017). Phytochemical analysis and biological activities of *Hertia cheirifolia* L. roots extracts. *Asian J Trop Med*, **10 (12)**, 1134-1139.
- Majouli K, Besbes Hlila M, Flamini G, Ben Jannet H, Kenani A (2016). *In vitro* antibacterial activity of the *Hertia cheirifolia* L. essential oils. *J Coastal Life Med*, **4(11)**, 865-867.
- Mallem Y, Gogny M. (2014). Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. *J EMC Vet*, 1-12.
- Manez S, REcio M.C, Gil I, Gomez C, Giner R.M, Waterman P.G, Rios J.L (2004). A Glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*. *J Nat Prod*, **62(4)**, 601-604.
- 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.
- 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.
- Martindale J.L, Holbrook N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. **192**, 1-15.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic press, London Chap. 1 and 2, 1-113.
- Martindale J.L, Holbrook N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, **192**, 1-15.
- Martinez-Cayuela M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147-161.
- Martin A.R, Villegas I, La Casa C. (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*, **67**, 1399-1410.
- Maskrey B.H, Megson I.L, Whitfield P.D, Rossi A.G. (2011). Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 1001-1006.
- Massiot G, Nuzillard J.M, Le Men-Olivier L, Aclinou P, Benkouider A, Abdessemed K (1990). Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, **29(7)**, 2207-2210.
- Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan A.Q, Zubair S (2016). Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*, **455**, 161-171.

- Mathieu M.G, Fonteneau J.M. (2008). Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. *Walters Kluwer*, p, 142-146.
- Mayakrishnan V, Veluswamy S, Sundaram KS, Kannappan P, Abdullah N, (2012). Free radical scavenging potential of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl fruits extract. *Asian Pac J Trop Med*, **6**, 20-26.
- Mazzon E.E, Esposito R, Di Paola R. (2009). Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Siringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **380**, 79-94.
- Mbagwu H.O, Anene R.A, Adeyemi O.O. (2007). Analgesic, Antipyretic, and anti-inflammatory properties of *Mezoneuron benthamianum* Bail (*Caesalpinaceae*). *Nig Q J Hos Med*, **17**, 35-41.
- 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*.
- Meziti A, Bouriche H, Meziti H, Kada S, Senator A, Dimertas I. (2017). Antioxidant and antiinflammatory activities of *Rubus fruticosus* and *Zislyphus vulgaris* methanol extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*, **9(2)**, 69-76.
- Michel Y.F, Lin Z.X, Xin Y.X, Zi R, Jian N.C, Xiao P.L, Siu P (2012). Effect of *Rhizoma Polygonati* on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. *J Ethnopharmacol*, **142**, 851-856.
- Michell R.N, Cotran R.S. (2000). Robinson's Basic Pathology. 7<sup>th</sup> Ed, Harcourt India, New Delhi, 33.
- Milano J, Oliveira S.M, Rossato M.F, Sauzem P.D, Machado P, Beck P, Zanatta N, Martins M.A.P, Mello C.F, Rubin M.A, Ferreira J, Bonacorso H.G. (2008). Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol*, **581**, 86-96.
- Mishra B.B, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohe N, Griffiths G, Moita L.F, Anes E. (2010). **Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome.** *Cell Microbiol*, **12**, 1046-1063
- Mohamed Saleem T.K, Azeem A.K, delip C, Sankar C, Prasanth N.V, Duraisami R. (2011). **Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees.** *Asian Pac J Tropic Biomed*, **147-149**.
- [Mohsenzadegan M](#), [Mirshafiey A](#). (2012). The immunopathogenic role of reactive oxygen in Alzheimer disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, **11(3)**, 203-16.
- Moniczewski A, Gawlik M, Smaga I, Niedzielska E, Krzek J, Przegaliński E, Pera J, Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol Reports*, **67**, 560-568.

- Mota M.L, Thomas G, Barbosa Filho J.L. (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol*, **13(3)**, 289-300.
- Motamed S.M, Naghibi F. (2010). Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chem*, **119**, 1637-1642.
- Munita J.M, Arias C.A. (2016). Mechanisms of antibiotics resistance. *Microbiol Spectrum*, **4(2)**, 1-16.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem pharmacol*, **71**, 1331-1336.
- Murugan R, Parimelazhagan T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. An in vitro approach. *J King Saud Univ Sci*, **26**, 267-275
- Muzamal I, Robert V, Korthout H, Mustafa N.R. (2013). Phytochemicals as apotential source for TNF- $\alpha$  inhibitors. *Phytochem Rev*, **12**, 65-93.
- Nagata N ,Yamashida I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit.J. Japan. *Sco Food Sci Technol*, **39** (10), 925-928.
- Naidu M.M , Shyamala B.N, Naik P.J, Sulochanamma G, Srinivas P.(2011). Chemical composition and antioxidant. *Sco Food Sci Technol*, **39** (10), 925-928. Activity of husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Sci Technol*, **44 (2)**, 451-456.
- 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.
- Noack M, Kolopp-Sarda MN. (2018). Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Fr Lab*, **489** (3), 28- 37.
- Nordberg J, Arnér E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med*, **31**, 1287-1312.
- Ojewole J.A. (2007). Analgesic, anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of (Baker F.) *chirindensis* [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*, **113(2)**, 338-345.
- Okoli C.O, Akah P.A, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O. 2007. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *J Ethnopharmacol*, **109**, 219–225.
- Oliveira Ganzalez A.C, Costa T.F, Arojo Andrade Z., Piexoto modrado A.R.A (2016). Wound healing: A literature review. *An Brass Dermatol*, **91** (5), 614-20.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2008). Guideline for testing of chemicals, 425, Acute oral toxicity-fixed dose method. Paris.

- 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-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytother*, **10**, 286-292.
- Oubenchiker K., Karim A., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyayat A., Melhaoui A., Aziz M (2014). Inhibitory Effects of *Cistus salvifolius* on Contractile Responses in the Isolated Rabbit and Rat Jejunum. *Res J Pharm Biol Chem Scie*, **5** (4), 1450- 1456.
- Oyedapo O.J, Ekundayo O, Koenig, W.A. (2004). Leaf volatile oil constituents of *Lantana camara* L. from Nigeria. *Flav Fragr J*, **18**, 384-386.
- Oyedapo O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *Int J Plant Physiol Biochem*, **2**, 46–51.
- Ozen T, Demirtas I, 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.
- Parikh B, Patel V.H. (2017).. Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit:Rayan[*Manilkara hexandra*(Roxb.)Dubard]. *Food Sci Human Welln*. **6**(1), 10-19.
- Park M.H, Kim D.H, Lee E.K, Kim N. D, Im D.S, Lee J, Yu B.P, Chung H.Y (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch Pharm Res*. **37**, 1507-1514.
- Parvataneni R., Rao PR., Archana J., Rao NK. (2005). Anti-inflammatory Activity of a New Sphingosine Derivative and Cembrenoid Diterpene (Lobohedleolide) Isolated from Marine Soft Corals of *Sinularia crassa* TIXIER-DURIVault and *Lobophytum* species of the Andaman and Nicobar Islands. *Biol Pharm Bull*, **28**,1311-1313.
- 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.
- Perihan G, Lütfiye O.D, Zühal G, Ayşe K, Cavit K. (2015). Isolation and Structure Elucidation of Uncommon Secondary Metabolites from *Cistus salvifolius* L. *Rec Nat. Prod*, **9** (2), 175-183.
- Phaniendra A, Jestadi D.B, Periyasamy L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* , **30**(1), 11–26.
- Piao M.J, Kim K.C, Chae S, Keum Y.S, Kim H.S, Hyun J.W, (2013). Protective effect of fisetin against  $\gamma$ -irradiation-induced oxidative and cell damage. *Biomol Ther*, (**21**)**3**, 210-215.

- Pierangeli G, Vital G, Windell Revera L.J, (2009).. *Plants Res*, **(3)7**, 511.
- 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.
- Pisoschi A.M, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, **97**, 55-74.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre. *Rev Gen Indus*, **4**, 25-39.
- Pogozelski W.K, Tullius T.D.(1998). Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chem Rev*, **98** (3), 1089-1108.
- 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.
- 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](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.
- Priya K.S, Gnanamani A, Radhakrishman N, Babu M. (2002). Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *Ethnopharmacology*, **83**, 193-199.
- Psotová J, Lasovský J, Vicar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Pap*, **147**, 147-153.
- Qa'dan F, Nahrstedt A, Schmidt M. (2011). Isolation of two new bioactive proanthocyanidins from *Cistus salvifolius* herb extract. *Pharmazie*, **66**, 454-457.
- Que F, Mao L, Pan X (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, **39**, 581-587.
- Quezel P, Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS Ed, Paris, Vol.2, 566-1170.
- Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease . *Pharmacol Res*, **68**(1), 125-131.
- Raedschelders K, Ansley D.M, Chen D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, **133**, 230-255.
- 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*, **11**, 1-10.
- Rahman M.S, Islam M.B, Rouf M.A, Jalil M.A, Raque M.Z (2011). Extraction of alkaloids and oil from Karanja (*Pongamia pinnata*) seed. *J Scie Res*, **3**, 669-675.
- Rathinam V.A, Fitzgerald K.A. (2016). Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, **165**, 792–800.
- Rebaya A , Igueld Belghith S, Cherif J.k , Trabelsi-Ayadi M. (2016). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Rokrose (*Cistus salviifolius*) Leaves and Flowers Grown in Tunisia. *In J Pharm phytochem Res*, **8(2)**, 327–331.
- Remila S, Atmani-kilani D, Delamasure S, Connat J.L, Azib L, Richard T, Atmani D. (2015).. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med*, **8**, 1-13.
- Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation (2002). *J Pharmacol Exp Ther*, **302(3)**:839–45
- Rios J.L and Recio M.C (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, **100**, 80-84.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 410-424.
- 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.
- Saito S, Lin Y.C, Tsai M.H, Lin C.S, Murayama Y, Sato R, Yokoyama K.K. (2015). Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *Kaohsiung J Med Sci*, **31**, 279-286.
- 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.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*, **91**, 621-632.
- Samudram P, Vasuki R, Rajeshwari H, Geetha A, Sathiyamoorthi P. (2009). Antioxidant and antihepatotoxic activities of ethanolic crude extract of *Melia azedarach* and *Piper longum*. *J Med Plants Res*, **3**, 1078-1083.

- Sanchez-Fidalgo, S., A. Cardeno, I. Villegas, Talero E, De La Lastra C.A. (2010). Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*, **633**, 78-84.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali Dell Istituto Superiore di Sanita*, **43**: 394-405.
- Saralla G, Jegadeesan S. (2015). Anti-Inflammatory Activity of *Jasminum sambac* (L.) Ait. (var. Bell of India) Leaves. *Int J Curr Res Bioscie Plant Biol*, **2(4)**, 157-160.
- Seragui S, Derraji S, Mahassin F, Cherrah Y. (2013). Résistance bactérienne: Etat de lieu au Maroc. *Maroc Med*, **35(3)**, 199-205.
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci*, **32**, 17-20.
- Shan B, Cai Y.Z, Brooks J.D, Cork H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol*, **117(1)**, 112-9.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, **38**, 347-352.
- 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.
- Saralla R.P, Jeegadeesan A, Yamamoto-Furusho J.K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **14**, 4280-4288.
- Sayah K, Marmouzi I, Mrabti H.N, Cherrah Y, Faouzi M.E (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *Bio Med Res Int*, 1-7.
- 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.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Ex Toxicol Pathol*, **54(4)**, 313- 318.
- Sethiya N.K, Trivedi A, Mishra S. (2014). The total antioxidant content and radical scavenging investigation on 17 phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. *Biomed Prev Nut*, **4**, 439-444.
- 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.
- Schweizer S, Von Brocke AF, Boden SE, Bayer E, Ammon HPT, Safaihi H. (2000). Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory effects boswellic acid analogues, *J Nat Prod*, **63**, 1058-1061.

- 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, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, **6**, 1191-7.
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C. (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol*, **77**, 200-204.
- Shin H.S, Satsu H, Bae M-J, Zhao Z, Ogiwara H, Totsuka M, Shimuzu M. (1981). Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem*, **168**, 167-175.
- Smaga I, Niedzielska E., Gawlik M., Moniczewski A., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Reports*, **67**, 569-580.
- Smith A.R, Shenvi S.V, Widlansky M, Suh J.H, Hagen T.M, (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, **11**, 1135-1146.
- Sokeng S.D, Koubé J, Dongmo F, Sonnhaffouo S, NKono ya Nkono B.L. Taiwé G.S, Cherrah Y, Kamtchouing P (2013). Acute and chronic anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Acacia nilotica* (L.) Del. (Fabaceae) pods. *Acad J Med Plants*, **1(1)**, 1-5.
- Soro T.H, Traore F, Sakande J. (2009). Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *C R Biol*, **332**, 371-377.
- Sowndhararajan K, Kang S.C. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi J Biol Sci*, **20**, 319-325.
- 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.
- Stevens A, Lowe J. (2009). Core Pathology. Ed Mosby Elsevier, China, 50-54.
- Strehl A, Spies C.M, Buttgerit F. (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids, *Clin Exp Rheumatol*, **5 (68)**, 13-18.
- Sugamura K, Keaney J.F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Rad Biol Med*, **51**, 978-992.
- Sung C.C, Hsu Y.C, Chen C.C, Lin Y.F, Wu C.C. (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*. 1-15.
- Suntar I, Baldemir A, Coskun N, Keles H, AKkol E.K. (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *Ethnopharmacology*, **135**, 63-70.

- 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.
- Suriyamoorthy S, Subramaniam K, Raj-Durai S.J, wahaab F, Chitraselvi R.P.E. (2014). Evaluation of wound healing activity of *Acacia caesia* in rats. *Wound Med*, **7**, 1-7.
- Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne J.O, 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.
- Taleb-Dida N, Krouf D, Bouchenak M (2011). *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutr Res*, **31**, 488-495.
- 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.
- Taniolo C, Nicoletti M (2014). HPTLC Analyses on Different Populations of *Cistus salvifolius* L. *Austin Chromat*, **1(4)**: 1-4.
- 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.
- Taghzouti O.K, Balouiri M, Ouedrhiri W. Echahad A, Romane A. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. *J Mater Environ Sci*, **7(6)**, 1988-1995.
- Takwi A.L, Li Y, Buscaglia L.E.B, Zhang J, Choudhury S, Park A K, Liu M, Young K H, Park W-Y, Martin R.C.G, Li Y. (2012). A statin-regulated microRNA represses human c-Myc expression and function. *EMBO Mol Med*, **4(9)**, 896-909.
- Tawaha F, Alali F.Q, Gharaibeh M. Mohammad M, El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species.. *Food Chem*, **104(4)**, 1372-1378.
- Teixiera L.K, Fonseca B.PF, Barboza B.A, Viola J.PB. (2005). The role of interferon- $\gamma$  on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **10** (1), 137-144.
- Terblanche U, Semakalu CC, Mtunzi F, Pillay M. (2017). Screening of Variables Influencing Extraction Yield of *Cotyledon orbiculata*: 2 3 Full Factorial Design. *J Pharmacogn Phytochem Res*, **9(3)**, 303-312.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*, **1(1)**, 98–106.
- Tjolsen A, Berge O.G, Hunskaar S, Rosland J.H, Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, **51**, 5–17.

- Toniolo C and Nicoletti M (2014). Vitamin HPTLC Analyses on Different Populations of *Cistus salvifolius L.*, *Austin Chromatography*, **1**(4), 1-4.
- Too L.K, Ball H.J, MacGregor I.S, Hunt N.H. (2014). The pro-inflammatory cytokine interferon-gamma is an important driver of neuropathology and behavioural sequelae in experimental pneumococcal meningitis, *Brain Behav Immun*, **40**, 252-268.
- Traber K.J, Atkinson J. (2002). Vitamine E Antioxydant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, **43**(1), 4-15.
- Tracey K.J (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853-859.
- Tréchet P, Jouzeau J.Y (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des AINS: Chemical and pharmacological basics of NSAIDs, *Rev fr Allergol*, **54** (3), 212–217.
- Tsuchiya H and Linuma M (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, **7**, 161-165.
- Udegbunam S.O, Udegbunam R.I, Muogbo C.C, Anyanwu M.U, Nwaehujor CO. (2014). Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss. in rats. *BMC Compl Alter Med*, **14**, 157-162.
- 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.
- Umopathy E, Ndebia E.J , Meeme A, Adam B, Menziura P, Nkeh-Chungag B.N, Iputo J.E. (2010). An experimental evaluation of *Albica setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *J Med Plant Res*, **4** (5), 789-795.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2009). Free radicals enhance metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **160**(1), 1-40.
- 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).  $\beta$ -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, **46**, 299–304.
- Vanboudole Y.G.J, Keijer J, Knaapen A.M, Heil S.G, Briedé J.J, van Schooten F.J, Godschalk R.W.L (2009).  $\beta$ -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 oxigénio et de nitrogénio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim Nova*, **30**, (5) 1323-1338.
- Vasudevan M, Gunnam K.K, Parle M. (2007). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Thespesia populnea* bark extract, *J Ethnopharmacol*. **109**, 264–270.
- Vaubourdolle M. (2013). *Infection*, 4eme Ed. Walters Climers. **Pp**,183.

- Ventola C.L. (2007). The antibiotic resistance crisis: Causes and threats ,*PMC J.* **40**, 277–283.
- 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.
- Verma K, Shrivastava D, Kumar G, (2015). Antioxidant activity and DNA damage inhibition in vitro by a methanolic extract of *Carissa carandas* (Apocynaceae) leaves. *J Taibah Univ Sci*, **9**, 34-40.
- Villegas I, Sanchez-Fidalgo S, Alarcon De la Lastra C. (2008). New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*, **52(9)**, 1040-1061.
- Wantana R, Tassanee N, Subhadhirasakul S (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *J Nat Med*, **63**, 290-296.
- Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- Williams L.A, O'Connar A, Latore L, Denis O, Ringer S, Whittaker J.A, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W. (2008). The in vitro antidenaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J*, **57**, 327–31.
- [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.
- Wynn T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, **208**, 1339-1350
- Yadav M, Yadav A, Yadav J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. , *Asian J Pac Tropic Med*, **7(1)**, S256-S261.
- Yasmeen M, Gupta P. (2016). In vitro demonstration of *Dalbergiasissoo* (Indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for sunscreens and DNA nick prevention. *Int J Pharm Pharm Sci* , **8(6)**, 175-181.
- Yazdani D, Zainal Abidin M.A, Tan Y.H, Kamaruzaman S, Jaganath I.B. (2012). Screening of phytochemical from ethnomedicinal plants in Malaysia for use against toxigenic *Aspergillus flavus*. *J Med Plants Res*, **6(42)**, 5464-5468

- Yeruham I, Orgad U, Avidar Y, Perl S, Liberboim M, Adler H, Shlosberg A. (2002). A urinary retention syndrome in beef cows probably caused by ingestion of *Cistus salvifolius*. *Revue Méd Vét*, **153** (10), 627-632.
- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains, J. Ethnopharmacol. **46**, 133-152.
- Yogannadam G.P, Ilango K, Suchitra D. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of *Punica granatum* L. (Lythraceae), *Int J PharmTech Res*, **2**(2), 1260-1263.
- Yoon J.H, Baek S G. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties, *Yonsie Med J*. **46**(5), 585-596.
- Ziche M, Jones J, Guillino P.M. (1982). Role of prostaglandins E1 and copper in angiogenesis, *J Nat Cancer Inst*, **69** (2), 475-482.
- Zienalia M, Rezaeic S.A, Hosseinzadeha H. (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances, *Biomed Pharmacother*, **92**, 998-1009.
- Zhao S, Zhao X, Su H, Liu X, Suo X, (2010). Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine. *Chin Anim Husbandry Vet Med*, **37**, 35-38.
- Zhang B.B, Zhao K, He W.Q, Wang D, Zang D, Chen K, Wang G, Gao F, (2011). Study on optimal condition of MTT in PBMC transformation. *Progress Vet Med*, **3**, 65-68.
- Zhang B.B, Zhao K, (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant anti-inflammatory effects. *Curr Opinion Food Sci*, **8**, 33-42.
- 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.
- Zennaki S, Krouf D, Senouci D, Bouchenak M (2009). *Globularia alypum* lyophilized methanolic extract decreases hyperglycemia and improves redox status in various tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Complement Integr Med*, **6** (1), 34.
- Zeinali M, Rezae S A, Housseinzadeh H. (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*, **92**, 898-1009.
- 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.

## ملخص

تم في هذه الدراسة تقدير الفعالية المضادة للالتهاب، للأوكسدة و للبكتيريا للمستخلص المائي و الميثانولي لكل من *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*. بين التقدير الكمي للمركبات الفينولية أن المستخلصات الميثانولية تحتوي على أعلى كمية من الفينول، الفلافونويدات و الدباغ مقارنة بالمستخلصات المائية. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 و 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة في تثبيط وذمة الرجل المحفزة بالكراجين بنسب تراوحت بين 29% و 91%. من جهة أخرى أظهرت المعالجة الموضوعية للفتران بـ 2 مغ/الأذن من المستخلصات المائية و الميثانولية تثبيطاً للالتهاب الأذن المحفزة بزيت croton بنسب تراوحت بين 77% و 85%. كما أدت معالجة الفتران بـ 1مغ/مل من المستخلصات المائية و الميثانولية إلى انخفاض معنوي لهجرة الخلايا المتعادلة نحو موقع الإلتهاب، تراوحت نسب التثبيط بين 38% و 65%. كما أدت معالجة الجرذان بجرعة 200مغ/كغ من المستخلصات إلى تثبيط تشكيل النسيج الحبيبي و انخفاض في الوزن الجاف لكريات القطن بنسب تراوحت بين 17.5% و 42%. أدى أيضا تطبيق مرهم تحوي 2% من المستخلصات إلى شفاء كل الجروح المحدث في الجرذان بعد 15 يوم من العلاج بنسب تراوحت بين 80% إلى 90%. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 او 400 مغ/كغ من المستخلصات المائية و الميثانولية قدرة معتبرة على تثبيط الألم المحدث بمحض الأستيك و الفورمالدهيد بنسب 18-80% و 25-80% على الترتيب. كل المستخلصات تثبط إتلاف بروتين الألبومين بنسب تتراوح بين 65 و 91% و تثبط تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب بين 15% و 96% و بينت قدرة على تثبيط افراز TNF- $\alpha$ , IL-8, INF- $\gamma$ , IL-1. كما بينت النتائج أن كل المستخلصات أبدت قدرة عالية مضادة للجذور الحرة و أظهرت قدرة معتدلة لإستقلاب المعادن و قدرة إرجاع متعلقة بالتركيز لا بأس بها. تثبط كل المستخلصات أكسدة حمض البينولويك بنسب تراوحت بين 29-94% و كذلك أكسدة كل من البروتينات و ADN بنسب 78-98%. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي و الميثانولي لـ *Cistus salvifolius* تثبط نمو 8 سلالات بكتيرية في حين لم تبدي كل المستخلصات أي تثبيط على الفطريات. خلاصة، فإن المستخلصات المائية و الميثانولية لكل من *Cistus salvifolius* و *Globularia alypum* و *Hertia cheirifolia* لها خصائص مضادة للالتهاب و مضادة للأوكسدة، في حين أن *Cistus salvifolius* فقط لديه نشاط مضاد للجراثيم معتبر. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذه النباتات لعلاج بعض الاضطرابات المرتبطة بالالتهاب و الأوكسدة.

الكلمات المفاتيح: مضادات الالتهاب، مضادات الجراثيم، مضادات الأوكسدة، مستخلصات النباتات، *Hertia cheirifolia* *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Résumé

La présente étude a été désignée pour l'évaluation des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des extraits aqueux (E.Aq) et méthanoliques (E.Met) de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum* et *Cistus salvifolius* en utilisant plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*. Les dosages ont montré que les E. Met sont plus riches en polyphénols, flavonoïdes et en tanins que les E. Aq. *In vivo*, le traitement par voie orale des rats par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe l'œdème de la patte induit par la carragénine avec une inhibition entre 29% et 81%. D'une autre part, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.Aq ou E.Met a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 77%-89%. Le traitement des souris par 1 mg/poche d'E.Aq ou d'E.Met réduit significativement le nombre des leucocytes migrés vers le site enflammé avec un pourcentage de 38-65%. De même, le traitement des rats par 200 mg/Kg d'extraits inhibe la formation du granulome et le poids sec des pelletes en coton avec un pourcentage de 17.5-40%. L'application locale des pommades des extraits a réduit la surface des plaies 80-90%. Le traitement des souris par 200 ou 400 mg/kg d'E.Aq ou E.Met inhibe 18-80% et 25-80% la douleur induite par l'acide acétique et le formaldéhyde, respectivement. *In vitro*, tous les extraits ont prévenu la dénaturation du BSA avec 65-91%, ont inhibé l'hémolyse des érythrocytes avec 15-91% et ont inhibé la libération de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 et IL-1. D'autre part, les deux extraits montrent une forte activité anti-radicalaire et une activité chélatrice modérée. De même, les extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant, inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 29-94% et l'oxydation de l'ADN et des protéines avec 78-98%. Finalement, L'effet antibactérien des deux extraits a été déterminé sur 10 souches bactériennes et 3 souches fongiques par la méthode de diffusion sur l'agar. Enfin, les résultats ont révélé que Aq.E et Met.E de *Cistus salvifolius* ont le plus large spectre d'activité contre 8 souches, mais aucun effet n'a été observé sur les espèces fongiques avec tous les extraits testés. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, de *Globularia alypum*, de *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques de *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, alors que seul *Cistus salvifolius* présente une activité antibactérienne remarquable. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et au stress oxydant.

**Mots clés:** anti-inflammatoire, antibactérien, antioxydant, extraits de plantes, *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius*

## Abstract

The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial activities of aqueous (Aq. E) and methanolic (Met. E) extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* using several models *in vivo* and *in vitro*. Results showed that Met. E are richer in polyphenols, flavonoids and tannins than aqueous ones. *In vivo*, the oral administration of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq.E and Met.E, inhibited the carragenane induced paw edema with 29% - 91%. The local treatment of mice with 2 mg/ear of Aq.E or Met.E inhibited croton oil induced ear edema with 77-89%. The treatment of rats with 1mg/pouch of Aq.E or Met.E decreased significantly the number of leucocytes migrated to inflammation site with 38-65%. Similarly, the treatment of rats by 200 mg/kg of extracts inhibited the granuloma dry weigh formation by 17.5-40%. The topical application 2% extracts reduced wound area by 80-90% after 15 days of treatment. Moreover, the treatment of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq. E and Met.E inhibited the pain induced by acetic acid and formaldehyde with 18-80% and 25-80%, respectively. *In vitro*, all extracts prevented BSA denaturation by 65-91%, inhibited the erythrocytes hemolysis by 15-91% and decreased the release of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1. On the other hand, all extracts showed high antiradical activity against DPPH radicals and moderate chelating activity. All extracts showed a good concentration dependent reducing power and inhibited linoleic acid oxidation by 29-94% and protected DNA, protein and lipid oxidation by 78-98%. Finally, the results revealed that Aq.E and Met.E of *Cistus salvifolius* has the broadest spectrum of activity against 8 strains but no effect has been observed against fungal species with all extracts tested. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of *Hertia cheirifolia*, *Globularia alypum*, *Cistus salvifolius* exhibit anti-inflammatory, antioxidant, while only *Cistus salvifolius* exhibits antibacterial activity. Taken together, this study supports the traditional use of these plants to treat some disorders related to inflammation and oxidative stress.

**Key words:** anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, plant extracts, phytothérapie, *Cistus salvifolius*, *Globularia alypum*, *Hertia cheirifolia*.