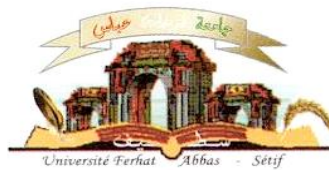


Université Ferhat Abbas
Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف
1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/ 2018

THÈSE

Présentée par

MADOUÏ SORAYA

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

Activités Biologiques Des Extraits De *Cytisus Triflorus*

Soutenue publiquement le **15/12/2018**

DEVANT LE JURY

Président	Arrar Lekhemici	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Charef Noureddine	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Boumerfek Sabah	Pr. MBI BBA
	Sobhi Widad	MCA. UFA Sétif 1
	Mosbah Asma	MCA. UFM Constantine
	Diafat Abdelouahab	MCA. MBI BBA

Laboratoire de Biochimie Appliquée



Remerciement

Quel que soit la longueur du serpent, il a toujours une tête ! « Proverbe Ivoirien ». La voilà donc dans mon cas, cette ... tête (la thèse) soutenue après de longues épreuves et de joies partagées avec une équipe, des amis et une famille.

Je remercie DIEU Tout Puissant, Maître des cieux et de terre, qui nous a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord, Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Pr. CHAREF, responsable de cette étude, qui m'a permis de réaliser ce travail sous sa direction, m'a accueilli dans son laboratoire et ma permis de travailler dans les meilleures conditions. Je ne pourrai jamais oublier sa disponibilité, son assistance et ses conseils judicieux pour moi. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec lui.

Nous remercions vivement le Pr. ARRAR Lekhemici qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Nos remerciements vont aussi à Pr. Boumerfek Sabah, Dr. Sobhi Widad, Dr. Mosbah Asma et Dr. Diafat Abdelouahab Pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique et spécialement Dr. SAFSAF.

En fin, Je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les membres de notre équipe laborantine, en particulier, KHITHER HANANE, BENBRINIS SOUMIA, Dr. AOUACHRIA SANA, MOKHNACHE KAMEL, KADA SEOUSSEN et Dr. BENCHIKH DALILA qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ma famille, notamment:

*À mes parents qui m'ont tout donné sans rien en retour et
qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.*

*À mon mari Yanis, pour sa patience, son soutien et ses nombreux encourage-
ments.*

À mes adorables filles INES, SERINE et ANAIS.

*À mes frères DJAMEL et ABDEL GHANI et À mes sœurs SONIA, LINDA
et SAMIA qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont toujours soutenu et
encouragée psychologiquement.*

À mes oncles RAZEK et AZEDINNE qui m'ont toujours soutenus.

*À mes cousins ABDENOUR, ILYESS, SAMI, MASSI, SALIM, YACINE,
NASSIMA, LAMIA, DJEGDJIGA, ZINA, SABRINA et INES.*

*À mes neveux et nièces: DJAGDJEGA, YOUNA, FARINASE, KAFIA,
TIZIRI, LINA, NILIAN, MISSIPSSA, THILILI, DALIA, YASMINE,
SYPHAX et THANINA.*

*À ma meilleure amie d'enfance DJABARI SORORE qui a contribué de près à la
réalisation de ce travail.*

À toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

À tous mes amis en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.

Ainsi qu'à toutes les amies qui ont répondu à notre invitation.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى إجراء تقييم للأنشطة البيولوجية لنبته *Cytisus Triflorus* : المضادة للأكسدة، المضادة للجراثيم والمضادة للالتهاب والواقية للكبد. يكشف التقدير الكمي عديدات الفينول و الفلافونويدات وجودها في جميع المستخلصات (E.Br و E.Ch و E.Ae و E.Aq و E.Ep) حيث سجل مستخلص إيثيل أسيتات أعلى كمية و التي تقدر ب 2.02 ± 98.11 ميكروغرام مكافئ غرامي كارستين/مغ من المستخلص.

أظهرت النتائج أن المستخلصات تملك قدرة مضادة للأكسدة والمستخلص الخام هو الأكثر نشاطا. تم تحديد التأثير المضاد للميكروبات لمختلف المستخلصات على 10 سلالات بكتيرية و 5 سلالات فطرية بواسطة طريقة الانتشار على الأغار. كشفت النتائج عن نشاط مضاد للجراثيم ملحوظ ولكن لم يلاحظ أي تأثير على الأنواع الفطرية.

من أجل استبعاد السمية المحتملة بسبب المستخلص الخام ، تم إجراء دراسة نسيجية للكبد والكليتين ، كما تم تحديد المعايير الكبدية والكلىوية. أظهرت النتائج ان الجرعة المعطاة 2 غ/كغ لم تسبب أي اثار سمية كبدية وكلىوية.

لتقييم الفعالية الواقية للكبد (وقائية وعلاجية) في الفئران ، تم تحريض السمية الكبدية بواسطة CCl_4 قبل أو بعد معالجة الفئران لمدة 7 أيام بالمستخلص. أظهر المستخلص الخام عند 400 مغ/كغ تأثيرا معنويا مع تحسن في حالة علامات الإجهاد التأكسدي (GSH ، CAT ، SOD و MDA) و المؤشرات البيوكيميائية الكبدية. تم تأكيد هذه الإمكانية المضادة للسموم عن طريق دراسة المقاطع النسيجية.

وأظهرت الأنشطة المضادة للالتهاب أن إعطاء 200 و 400 مغ/كغ من المستخلص E.Br يثبط تورم الرجل المحفزة بالكراجينين في الفئران من 83٪ إلى 88٪. بالإضافة إلى ذلك، التطبيق المحلي لمرهم المستخلص الخام خفضت منطقة الجرح بـ 90٪. وأخيراً، تم التأكد من التأثير الواقي للمعدة للمستخلص الخام عند 400 مغ/كغ من خلال استعادة البنية الطبيعية لمعدة الفئران.

في الختام ، تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذا النبات لعلاج بعض الاضطرابات المرتبطة بالالتهاب والأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Cytisus triflorus* ، مضاد للأكسدة، سمية كبدية، مضاد للجراثيم، مضاد للالتهاب.

Résumé

Le present travail a pour l'objectif d'effectuer l'évaluation des activités antioxydantes, anti-hépatotoxique, antimicrobienne et anti-inflammatoire des extraits de *Cytisus triflorus*.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes révèle leur existence dans tous les extraits (E.Br, E.Ch, E.Ae, E.Aq et E.Ep), et l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en composés phénoliques avec un taux de $98.11 \pm 2.02 \mu\text{g EAG/mg}$.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que les extraits sont dotés d'un pouvoir antioxydant important ; l'extrait brut est le plus actif. L'effet antimicrobien des différents extraits a été déterminé sur 10 souches bactériennes et 5 souches fongiques par la méthode de diffusion sur l'agar. Les résultats ont révélé une activité antibactérienne remarquable mais aucun effet n'a été observé sur les espèces fongiques.

In vivo, afin d'exclure une éventuelle toxicité due à l'extrait brut, une étude histologique du foie et des reins a été réalisée. Les résultats ont montré l'absence de toxicité hépatique et rénale suite à l'administration de la dose de 2 g/Kg.

Pour évaluer le pouvoir hépato-protecteur (préventif et curatif) chez le rat, l'hépatotoxicité a été induite par CCl_4 avant ou après le traitement des rats pendant 7 jours. L'extrait brut à 400 mg/Kg a montré un effet hépato-curatif important avec une amélioration du statut des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA) et les paramètres biochimiques hépatiques. Ce potentiel antihépatotoxique est confirmé à travers une étude histologique.

Les activités anti-inflammatoires ont montré que l'administration de 200 et 400 mg/kg d'E.Br a inhibé l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats de 83% à 88%. De plus, l'application locale de pommade à base d'extrait brut a réduit la surface des plaies à 90%. Enfin, l'effet gastroprotecteur de l'extrait brut à 400 mg/Kg est confirmé par la restauration de l'architecture normale de l'estomac des rats.

En conclusion, cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et au stress oxydant.

Mots-clés : *Cytisus triflorus*, antioxydant, hépato-toxicité, antibactérien et anti-inflammatoire.

Abstract

The present work has for objective to carry out the evaluation activities antioxidant, anti-hepatotoxic, antimicrobial and anti-inflammatory.

The determination of polyphenols and flavonoids reveals their existence in all extracts (E.Br, E.Ch, E.Ae, E.Aq and E.Ep), and the ethyl acetate extract is the richest in phenolic compounds with a level of $98.11 \pm 2.02 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$.

The results obtained *in vitro* showed that the extracts have an important antioxidant power; the crude extract is the most active. The antimicrobial effect of the various extracts was determined on 10 bacterial and 5 fungal strains by the diffusion method on the agar. The results revealed remarkable antibacterial activity but no effects were observed on the fungal species.

In vivo, in order to exclude any toxicity due to the crude extract, a histological study of the liver and kidneys was performed. The results showed the absence of liver and kidney toxicity with the dose of 2 g/kg.

To evaluate hepatoprotective (preventive and curative) potency in rats, hepatotoxicity was induced by CCl_4 before or after treatment of rats for 7 days. The crude extract at 400 mg/kg showed a significant hepatocurative effect with an improvement in the status of oxidative stress markers (GSH, CAT, SOD and MDA) and hepatic biochemical parameters. This antihepatotoxic potential is confirmed through a histological study.

Anti-inflammatory activities showed that administration of 200 and 400 mg/kg E.Br inhibited carrageenan-induced paw edema in rats from 83 % to 88 %. In addition, the local application of crude extract ointment reduced the wound area to 90 %. Finally, the gastroprotective effect of the crude extract at 400 mg/kg is confirmed by the restoration of the normal architecture of the stomach of rats.

In conclusion, this study supports the traditional use of this plant to treat certain disorders related to inflammation and oxidative stress.

Keywords: *Cytisus triflorus*, antioxidant, hepatotoxicity, antibacterial and anti-inflammatory.

Liste des Figures

Fig. 1: photos de <i>Cytisus triflorus</i>	4
Fig. 2: CI ₅₀ des différents extraits de <i>C. triflorus</i> vis-à-vis du radical DPPH.....	47
Fig. 3: Test de piégeage de l'ABTS des extraits de <i>C. triflorus</i> et de l'acide Ascorbique.....	48
Fig. 4: Cinétique de blanchissement du β-carotène à 490 nm	49
Fig. 5: Pouvoir réducteur des extraits de <i>C.triflorus</i>	50
Fig. 6: Activité chélatrice des extraits de <i>C. triflorus</i>	52
Fig. 7: Effet anti-hémolytique des extraits de <i>C.triflorus</i>	53
Fig. 8: Effet piégeur du radical superoxyde par les extraits d <i>C. trifloru</i>	54
Fig. 9: Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits de <i>C. triflorus</i>	55
Fig. 10: Effet piégeur du radical hydroxyle par les extraits de <i>C. triflorus</i>	56
Fig. 11: Paramètres biochimiques de contrôle et des rats traités par l'extrait brut de <i>C.triflorus</i> , mesurés pendant la toxicité aiguë.....	59
Fig. 12: Coupe histologique du tissu hépatique et rénale des rats traités avec l'extrait brut de <i>C.triflorus</i> en toxicité orale aiguë.....	59
Fig. 13: Bilan hépatique des groupes des rats traités avec le CCl ₄ en présence et en absence de l'E.Br.....	61
Fig. 14: Bilan rénale et lipidique des groupes de rats traités avec le CCl ₄ en présence et en absence de l'extrait	63
Fig. 15: Coupes histologique du foie	67
Fig. 16: Coupes histologiques du rein.....	67
Fig. 17: Pourcentage de l'augmentation d'épaisseur de la patte (AUG%).....	70
Fig. 18: Pourcentage d'inhibition d'épaisseur de la patte (INH%)	71
Fig.19: Les phase de guérison.....	71
Fig. 20: Observations macroscopiques des estomacs des rats non traité, des rats intoxiqués par l'éthanol et des rats traités par l'extrait brut de <i>C.triflorus</i>	74
Fig. 21: Pourcentage d'ulcération induite par l'éthanol (surface totale des lésions).....	75
Fig. 22: Coupes histologiques de l'estomac des rats non traité et des rats intoxiqué par l'éthanol et traité par l'extrait brut de <i>C.triflorus</i>	76

Liste des tableaux

Tableau I: Identification taxonomique de <i>Cytisus triflorus</i>	4
Tableau II: Principaux propriétés des espèces réactives radicalaires et non radicalaires.....	7
Tableau III : Principaux antioxydants enzymatique et non enzymatiques.....	9
Tableau IV : Principaux microorganismes et leur pouvoir pathogène.....	13
Tableau V: Rendement d'extraction, teneurs en polyphenols totaux et en flavonoïdes des extraits de <i>C. triflorus</i>	45
Tableau VI: Activité antibactérienne des extraits de <i>C. triflorus</i>	57
Tableau VII: Poids corporel, poids du foie et poids relatif du foie des différents lots de rats....	60
Tableau VIII: Effet de l'extrait brut de <i>C. triflorus</i> sur les paramètres du stress oxydant.....	65
Tableau IX: Evaluation des pommades de l'extrait brut de <i>C. triflorus</i> à la concentration 200 et 400 mg sur la cicatrisation par la méthode d'excision des plaies.....	72

Liste des abréviations

- A.Asc** : Acide ascorbique
- AINS**: Anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- AIS**: Anti-inflammatoires stéroïdiens.
- AlCl₃** : Chlorure d'aluminium
- ALT**: Alanine aminotransférase
- AST**: Aspartate-Aminotransférase
- BHT**: Butylatedhydroxytoluene
- C. triflorus**: *Cytisus triflorus*
- CAT** : Catalase
- CI₅₀**: Concentration inhibitrice à 50%
- COX**: Cyclooxygenase
- DMSO**: Diméthyle sulfoxyde
- DPPH**: 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl
- E.Ae**: Extrait de l'acétate d'éthyle
- E.Aq** : Extrait aqueux
- E.Br**: Extrait brut
- E.Ch**: Extrait du chloroforme
- E.Ep**: Extrait de l'éther de pétrole
- EAG**: Equivalent en acide gallique
- EDTA**: Ethylenediaminetetraacetic acid
- ERN**: Espèce réactive d'azote
- ERO**: Espèce réactive d'oxygène
- GSH**: Glutathion réduit
- iNOS**: Oxyde nitrique synthase inductible
- MDA**: Malondialdéhyde
- PAL**: Phosphatase alcaline
- SEM**: Erreur standard de la moyenne
- SOD**: Superoxyde dismutase

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique

I. Plante médicinale <i>Cytisus triflorus</i>	3
I.1. Présentation du <i>Cytisus triflorus</i>	3
I.2. Systématique de <i>Cytisus triflorus</i>	4
I.3. Composition chimique.....	5
I.4. Usage traditionnel et propriétés biologiques.....	5
II. Système oxydant/ Antioxydants Et Stress oxydant	6
II.1. Système Oxydant.....	6
II.1.1. Espèces réactives.....	6
II.1.2. Rôle physiologique des espèces réactives.....	8
II.2. Systemes de defenses antioxydants.....	8
II.2.1. Classification des antioxydants.....	8
II.2.2. Mécanismes d'action des antioxydants.....	10
II.3. Stress oxydant.....	10
II.3.1. Définition.....	10
II.3.2. Conséquences biologiques du stress oxydatif.....	10
III. Activité antimicrobienne	11
III.1. Antibiotiques.....	11
III.2. Activité antimicrobienne des extraits des plantes	12
III.3. Principaux microorganismes et leur pouvoir pathogène	12
IV. Effet hépatoprotecteur	14
IV.1. Organisation structurale du foie.....	14
IV.2. Hépatite	14
IV.2.1. Hépatite selon l'aspect lésionnel.....	14
IV.2.2. Hépatotoxicité d'origine professionnelle.....	15
IV.3. Organisation structurale et fonctionnel du rein	16
IV.4. Marqueurs hépatiques et rénaux.....	16
IV.4.1. Bilan hépatique.....	17
IV.4.2. Bilan rénale	18
V. Inflammation	19
V.1. Phases de l'inflammation.....	19
V.1.1. Phase vasculaire (Réaction vasculo-exsudative)	20
V.1.2. Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)	20
V.1.3. Phase de régénération	21
V.2. Anti-inflammatoires.....	21
V.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	21
V.2.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)	22
V.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale	22
VI. Ulcère gastrique	23
VI.1. Causes provoquant l'ulcère.....	23
VI.2. Traitements médicaux.....	23

Sommaire

VI.3. Méthodes d'études expérimentales de l'activité antiulcéreuse	23
VI.3.1. Ethanol	24
VI.3.2. Acide Acétyl salicylique (Aspirine) et les AINS	24
VI.3.3. Ulcères provoqués par d'autres produits chimiques	24
VI.3.4. Ulcère induit par le stress.	24
VII. Cicatrisation	25
VII.1. Généralité sur la peau	25
VII.2. Généralité sur la cicatrisation	25
VII.3. Etapes de la cicatrisation	26
VII.3.1. Phase inflammation et formation de caillot	26
VII.3.2. Phase de profération	26
VII.3.3. Phase de remodelage	26

Partie expérimentale: Matériels et Méthodes

I. Matériel	27
I.1. Matériel végétal	27
I.2. Animaux	27
I.3. Souches bactériennes et champignons	27
I.4. Réactifs	27
II Méthodes	28
II.1. Méthode d'extraction	28
II.1.1. Principe	28
II.1.2. Préparation de l'extrait brut	28
II.1.3. Fractionnement de l'extrait brut	28
II.2. Dosage des polyphénols totaux	29
II.3. Dosage des flavonoïdes	29
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro	30
II.4.1. Test de piégeage du radical DPPH	30
II.4.2. Réduction du radical-cation ABTS⁺	31
II.4.3. Blanchissement du β-carotène	31
II.4.4. Pouvoir réducteur	32
II.4.5. Test de chélation des ions ferreux	33
II.4.6. Test anti-hémolytique	33
II.4.7. Activité de piégeage du radical superoxyde	34
II.4.8. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène	34
II.4.9. Inhibition du radical hydroxyle	35
II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	35
II.5.1. Principe de l'antibiogramme	35
II.5.2. Activité antibactérienne	36
II.5.3. Activité antifongique	36
II.6. Etude de la toxicité aigue de <i>Cytisus triflorus</i>	36
II.7. Effet hépato-protecteur	37
II.7.1. Effet Préventif	37
II.7.2. Effet Curatif	38
II.7.3. Prélèvement du sang et des organes	38
II.7.4. Dosage des paramètres sanguins	38
II.7.5. Réalisation des coupes histologiques	38

Sommaire

II.7.6. Préparation de l'homogénat	38
II.7.7. Dosage des marqueurs du stress oxydant.....	39
II.8. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	41
II.9. Etude de l'activité cicatrisante.....	42
II.10. Activité protectrice de la muqueuse gastrique.....	43
II.11. Analyses statistiques.....	44

Partie expérimentale: Résultats et Discussion

I. Préparation des extraits de <i>Cytisus triflorus</i>	45
II. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.....	45
III. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante.....	46
III.1. Effet piègeur du radical DPPH	46
III.2. Réduction du radical-cation ABTS ^{•+}	48
III.3. Blanchissement du β -carotène.....	49
III.4. Pouvoir réducteur.....	50
III.5. Chélation du fer ferreux	51
III.6. Effet anti-hémolytique	52
III.7. Piégeage de radical superoxyde.....	53
III.8. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	54
III.9. Inhibition de radical hydroxyle.....	55
IV. Activité antimicrobienne.....	56
IV. Toxicité aiguë du <i>Cytisus triflorus</i>	58
V. Activité antihépatotoxique.....	59
V.1. Evaluation de poids.....	59
V.2. Paramètres biochimiques	61
V.2.1. Paramètres biochimique hépatique.....	61
V.2.2. Paramètres biochimiques rénaux et lipidiques.....	62
V.3. Paramètres du stress oxydant.....	64
V.4. Etude histopathologique.....	66
V.4.1. Histopathologie du foie.....	66
V.4.2. Histopathologie du rein.....	68
VI. Activité anti-inflammatoire.....	68
VI.1. Œdème de la patte induit par la carragénine.....	68
VI.2. Activité cicatrisante.....	72
VI.3. Activité protectrice de la muqueuse gastrique.....	73
VI.1.1. Evaluation macroscopique des lésions.....	73
VI.1.2. Evaluation du degré d'ulcération par le calcul des surfaces	75
VI.1.3. Observations microscopiques.....	75
Conclusion et perspectives.....	78
Références bibliographiques.....	79

Introduction

"La santé est le bien le plus précieux. Un corps sain vaut infiniment mieux qu'une richesse démesurée". Cette affirmation justifie la lutte acharnée que l'homme mène depuis la nuit des temps afin de combattre la maladie, et les moyens dont il se sert pour cette fin. Ces moyens efficaces ou non lui sont souvent fournis par son environnement naturel et sont essentiellement à base de plantes. Ni le hasard et ni la superstition ont guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des 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.

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, antioxydante et l'activité anti-hépatotoxique des extraits de mélange de feuilles et fleurs de *Cytisus triflorus* L, connue en Algérie sous le nom de Igoulli. Cette espèce est répartie dans la région méditerranéenne, elle est très répandue dans les frontières montagneuses entre Bejaia et Tizi Ouzou. Elle est utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour traiter les douleurs abdominales, la cicatrisation des plaies et comme hémostatique et antifongique. En outre, les feuilles sont utilisées comme "henné" pour traiter et teindre les cheveux. A notre connaissance, il existe peu de précédents travaux sur les activités biologiques de cette espèce. Ce présent travail est donc motivé par la curiosité scientifique de vérifier l'utilisation traditionnelle de mélange de feuilles et fleurs de *Cytisus triflorus*. Pour cela, nous avons structuré notre travail comme suit :

- L'extraction des extraits de *Cytisus triflorus* et évaluation de leurs teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, chélation du fer ferreux, blanchissement du β -carotène, test du pouvoir réducteur, test ABTS, l'inhibition de radical hydroxyle, activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, activité de piégeage de radical superoxyde et test anti-hémolytique).
- L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique des extraits étudiés.
- L'évaluation de la toxicité de la plante dans le but de définir le seuil toxique.
- L'activité anti-hépatotoxique sera traitée à travers de quelques paramètres biochimiques et histologiques (effet curatif et préventif).

- L'activité anti inflammatoire de l'extrait brut a été évaluée en utilisant :
 - La technique d'œdème aigu de la patte de rat induit par la carraghénine.
 - Le phénomène de cicatrisation a été effectué par une série d'incisions sur différents lots de rat.
 - Activité protectrice de la muqueuse gastrique.

Partie bibliographique

I. Plante médicinale *Cytisus triflorus*

I.1. Présentation du *Cytisus triflorus*

Cytisus triflorus appartient à la famille des Fabacées (Leguminosae), une famille de distribution cosmopolite, avec environ 730 genres et 19400 espèces, ce qui la met en troisième place après la famille des Asteraceae et celle des Orchidaceae par le nombre d'espèces (Judd *et al.*, 2007). Cette grande richesse en espèces se reflète dans une grande diversité morphologique et chimique, d'où découlent de multiples utilisations (Waterman *et al.*, 1994). Les Fabacées sont des herbes, des arbustes, des arbres, des lianes ou des vignes portant habituellement des feuilles alternes, pennées, pulvinates et stipulées.

Cytisus est un genre important et diversifié de plantes dicotylédones comprenant environ 50 espèces de plantes à fleurs de la famille des Fabacées, particulièrement abondantes autour de la mer Méditerranée, mais également se trouve dans des régions géographiques distinctes comme le nord et le sud de l'Afrique, l'Europe occidentale et centrale, la mer Noire et la Turquie (Andriamparany *et al.*, 2014). *Cytisus* est l'un des nombreux genres de la tribu Genisteae, communément appelés balais. Les balais sont des arbustes dressés de 4 à 5 pieds de hauteur avec des feuilles alternes. Les fleurs sont disposées en têtes et sont généralement jaunes ou blanches.

Cytisus triflorus est un arbuste à tige dressée de 1-2 m, et s'étend à de nombreuses rameaux allongée (Fig.1). Les jeunes rameaux sont anguleux et couverts de longs poils blancs, d'apparence grisâtre. Les feuilles sont caduques, pétiolées et composées de trois folioles ovales arrondies (Fig.1), densément hispides, soyeuses des deux côtés. La floraison a lieu en avril-mai. Les fleurs sont striées de jaune avec corolle papilionacée et pédonculées. Les fruits sont des gousses brunes (3-3,5cm), poilues et contiennent de 6-8 graines brunes (Pereira *et al.*, 2013).



Fig.1: photos de *Cytisus triflorus*. (A): les fleurs et (B): les feuilles.

I.2. Systématique de *Cytisus triflorus*

La taxonomie de *Cytisus triflorus* (tableau I) selon Auvray et Malécot (2013).

Tableau I: Identification taxonomique de *Cytisus triflorus*

<i>Cytisus triflorus</i> L'Hérit.	
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Faboideae</i>
Genre	<i>Cytisus</i>
Espèce	<i>Cytisus triflorus</i> L'Hérit. (Syn. <i>Cytisus villosus</i> Pourr.)
Nom commun	Broom, Cytise à trois fleurs

1.3. Composition chimique

Le genre *Cytisus* contient des alcaloïdes de quinolizidine, des flavonoïdes, des phényléthylamines, des lectines et des monoterpènes. Les principaux composés isolés de ce genre comprennent les alcaloïdes spartéine, lupanine, isosparteine, ammoderien et dérivés apparentés (Andriamparany *et al.*, 2014), la tyramine, l'épinine, la salsolidine et la phényléthylamine apparentée, la génistéine, la quercétine et leurs glycosides ainsi que les acides phenoliques: acide P-coumarique et l'acide caféique. Les graines contiennent des lectines et l'analyse de l'huile volatile donne de l'eugénol, du phénol, du crésol, de l'acide isovalérique, de l'acide benzoïque et de l'alcool benzylique, ainsi que du cis-3hexén-1-ol et du 1-octène-3-ol. L'espèce *Cytisus scoparius* contient un flavone 6"-O-acetyl-scoparin, des flavonols tels que le kaempferol, rutin, quercetin, quercitrin et isorhamnetin, des isoflavones genistein et sarothamnoside (Sundararajan et Koduru, 2014). Selon d'autres études les espèces *Cytisus nigrians* et *Cytisus albus* contiennent des isoflavones ononin et genistein. La sarothamine et la lupanine ont également été détectées chez *Cytisus scoparius* (Hanganu *et al.*, 2010).

Les propriétés thérapeutiques et en particulier, l'activité antioxydante des différentes espèces de *Cytisus* sont liées à leur forte concentration en composés phénoliques (Luís *et al.*, 2009). L'activité pharmacologique connue du *Cytisus scoparius* (Sundararajan et Koduru, 2014) a été attribuée à plusieurs constituants comme la 6"-O-acétyl scoparine (Raja *et al.*, 2007), les flavonols comme la rutine, la quercitine, l'isorhamnétine, la quercitrine et le kaempférol (Sundararajan *et al.*, 2006), les isoflavones à savoir la génistéine et le sarothamnoside et les alcaloïdes comme la spartein (González *et al.*, 2013).

1.4. Usage traditionnel et propriétés biologiques

Le genre *Cytisus* est utilisé comme diurétique et anti hypertensif. La décoction des feuilles est employée pour traiter les affections thoraciques (Hanganu *et al.*, 2010). Plusieurs espèces du genre *Cytisus* utilisées en médecine traditionnelle présentent des activités antioxydantes, cytoprotectrices, diurétiques, hypnotiques, anxiolytique, sédatives, hépatoprotectrices, antispasmodiques, hypotensives, antiparasitaires, antidiabétiques et oestrogéniques (Sundararajan *et al.*, 2006 ; Di Giorgio *et al.*, 2008 ; Nirmal *et al.*, 2008 ; Barros *et al.*, 2012 ; González *et al.*, 2013 ; Jalili *et al.*, 2013). En outre, plusieurs espèces du genre *Cytisus* sont utilisées comme plantes ornementales ainsi que pour l'alimentation des animaux dans le domaine de l'agriculture. leur pollen est utilisé en apiculture et dans la fertilisation du sol (Rodríguez-Riaño *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Riaño *et al.*, 2006 ; Pinela *et al.*, 2011). L'espèce *C. multiflorus* a été utilisée comme médicament ethnopharmacologique pendant des siècles principalement en raison de ses propriétés diurétiques, anti-inflammatoires, anti-hypertenseurs et antidiabétiques (Gião *et al.*, 2007). La

cytisine, un alcaloïde extrait pour la première fois à partir des graines de *Cytisus laburnum* ayant une forte affinité pour les récepteurs nicotiniques de type $\alpha 4\beta 2$, était utilisée en Europe centrale et orientale pour aider les gens à cesser de fumer pouvant exercer un effet antidépresseur (Mineur *et al.*, 2007).

Cytisus scoparius est l'espèce la plus connue dans la médecine traditionnelle chinoise. Elle est utilisée pour nourrir le Yin et revigorer le cœur et le foie, bien connue comme tonique cardiaque et diurétique stimulant, utile pour traiter l'insuffisance et l'œdème cardiaques (Sundararajan et Koduru, 2014). *Cytisus multiflorus* (balai espagnol) était utilisée dans la médecine traditionnelle ayant divers effets bénéfiques sur la santé, notamment des propriétés anti-inflammatoires (Nedelcheva *et al.*, 2007). *Cytisus villosus* (plante sous enquête) a été utilisée par les populations rurales comme remède efficace contre les plaies (Ait-KaciAourahoun *et al.*, 2015).

II. Système oxydant/ Antioxydants Et Stress oxydant

II.1. Système Oxydant

II.1.1. Espèces réactives

Les espèces réactives sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres provenant de l' O_2 (ERO), alors que les espèces réactives de l'azote (ERN) sont considérés comme une sous-classe des ERO, et sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote (Ye *et al.*, 2015). Ces espèces réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires (tableau II). Ces derniers peuvent être très réactifs en étant précurseurs des radicaux libres (Halliwell et Whiteman, 2004).

Les ERO représentent la classe la plus importante d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko *et al.*, 2007). Dans l'organisme, la production physiologique d'espèces réactives se fait de manière continue. La principale source des ERO est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ERO cellulaires (Pisoschi et Pop, 2015). Il existe de nombreuses autres sources parmi lesquelles: l'auto-oxydation des petites molécules, les cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique et les peroxyosomes (Vašková *et al.*, 2012). L'environnement et le mode de vie peuvent participer directement ou indirectement dans la génération de ces espèces réactives dans les systèmes biologiques. Les radiations ionisantes et non ionisantes, les gaz toxiques comme l'ozone O_3 , les toxines, les drogues, les pesticides, le goudron, certains conservateurs alimentaires comme le dioxyde de soufre, le tabagisme, l'ingestion d'alcool, polluants industriel en sont des exemples (Favier, 2003 ; Kardeh *et al.*, 2014).

Tableau II: Principaux propriétés des espèces réactives radicalaires et non radicalaires.

Espèces radicalaires			
Nomenclature	Symbole	Propriétés et principales réactions	Références
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Le radical $O_2^{\cdot -}$ se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène, il est généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire. Cette réaction semble surtout être catalysée par des NADPH oxydases membranaires.	Pisoschi et Pop (2015).
Radical hydroxyle	HO^{\cdot}	Les voies conduisant à la formation de ce radical: réaction de fenton (celle qui implique les métaux de transition) et réaction d'Haber et Weiss ($L'H_2O_2$ peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du HO^{\cdot}).	Toro et Rodrigo (2009).
Monoxyde d'azote (oxyde nitrique)	NO^{\cdot}	Synthétisé dans les cellules endothéliales à partir de l'arginine et l' O_2 grâce à l'action d'enzymes NO synthase. Il peut réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3), Pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-); de plus, le monoxyde d'azote forme avec $O_2^{\cdot -}$ le peroxyde nitrite.	Lismont <i>et al.</i> (2015).
Radicaux alkyles	R^{\cdot}	Généralement issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).	Delattre <i>et al.</i> (2005).
Radicaux peroxy	ROO^{\cdot}	Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone R^{\cdot} .	Delattre <i>et al.</i> (2005).
Espèces non radicalaires			
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène formé à la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ par le superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l' H_2O_2 donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO^{\cdot} hautement réactif.	Birben <i>et al.</i> (2012).
L'oxygène singulet	$(^1O_2)$	Oxygène avec des spins antiparallèles. Produit à des pressions importantes en oxygène sous l'effet de l'absorption des rayons UV. Il disparaît trop vite pour être toxique in vivo.	Chu <i>et al.</i> (2010).
Acide hypochlorique	$HOCl$	Produit dans les neutrophiles, sa toxicité s'effectue à travers des réactions d'halogénations et d'oxydations.	Chu <i>et al.</i> (2010).
Peroxyde nitrite	$ONOO^{\cdot}$	Un composé extrêmement réactif et toxique, responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques).	Lismont <i>et al.</i> (2015).

II.1.2. Rôle physiologique des espèces réactives

Les EOR et ERN jouent un double rôle dans les systèmes biologiques étant à la fois nocifs et bénéfiques, voire indispensables aux organismes vivants (Valko *et al.*, 2007):

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires. À titre d'exemple, le $\text{NO}\cdot$ joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tels que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense (Holmström et Finkel, 2014). Ces espèces réactives ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO) interviennent aussi dans la maturation, l'hyperactivation des spermatozoïdes et la fusion de spermatozoïde avec l'ovocyte (Bae *et al.*, 1997), la signalisation cellulaire et la régulation de nombreux facteurs de transcription tel que l'AP1 (Activator protein-1) et HSF1 (heat shock factor 1) qui activent des gènes protecteurs de la cellule (Delattre *et al.*, 2005). Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (Steinbeck *et al.*, 1993).
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre les ERO, ERN et les systèmes de défense. Les espèces réactives sont impliquées dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'œdème pulmonaire, l'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Asmat *et al.*, 2015 ; Kanaan et Harper, 2017 ; Crotty *et al.*, 2017). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Delattre *et al.*, 2005).

II.2. Systèmes de défenses antioxydants

II.2.1. Classification des antioxydants

L'organisme est déterminé par un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydantes dans l'organisme. Cano (2006) définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et de maintenir, au niveau de la cellule, des concentrations non cytotoxiques de ERO. Les défenses antioxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques et non enzymatiques (tableau III). Le système non-enzymatique regroupe des composés de faible poids moléculaire qui peuvent être soit d'origine endogènes ou exogènes. Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments tels que le cuivre, le manganèse, le zinc et le sélénium en particulier (Berger, 2006).

Tableau III : Principaux antioxydants enzymatique et non enzymatiques

Le système antioxydant enzymatique			
Enzyme	Code enzymatique	Mode d'action	Références
Superoxydes dismutases	EC1.15.1.1	Ces métalloprotéines assurant l'élimination de l'O ₂ ^{•-} par une réaction de dismutation en le transformant en H ₂ O ₂ et en O ₂ .	Fukai et Ushio-Fukai (2011).
Catalase	EC1.11.1.6	Enzyme responsable de la détoxification du H ₂ O ₂ . La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène.	Asmat <i>et al.</i> (2015).
Glutathion peroxydase	EC 1.11.1.19	Enzyme tétramérique à sélénium qui peut réduire le H ₂ O ₂ en eau. Elles permettent de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne, en réduisant les peroxydes instables en acide gras hydroxylés.	Brigelius-Flohé et Maiorino (2013).
Le système antioxydant non enzymatique			
L'origine	Molécules à faible PM.	Mode d'action	Références
Endogène	Glutathion	GSH a un rôle dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Il agit comme cosubstrat d'enzymes antioxydants (glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase). Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec la vitamine C/ E.	Lü <i>et al.</i> (2010).
	Acide urique	Piégeur puissant des radicaux (OH [•] , ROO [•] , NOO [•] ...).	Johnson <i>et al.</i> (2009).
	Bilirubine	Piégeur des H ₂ O ₂ , ¹ O ₂ et OH [•] , protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.	Lyn Patrick (2006).
	Acide lipoiique	Piégeur des radicaux (HO [•] , ROO [•] , HOCl [•] et ¹ O ₂) et chélateur les métaux lourds, il peut régénérer les vitamines C et E.	Sayre <i>et al.</i> (2005).
	coenzyme Q (ubiquinone)	CoQ10 contribue à prolonger l'effet antioxydant de la vitamine E.	Vašková <i>et al.</i> (2012).
	Protéines chélatrices des métaux	Transferrine, Ferritine, Céruleplasme, Albumine, Métallothionéine et Myoglobuline agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants (Fe ²⁺ /Fe ³⁺ ou Cu ²⁺ /Cu ⁺).	Lyn Patrick (2006).
Exogène	Vitamine E	Tocophérol capable de réagir avec les radicaux peroxydes pour former un radical tocophéryle.	Mirowska-Chodakowska <i>et al.</i> (2017).
	Vitamine C (Acide L-ascorbique)	Piégeur des radicaux (H ₂ O ₂ , ¹ O ₂ , O ₂ ^{•-} et OH [•]). Elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E.	Mirowska-Chodakowska <i>et al.</i> (2017).
	β carotène (provitamine A)	Piégeur des radicaux (¹ O ₂ , ROO [•] et OH [•]). Il est capable d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques.	Gonzalez-Gallego <i>et al.</i> (2007).
	Oligo-éléments	Sélénium, Zinc, Manganèse, et le Fer servent de cofacteur aux enzymes antioxydants (Glutathion peroxydase, SOD et la Catalase).	Berger (2006).
	Polyphénols	Ils sont capables de piéger l' ¹ O ₂ et le O ₂ ^{•-} en le dismutant	Rodrigo et Gil-Becerra (2014).

II.2.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes ainsi que la chélation des métaux de transition (Berkelhamer *et al.*, 2013). D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol (Zhang et Gutterman, 2007). En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (Pisoschi et Pop, 2015).

II.3. Stress oxydant

II.3.1. Définition

Le stress oxydatif est une circonstance anormale dans laquelle les cellules ou les tissus sont soumis à un déséquilibre entre la production des pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydants, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (Smaga *et al.*, 2015).

II.3.2. Conséquences biologiques du stress oxydatif

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates (Tramutola *et al.*, 2017). De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant: mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps et dépôt de lipides oxydés (Poprac *et al.*, 2017).

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydatif est le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers et des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). La sclérose latérale amyotrophique familiale est l'exemple le plus démonstratif, puisque cette maladie génétique est due à un défaut sur le gène de l'enzyme antioxydant superoxyde dismutase (Schneider et Bucar, 2005). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydatif est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (Mateen *et al.*, 2016 ; Tramutola *et al.*, 2017 ; Crotty *et al.*, 2017).

III. Activité antimicrobienne

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques (Seragui *et al.*, 2013).

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, ... etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes (Daglia, 2012). De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques (Kordali *et al.*, 2008).

III.1. Antibiotiques

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites: antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique). La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Mesaros *et al.*, 2005; Munita et Arias, 2016). Il existe plusieurs classifications des antibiotiques:

- *selon le spectre d'action (large spectre ou spectre étroit) ;
- *le mode d'action (Antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse des protéines par les bactéries et la synthèse de l'ADN ou de l'ARN bactérien),
- *La cible ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont (Mesaros *et al.*, 2005):
 - Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines
 - Aminosides: streptomycine, gentamicine.
 - Chloramphénicol et thiamphénicol.

- Cyclines: tétracyclines, doxycycline.
- Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine.

III.2. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation abusive des antibiotiques a induit le phénomène de résistance des bactéries infectieuses aux antibiotiques. Ce problème que rencontre la médecine actuelle, a relancé la recherche vers l'élaboration d'autres stratégies thérapeutiques visant à exploiter les propriétés antimicrobiennes des substances naturelles pouvant se substituer aux antibiotiques et/ou agir en synergie avec ces derniers (Kordali *et al.*, 2008 ; Daglia, 2011). Des groupes de recherche ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales (Gulfraz *et al.*, 2008 ; Haddouchi *et al.*, 2013). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative et la thérapie naturelle (Romanik *et al.*, 2007).

III.3. Principaux microorganismes et leur pouvoir pathogène

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes présents dans l'air, le sol, les eaux douces, les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes consistent en des bactéries, des virus, des champignons et des parasites (Daglia, 2011). Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes. Le monde bactérien est très vaste et les bactéries peuplent notre environnement (tableau IV), certaines espèces sont hautement pathogènes pour l'homme et représentent un véritable danger pour la santé publique.

Tableau IV: Principaux microorganismes et leur pouvoir pathogène

Type de microorganisme	Espèces	Pouvoir pathogène	Références
Bactérie gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E. coli représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires.	Percival (2004).
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Pseudomonas est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, des infections urinaires et des infections suites aux blessures chirurgicales).	Percival (2004).
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	fréquemment rencontrées dans les infections nosocomiales chez les malades immunodéprimés: septicémies, méningites, endocardites, abcès du cerveau, pneumonies...	Dworkin et Falkow (2006)
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	Les salmonelles sont des microorganismes pathogènes responsables de gastro-entérites, de toxi-infections alimentaires et de fièvres typhoïdes.	Sandhar <i>et al.</i> (2011).
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	Elles peuvent induire des infections des voies urinaires, des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales, brûlures...), des infections des voies respiratoires, et même des septicémies.	Bossche <i>et al.</i> (2003).
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Responsable des infections broncho-pulmonaires, des infections urinaires nosocomiales, Autres infections secondaires dues à des soins ou des gestes chirurgicaux: cutanées, vasculaires, péritonéales, vésiculaires ou des septicémies causées par un matériel souillé.	Sandhar <i>et al.</i> (2011).
Bactérie gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S. aureus est la cause de méningite, ostéomyélite, les infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë et l'intoxication alimentaire.	Dworkin et Falkow (2006)
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Bacillus cereus cause des intoxications alimentaires chez les sujets fragiles, des septicémies, méningites, infections respiratoires et des myonécroses.	Dworkin et Falkow (2006)
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	Les entérocoques causent méningites, infections urinaires et abcès intra-abdominaux.	Sandhar <i>et al.</i> (2011).
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	Listériose chez l'adulte donne lieu à une méningo-encéphalite ou plus rarement à une septicémie. Chez le nouveau-né : les infections néonatale. Chez la femme enceinte parfois responsable d'un syndrome grippal ou d'une fièvre inexplicé, des troubles urinaire, elle peut aussi être cause d'avortement ou d'accouchement prématuré.	Sandhar <i>et al.</i> (2011).
Champignons levuriformes	<i>Candida albicans</i> ATCC 1024	Ils sont responsables de la candidose superficielle, des infections vaginale et des infections fongiques disséminées chez les individus immunodéprimés, les diabétiques, les nouveaux-nés et les patients ayant subi une chirurgie.	Sandhar <i>et al.</i> (2011).
Moisissures	<i>Aspergillus niger</i> MNHN 566	Production de l'ochratoxine A, présente une toxicité rénale et une immunotoxicité.	Bossche <i>et al.</i> (2003).
	<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	Production d'aflaxines B1, Ces métabolites secondaires sont hautement carcinogènes, mutagènes et tératogènes.	Seragui <i>et al.</i> (2013).
	<i>Penicillium notatum</i>	Responsables de kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe) et d'onychomycose (infection des ongles).	Dworkin et Falkow (2006).
	<i>Fusarium oxysporium</i> MNHN963917	Responsables de manifestations allergiques, toxiques et infectieuses locales ou généralisées.	Bossche <i>et al.</i> (2003).

IV. Effet hépatoprotecteur

IV.1. Organisation structurale du foie

Le Foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain. Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, cet organe est partiellement protégé par les côtes. Il est essentiellement constitué d'une masse de cellules épithéliales (parenchyme) traversée par des capillaires veineux. Bien que le foie s'avère composé majoritairement de cellules parenchymateuses (Les hépatocytes sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques), la paroi des capillaires sinusoides comprend quatre autres types cellulaires: Cellules endothéliales (impliquées dans la modulation de la prolifération hépatocytaire), Cellules Kupffer (macrophages intervenant lors des réactions immunitaires), Cellules étoilées (Elles jouent un rôle majeur dans le développement de fibroses hépatiques et sont plus généralement impliquées dans la régulation de la croissance hépatique), Lymphocytes granuleux : les cellules natural killer (ou pit cells) qui interviennent au cours des mécanismes de défense immunitaire (Hodgson et Levi, 2004; Abdelmisih et Bloomston, 2010 ; Qui et Crawford, 2018).

IV.2. Hépatite

L'hépatite est une inflammation aigue ou chronique du foie le plus souvent asymptomatique. Elle est causée par des infections virales, des infections parasitaires ou bactériennes mais également par des substances toxiques naturelles telle que la phalloïdine et l'aflatoxine, les toxiques industriels tels que le tétrachlorure de carbone (CCl₄), l'alcool éthylique, le plomb et certains médicaments (Tsai *et al.*, 2017). La sévérité de l'hépatite dépend de l'étendue de la destruction des cellules hépatiques. Elle se traduit par une perte de l'appétit, une couleur foncée des urines, une asthénie par fois accompagnée de fièvre. Le foie peut augmenter de volume et un ictère peut survenir. L'ictère résulte des dépôts de pigments biliaires dans la peau et les tissus conjonctifs (Tennant et Center, 2008).

IV.2.1. Hépatite selon l'aspect lésionnel

IV.2.1.1. Stéatose

La stéatose (dégénérescence graisseuse) est une lésion histologique fréquemment observée et définie par l'accumulation d'acides gras sous forme de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, se traduisant le plus souvent par de larges vacuoles refoulant le noyau en périphérie (Layné et Guyader, 2003).

IV.2.1.2. Nécrose

Nécrose (de *nicros* = mort, cadavre) est une altération profonde de l'ensemble de la cellule, noyau, organites intracellulaires et cytoplasme fondamental. Elle est observable lorsque la cellule morte reste dans un environnement vivant. Les causes de nécrose hépatique sont nombreuses et variées: intoxications bactériennes, métaux lourds (plomb, sélénium), insecticides, une grande quantité de médicaments (acide salicylique, paracétamol...), hypoxie due à un choc et une anémie ou une thromboembolie lors d'insuffisance cardiaque congestive (Tennant et Center, 2008).

IV.2.1.3. Cirrhose

La cirrhose est le stade majeur de développement de la fibrose hépatique induite par la plupart des maladies chroniques du foie. Lorsqu'il existe une destruction répétée des hépatocytes, on assiste dans le foie à un phénomène de division cellulaire pour remplacer les cellules détruites (régénération) et à un dépôt de tissu de collagène (cicatrisation). L'association d'une fibrose hépatique et d'une transformation de l'architecture hépatique normale en une structure nodulaire anormale « nodule de régénération » est appelée cirrhose (Waller *et al.*, 2005).

IV.2.2. Hépatotoxicité d'origine professionnelle

Les substances industrielles (solvants) responsables d'action toxique sur le foie peuvent exercer leurs effets directement sur la cellule hépatique et entraînent alors des lésions dans les régions périportales des lobules hépatiques ou le plus souvent elles seront toxiques après oxydation par le système microsomial et les lésions débiteront alors dans les zones centro-lobulaires (Rosa *et al.*, 2010).

IV.2.2.1. Solvant tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est un hydrocarbure halogéné aliphatique, dérivé du méthane. Ce solvant est liquide incolore et volatil, il est très peu soluble dans l'eau, miscible avec les nombreux solvants organiques. La toxicité du CCl_4 est secondaire car due à sa transformation en radicaux libres réactifs CCl_3^\cdot , toxicité dite indirecte. En présence d'oxygène dans le milieu de catalyse du CCl_4 , les radicaux libres CCl_3^\cdot fournissent d'autres types de radicaux nettement plus réactifs après réaction avec l'oxygène moléculaire : les radicaux $\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$ (Al-Rasheed *et al.*, 2015). Les actions de ces deux types de radicaux libres conduisent à la nécrose hépatocytaire suite à des réactions de peroxydation des lipides des membranes cellulaires, des réactions d'inhibition enzymatique et des réactions de liaison covalente avec les macromolécules cellulaires (Bakr *et al.*, 2017). Le foie et les reins sont des organes cibles du CCl_4 . La sévérité des effets sur le foie dépend d'autres facteurs tels que la sensibilité des espèces, la voie et le mode d'exposition, le régime alimentaire ou la co-exposition à d'autres composés, en particulier l'éthanol (Rosa *et al.*, 2010 ; Hewawasam *et al.*, 2016).

IV.2.2.2. Autres solvants

- Le chloroforme a été abandonné comme anesthésique du fait de sa toxicité hépatique et cardiaque (Rosa *et al.*, 2010).
- 1,2- dichloroéthane est un solvant industriel utilisé dans les procédés de dégraissage et d'extraction (Rosa *et al.*, 2010).
- Tétrachlorure d'acétylène était utilisé dans l'industrie aéronautique pendant les deux guerres mondiales (Rosa *et al.*, 2010).

IV.3. Organisation structurale et fonctionnel du rein

Les reins constituent les organes sécréteurs de l'urine. Ils prennent une forme caractéristique en haricot. L'unité fonctionnelle du rein est le néphron; chaque rein comporte environ 1300 000 néphrons situés dans le tissu interstitiel ou cheminent également les vaisseaux et les nerfs. Le rein participe à l'homéostasie du corps entier, la régulation de l'équilibre acido-basique, les concentrations d'électrolytes, le volume de liquide extracellulaire, et la régulation de la pression artérielle (Ekor, 2014). En outre, les reins synthétisent l'érythropoïétine (qui agit sur la différenciation, la prolifération et la maturation des précurseurs des hématies), la vitamine D, la rénine et la prostaglandine. Beaucoup de fonctions du rein sont réalisées par des mécanismes relativement simples dont la filtration, la réabsorption et la sécrétion, qui ont lieu dans le néphron. La filtration, qui a lieu au corpuscule rénal, est le processus par lequel les cellules et les protéines de grande taille sont filtrées à partir du sang pour faire un ultra filtrat qui deviendra éventuellement l'urine. La réabsorption est le transport de molécules à partir de cet ultra filtrat dans le sang. La sécrétion est le processus inverse, dans lequel les molécules sont transportées dans le sens opposé, à partir du sang dans l'urine (Ekor, 2014 ; Feher, 2017).

IV.4. Marqueur hépatiques et rénaux

Les maladies du foie et du rein se caractérisent par la perturbation ou la perte d'un bon nombre de leurs fonctions. Les méthodes d'évaluation de la fonction hépatique et rénale incluent des méthodes dites d'exploration biologique qui se résument en un ensemble de tests biochimiques, encore appelé « bilan biologique ». L'exploration biologique hépatique et rénale comporte un nombre pléthorique d'examen. Ces examens servent à diagnostiquer les pathologies et à apprécier l'efficacité d'un traitement apporté (Feher, 2017).

IV.4.1. Bilan hépatique

IV.4.1.1. Transaminases

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Elles permettent lors de réactions énergétiques, le transfert d'une fraction d'un acide aminé à un autre. Elles sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles etc.), reflétant ainsi l'activité et la destruction des cellules de ces organes. L'augmentation de leur taux dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire. On en distingue deux types (Dufour *et al.*, 2000):

a. Alanine aminotransférase

Alanine aminotransférase (ALAT) est un marqueur sensible et spécifique d'une atteinte hépatocellulaire. Il participe à la néoglucogenèse en catalysant le transfert du groupement aminé (NH_2) de l'alanine sur l'acide α -cétoglutarique, avec formation d'acide glutamique et d'acide pyruvique. Cette enzyme est un marqueur sensible et spécifique d'une atteinte hépatocellulaire (Dufour *et al.*, 2000).

b. Aspartate aminotransférase

Aspartate aminotransférase (ASAT) est moins sensible et moins spécifique que l'ALAT pour le foie. On la trouve également dans d'autres organes (prédominante dans le cœur). Elle catalyse la réaction de transfert du groupement aminé (NH_2) de l'Aspartate sur l'acide acétoglutarique avec formation d'acide glutamique et d'acide oxaloacétique (Dufour *et al.*, 2000).

IV.4.1.2. Phosphatase alcaline

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des monoestérases à large spécificité qui hydrolysent l'acide phosphorique. Elles sont produites dans les voies biliaires et les os et se retrouvent également dans le foie. La mesure de leur activité dans le sérum est faible en particulier pour le diagnostic et la surveillance des maladies hépatobiliaire (cirrhose, hépatite ou cancer) et maladies osseuses. Elle est élevée en cas d'une atteinte hépatique choléstatique, des maladies osseuses, intestinales et inflammatoires (Desjardins et Cadore, 2006).

IV.4.1.3. Bilirubine totale

La bilirubine est un pigment jaune provenant de la dégradation de l'hémoglobine, et dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère. Le taux de bilirubine totale est la somme des taux de bilirubine non conjuguée et conjuguée. Les causes d'élévation du taux de bilirubine sont variées: un rétrécissement sur les voies biliaires (calcul, tumeur des voies biliaires ou des pancréas etc.), les maladies du foie (hépatite, cirrhose etc.) ainsi qu'une destruction anormalement importante des globules rouges (Caquet, 2008).

IV.4.1.4. Albumine

L'albumine est une protéine synthétisée essentiellement par le foie, c'est le constituant majeur des protéines plasmatiques. L'albumine peut être diminuée dans les maladies chroniques du foie, mais peut également diminuer pour d'autres raisons comme la déficience en protéines (Caquet, 2008).

IV.4.1.5. Temps de coagulation

Le foie est responsable de la synthèse de facteurs de coagulation. Le ratio INR (International Normalized Ratio) mesure la vitesse de coagulation comparée à la normale. Si le ratio INR est élevé, il signifie que la coagulation est ralentie. L'INR pourrait être élevée si le foie est endommagé de telle sorte que la synthèse de la vitamine K est diminuée (Caquet, 2008).

IV.4.2. Bilan rénale**IV.4.2.1. Créatinine**

La créatinine est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle. Elle est généralement produite par le corps à un taux constant, fonction de la masse musculaire, pour un individu donné. Cette molécule est éliminée dans sa totalité par le rein. Le glomérule en filtre une très grande partie, le reste étant sécrété par les tubules (Caquet, 2008).

IV.4.2.2. Urée

La quantité d'urée produite chaque jour varie avec l'état de nutrition, elle augmente avec une situation de catabolisme ou un apport protéique important et baisse par conséquent sous régime pauvre en protéines (Caquet, 2008).

IV.4.2.3. Acide urique

L'acide urique est le produit de dégradation et d'excrétion des purines, il est présent en faible quantité dans le sang (uricémie) des mammifères. Sa cristallisation est à l'origine des crises de goutte. Une augmentation de sa concentration, appelée hyperuricémie, entraîne la goutte, responsable d'arthropathies (arthrite goutteuse) et de lithiase rénale caractérisée par la formation de cristaux dans les reins, appelés calculs rénaux (Caquet, 2008).

V. Inflammation

L'inflammation est une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme à une stimulation cellulaire excessive ou anormale due à une agression tissulaire d'origines diverses, dont le but est d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires, favoriser le retour à l'homéostasie et la cicatrisation du tissu lésé (Ashley *et al.*, 2012). Les signes cliniques de ce processus sont: chaleur, rougeur, gonflement et douleur, de plus, une altération du fonctionnement de l'organe touché peut survenir. Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation de protéines et l'altération de membranes cellulaires (Dorward *et al.*, 2012).

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires (Histamine, Sérotonine, facteur activateur des plaquettes, Kalicréine, Plasmine, Leucotriènes, Prostaglandine, Bradykinine...). Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur les différentes cellules (les polynucléaires éosinophiles, lymphocytes, mastocytes, les cellules endothéliales, fibroblastes, les plaquettes, les facteurs de la coagulation et la fibrine) impliquées dans la réaction inflammatoire (Rankin, 2004). Le déclenchement et la poursuite de l'inflammation ainsi que sa diffusion à partir du foyer inflammatoire font appel à des facteurs synthétisés localement ou qui sont présents à l'état de précurseurs inactifs dans la circulation sanguine (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

Deux stades de l'inflammation existent, l'inflammation aiguë et chronique. L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), qui est médiée par l'activation du système immunitaire. Ce type d'inflammation persiste seulement pendant un court laps de temps et est généralement bénéfique pour l'hôte (Serhan *et al.*, 2010). Si l'inflammation dure pendant une longue période, la deuxième étape de l'inflammation ou inflammation chronique s'installe dans l'hôte et peut le prédisposer à diverses maladies chroniques, y compris le cancer (Dorward *et al.*, 2012).

V.1. Phases de l'inflammation

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle dure de quelques jours à quelques semaines et peut être divisée en trois grandes phases; une phase vasculaire immédiate; une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation (Stevens, 2010).

V.1.1. Phase vasculaire (Réaction vasculo-exsudative)

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë (rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur). Elle comporte trois phénomènes: une congestion active, un œdème inflammatoire (l'exsudat) et une diapédèse leucocytaire (Lee et Surh, 2012).

V.1.1.1. Congestion active

Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. Les petits vaisseaux sont dilatés et gorgés d'hématies, bordés d'un endothélium turgescent. La congestion est déclenchée par un mécanisme nerveux (nerfs vasomoteurs) et par l'action de médiateurs chimiques (Rankin, 2004).

V.1.1.2. Œdème inflammatoire

Il s'agit du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide, appelé exsudat, fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques). L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine (Dorword *et al.*, 2012).

V.1.1.3. Diapédèse leucocytaire

C'est la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes (Buckley *et al.*, 2014).

V.1.2. Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Les macrophages ont pour fonction d'assurer la détersion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Wagner et Roth, 2000). Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8, C5a et LTB4. Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule.

Ceci conduit à la sécrétion des protéases (élastase et collagénase), et la libération des radicaux libres (Dorward *et al.*, 2012). Les polynucléaires vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir. Ceci constitue le passage de la réaction inflammatoire proprement dite à la réaction immunitaire et la mise en place des processus inhérents (Diegelman et Evans, 2004).

V.1.3. Phase de régénération

La phase de régénération passe par une détersion ou élimination de l'agent causal et des débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire de façon interne (phagocytose, pinocytose) ou externe par les orifices naturels ou par formation d'abcès. Puis une cicatrisation, celle-ci dépend de l'importance de la perte de substances survenues à la phase aiguë (Weill *et al.*, 2003). Le tissu conjonctif est construit de nouveau par la synthèse de collagène, la multiplication cellulaire (fibroblastes) et la néogénèse vasculaire à partir des capillaires persistants ou localisés en périphérie du site. La surproduction de tissu conjonctif lors de la cicatrisation aboutit à la formation de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes, également un défaut de détersion pouvant entraîner une persistance des phénomènes inflammatoires (Krishna et Upendra, 2012).

V.2. Anti-inflammatoires

Un anti-inflammatoire est un médicament destiné à combattre une inflammation. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiques destinées à traiter, une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent. Ces médicaments ont des structures chimiques très variées. Toutefois, ils présentent des caractères communs (Ouédraogo *et al.*, 2012):

- **Sur le plan pharmacologique:** Tous les anti-inflammatoires, inhibent la synthèse des prostaglandines.
- **Sur le plan activité:** Ils possèdent, en plus de leurs activités anti-inflammatoires, des effets analgésiques et antipyrétiques.
- **Sur le plan chimique:** Ils présentent des fonctions acides ou des caractères acides.

V.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments à propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (Ortega *et al.*, 2014). L'inhibition de cette enzyme par les AINS est responsable d'une diminution de production des prostaglandines E_2 et I_2 , médiateurs importants des phénomènes inflammatoires. Cependant,

l'inhibition de ces prostaglandines ainsi que du thromboxane A₂ dans l'ensemble des tissus rend compte des effets indésirables potentiels de la plupart des AINS (Corrado *et al.*, 2009):

- Diminution de la protection de la muqueuse gastro-intestinale (responsable d'ulcères gastro-duodénaux).
- diminution de l'agrégabilité plaquettaire (responsable d'une augmentation du risque hémorragique).

V.2.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et migrent vers le noyau pour agir directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques (Wagner et Roth, 2000). Ce complexe intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles en réduisant la perméabilité capillaire, la production de facteurs chimiotactiques, la phagocytose, bloquant ainsi la libération de sérotonine, d'histamine et de bradykinines (Eming *et al.*, 2007). De plus, les glucocorticoïdes peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, dont le NF- κ B et la protéine activatrice-1(AP-1), inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-2, TNF- α); récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 (Borovikova *et al.*, 2000).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie (Henzen, 2003). Divers troubles peuvent être observés tels que la dérégulation de la synthèse naturelle des glucocorticoïdes à la fin du traitement, des troubles digestifs (apparition d'ulcères gastro-duodénaux), musculosquelettiques et endocriniens ainsi que l'hypertension artérielle (Chung, 2014).

V.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques trouvés dans les plantes médicinales est très vaste, et leurs spectre d'activité est grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (Zeinali *et al.*, 2017).

VI. Ulcère gastrique

L'ulcère est en quelque sorte une plaie, qui peut être superficielle ou profonde. Il s'accompagne généralement d'inflammation et de douleurs à l'abdomen. Les douleurs ulcéreuses proviennent du contact entre l'acide sécrété par l'estomac et la plaie (Dipiro *et al.*, 2002). Il existe chez le sujet sain un équilibre entre l'agression chlorhydropeptique (HCl, pepsine et gastrine) et la défense de la muqueuse gastrique (mucus, bicarbonates, flux sanguin muqueux et cytoprotection). Or un déséquilibre de cette balance envers l'un des plateaux (augmentation de l'agression ou diminution de la résistance de la muqueuse gastrique) pourrait être responsable de l'apparition d'une ulcération (Kansara et Sakhreliya, 2013 ; Awaad *et al.*, 2013).

VI.1. Causes provoquant l'ulcère

Les causes citées pour cette maladie sont une production excessive d'acide par l'estomac, la prise fréquente de médicaments (l'aspirine, les corticoïdes et les AINS) qui endommagent la paroi du tube digestif, un choc, l'alimentation (café, de la bière, du soda), tabac, une brûlure grave, la bactérie *Helicobacter pylori*, des blessures importantes ou encore le stress lié à une maladie grave (Mohammad *et al.*, 2003).

VI.2. Traitements médicaux

Habituellement, le traitement médical de l'ulcère ne diffère pas, que celui-ci soit gastrique ou duodénal. L'objectif est de diminuer l'acidité gastrique, ce qui permet aux ulcères de guérir tout en éliminant les douleurs. Le traitement antiulcéreux idéal devrait atteindre quatre objectifs soulager la douleur, accélérer la cicatrisation, prévenir les complications et diminuer la fréquence de récurrences (Waller *et al.*, 2005).

VI.3. Méthodes d'études expérimentales de l'activité antiulcéreuse

L'étude de l'activité anti-ulcéreuse consiste à provoquer de manière expérimentale l'ulcère gastrique chez les animaux de laboratoire. Il est nécessaire de provoquer l'ulcère chez les animaux avec différents agents ulcérogènes. Les différents modèles d'ulcères expérimentaux sont les ulcères provoqués par les AINS, l'alcool (l'éthanol), HCl, le stress, l'histamine, etc.....

L'activité anti-ulcéreuse d'une substance peut être testée en administrant avant ou après l'agent ulcérogène et à évaluer son effet. L'évaluation de l'activité antiulcéreuse se fait par la détermination et l'appréciation d'une échelle de gravité des lésions ou de l'indice d'ulcère (Adinortey *et al.*, 2013).

VI.3.1. Ethanol

L'alcool est probablement responsable pour une proportion considérable de l'ulcère humain et aussi c'est un stimulant ulcérogénique expérimentale convenable. L'éthanol est sensé provoquer les ulcères indépendamment de n'importe quel effet sur la sécrétion de l'acidité gastrique (Abdel-Salam *et al.*, 2001). Les prostaglandines, qui sont de puissants inhibiteurs de l'ulcère provoqué par de l'éthanol, cytoprotectif à doses trop petite pour modifier la sécrétion de l'acidité gastrique à forte dose l'alcool peut entraîner une lésion de la muqueuse gastrique par action irritante locale (Kumar *et al.*, 2011). La production de lésions par l'éthanol peut être multifactorielle. Le flux sanguin gastrique contribue de manière significative aussi bien dans les aspects hémorragiques que ceux nécrotiques des lésions des tissus. Les éléments de la voie de la 5-lipoxygénase peuvent aussi jouer un rôle clé dans l'ulcérogénicité de l'éthanol (Adinortey *et al.*, 2013).

VI.3.2. Acide Acétyl salicylique (Aspirine) et les AINS

La toxicité des AINS pour la muqueuse gastro-duodénale se manifeste par l'apparition d'érosions et parfois d'un ulcère, le plus souvent de localisation gastrique. Les AINS provoquent leurs effets ulcérogéniques par inhibition des prostaglandines cytoprotectrices. L'autre voie métabolique de l'acide, celle qui mène à la synthèse des leucotriènes se trouve privilégiée. L'absence des prostaglandines est généralement considérée comme responsable de la genèse des lésions gastriques (Patro *et al.*, 2014).

VI.3.3. Ulcères provoqués par d'autres produits chimiques

Histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT) et les Corticoïdes (e.g. prednisolone) peuvent tous provoquer les ulcères gastro-duodénaux à des dosages et dans des conditions appropriés. L'histamine est considérée comme principal facteur étiologique des lésions gastriques. Elle provoque des désordres vasculaires au niveau gastrique. Le cas de la sérotonine est plus complexe puisqu'elle est le médiateur du cerveau impliqué dans le stress, le trauma et la dépression, ce qui est important dans l'étiologie des ulcères gastriques (Waller *et al.*, 2005).

VI.3.4. Ulcère induit par le stress

Les ulcères provoqués par le stress chez les animaux sont désagréables, mais le stress reste la majeure cause des ulcères chez l'homme (Williamson *et al.* 1996).

VII. Cicatrisation

VII.1. Généralité sur la peau

La peau est définie comme étant l'organe de revêtement extérieur du corps de l'homme et des animaux. Elle est constituée de trois tissus superposés: l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épaisseur de la peau varie selon le sexe, l'âge et la région du corps. Elle est plus mince chez les femmes, chez les personnes âgées, au niveau des paupières et des organes génitaux (1 mm). En revanche, elle est plus épaisse au niveau de la zone palmo-plantaires environ 4 mm (Tortora *et al.*, 1994).

La peau possède de nombreuses fonctions impliquées principalement dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme, la thermorégulation, la défense contre les agressions extérieures et les agents exogènes. Elle joue également un rôle dans les fonctions sensorielles et métaboliques telle que la synthèse de vitamine D (Tortora *et al.*, 1994; Kanitakis, 1998).

L'ampleur des dommages infligés à la peau à la suite d'une blessure dépend de la profondeur de celle-ci, qui est classifiée en trois degrés (plaie du premier, second et troisième degré), de son étendue (la superficie endommagée), et de la nature de l'agression (exemple: traumatisme, chaleur, froid, produits chimiques). Ces trois paramètres influencent le choix du traitement puisque le déroulement de la guérison en est affecté (Lindsay 1996 ; Paletz et Morris, 1996).

VII.2. Généralité sur la cicatrisation

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant, à partir d'une plaie, à la restauration de la structure cutanée. De cette manière les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres (Tortora *et al.*, 1994). Cette capacité reste cependant soumise à de nombreux facteurs: La rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie dépendent de l'état général du patient, de l'étiologie de la lésion, de l'état et de la localisation de la plaie, de la survenue ou de l'absence d'une infection. D'autres facteurs peuvent être des obstacles à la cicatrisation, tels que le diabète, la malnutrition, l'obésité, le tabagisme, l'âge avancé, les traitements à base de corticoïdes et d'immunosuppresseurs (Smith et Dean, 1998).

VII.3. Etapes de la cicatrisation

VII.3.1. Phase inflammation et formation de caillot

La plupart des blessures cutanées comportent des effractions vasculaires, qui entraînent l'irruption du sang en dehors des vaisseaux. Après agrégation et dégranulation des plaquettes, la coagulation du sang conduit à la formation d'un caillot fibrino-plaquettaire. Ce dernier est composé de plaquettes incluses dans un réseau formé en majorité de fibrine ainsi que de fibronectine plasmatiques, de vitronectine et de thrombospondine (Ashcroft *et al.*, 2000).

VII.3.2. Phase de profération

Au bout de trois jours, le caillot fibrino-plaquettaire se rétracte laissant apparaître le tissu conjonctif sous-jacent qui prend le nom de tissu de granulation, du fait de la présence des granulations roses qui apparaissent à la surface du nouveau derme et qui correspondent aux nombreux capillaires qui l'envahissent (Eming *et al.*, 2007). Cette néo-vascularisation est due à l'angiogénèse, qui est déclenchée et entretenue principalement par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (β -FGF), sécrétés par les cellules endothéliales lésées et les macrophages. Outre les vaisseaux sanguins, le tissu de granulation contient principalement des macrophages et des fibroblastes qui sécrètent en particulier le collagène (Lewis *et al.*, 2011).

VII.3.3. Phase de remodelage

La phase de remodelage débute, après fermeture de la plaie, par une régression du tissu granuleux qui peut persister pendant 2 ans. La contraction des plaies est achevée vers le 21^{ème} jour associé à un contenu maximal en collagène. De même que la résistance de la cicatrice à l'étirement n'atteint qu'environ 15% de celle de la peau normale. Enfin cette résistance est augmentée de façon considérable jusqu'à 70% grâce au remodelage (Stevens et Lowe, 2009).

Matériel & méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante *Cytisus triflorus* a été récoltée au mois d'Avril 2014 de la région de Chemini (Bejaia). L'identification a été faite par Pr. Oudjih Bachir, université Elhadj Lakhdar, Batna. Le mélange de feuille et fleurs est nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

I.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles, Albinos Wistar dont le poids varie entre 200 et 250g, procurés aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages de polypropylène munies d'une porte étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations. Ces rats sont utilisés après une période d'adaptation de 7 jours durant laquelle ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

I.3. Souches bactériennes et champignons

Dix souches bactériennes: à Gram négatif (*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 à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance envers les antibiotiques. Elles sont activées à 37°C par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH). Ces bacteries nous ont été fournies par le laboratoire de CHU de Tlemcen.

Cinq souches de champignons lévuriformes et filamenteux: *Candida albicans* ATCC 1024, *Aspergillus niger* 2AC 936 et *Aspergillus flavus* NRRL 3357 sont fournis par le laboratoire de CHU de Sétif. *Penicillium notatum* et *Fusarium oxysporium* sont procurées auprès du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Sétif 1. Pour la réalisation des antibiogrammes, les champignons sont cultivés sur un milieu solide Sabouraud (Merk, Allemagne).

I.4. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), Ferrosine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt], β -carotène, Tween 40, Diméthylsulfoxyde (DMSO), Acide trichloracétique (TCA), Éthylènediaminetétraacétique (EDTA), Thiocyanate de potassium (KCN), trichlorure de fer (FeCl_3), Nitro-

bleu tétrazolium (NBT), Méthanol, Ethanol à 70%, n-butanol, Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), réactif de Folin-Ciocalteu, Acide gallique, Quercétine, Acide ascorbique, Albumine de sérum bovin (ASB), Ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆], Acide Thiobarbiturique (TBA), Acide Thionitrobenzoïque (DTNB), Glutathion réduit (GSH), Tétrachlorure de carbone (CCl₄), Phosphate de monopotassium (KH₂PO₄), Phosphate dipotassique (K₂HPO₄), Trishydroxyméthylaminométhane (Tris-HCl), Pyrogallol et Carbonates de sodium (Na₂CO₃) proviennent de Sigma. Chlorure ferreux (FeCl₂), acide linoléique et 2, 6 di-tert-butyl-4-méthyl phenol (BHT) proviennent de Fluka.

II. Méthodes

II.1. Méthode d'extraction

II.1.1. Principe

L'extraction des principes actifs est effectuée par la macération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant (méthanol) à température ambiante (Sharma *et al.*, 2008).

II.1.2. Préparation de l'extrait brut

Le mélange de feuille et fleurs de *Cytisus triflorus*, préalablement nettoyées et broyées, est mis à macérer dans le méthanol pendant sept nuits à température ambiante (Sharma *et al.*, 2008). Le macérât est filtré sur papier wattman, évaporé par un rotavapeur (BÜCHI) afin d'éliminer le solvant organique puis complètement séché à l'étuve (40°C) pendant 24 h. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut (E.Br) du mélange de *Cytisus triflorus*.

II.1.3. Fractionnement de l'extrait brut

L'E.Br est fractionné selon la méthode de Markham (1982), en utilisant une série de solvants à polarité croissante. L'E.Br est initialement mélangé avec l'éther de pétrole (V/V). Après décanation, la phase organique supérieure est récupérée. Cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devient transparent. L'éther de pétrole est par la suite évaporé, et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'éther de pétrole (E. Ep). La phase aqueuse inférieure est soumise à un autre fractionnement par le chloroforme pour donner l'extrait du chloroforme (E.Ch), et enfin par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction de l'acétate d'éthyle (E.Ae). Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (E.Aq) résiduelle qui est conservée avec les autres extraits jusqu'à l'utilisation.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

II.2.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu, en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique bleu. La coloration bleue obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm et l'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1968).

II.2.2. Mode opératoire

Le contenu en polyphénols totaux des extraits de *Cytisus triflorus* est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Li et ses collaborateurs (2007). Un volume de 50 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 250 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (2 M, 10 fois dilués). Après 4 min, 200 µl de carbonates de sodium (7.5 g/100 mL) sont additionnés. Le mélange est incubé pendant 90 min à température ambiante, puis la lecture est faite à 765 nm. L'acide gallique (5-150 µg/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

II.3. Dosage des flavonoïdes

II.3.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($C=O$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols (Chang *et al.*, 2002). Ces complexes colorés avec le chlorure d'aluminium forment un complexe jaunâtre par des chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes (Chang *et al.*, 2002).

II.3.2. Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes de *Cytisus triflorus* est réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Bahorun et ses collaborateurs (1996). Un volume de 1 mL de la solution d' $AlCl_3$ (2%) est ajouté à 1 mL de la solution de l'échantillon (préparés dans le méthana-

nol). Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante puis la lecture est faite à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine (0 à 40 mg/mL). Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg quercétine (QE)/g de chaque extrait.

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants (composants a la fois hydrophiles et hydrophobes), il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement de façon précise. Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Alam *et al.*, 2013). La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel et le pourcentage d'inhibition (PI) de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$PI\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ d'extraits) / Abs\ contrôle] \times 100$$

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀). Une faible valeur de CI₅₀ correspondant à une grande efficacité de l'extrait (Perron et Brumaghim, 2009).

II.4.1. Test de piégeage du radical DPPH

II.4.1.1. Principe

La molécule de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse. Le DPPH• est un radical dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine (DPPH, H) par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité de piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Prior *et al.*, 2005).

b. Mode opératoire

L'effet piégeur des extraits de *C. triflorus* vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par Cuendet et ses collaborateurs (1997). Un volume de 1250 µl de la solution méthanolique de DPPH (0,004 %) est mélangé avec 50 µl de différentes dilutions de chaque extrait ou des antioxydants standards (BHT, l'acide gallique, la quercétine et la rutine) à différentes concen-

trations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm.

II.4.2. Réduction du radical-cation ABTS^{•+}

II.4.2.1. Principe

Le test de l'ABTS (Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu foncé en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates de potassium (ABTS + Ions persulfates → ABTS^{•+}). En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm. Ce test est simple, opérationnel, reproductible et peut être utilisé dans différents milieux (Schlesier *et al.*, 2002).

II.4.2.2. Mode opératoire

Le test ABTS est effectué selon la méthode décrite par Rubalya Valentina et Neelamegam (2015). La solution ABTS^{•+} a été produite en faisant réagir 7 mM de sel ABTS avec 2.45 mM de persulfate de potassium dans 25 mL d'eau distillée, à température ambiante et à l'obscurité, et conservée pendant 12 h avant l'utilisation. La solution ABTS^{•+} a été diluée avec le méthanol afin d'obtenir une absorbance de $0,850 \pm 0,025$ à 734 nm. Ensuite, 2,3 mL de solution radicalaire ABTS ont été ajoutés à 100 µl de la solution à différentes concentrations d'extraits. Le mélange est incubé à 37°C à l'abri de la lumière pendant 30 min.

II.4.3. Blanchissement du β-carotène

II.4.3.1. Principe

Le mécanisme de blanchiment du β-carotène est un phénomène dont le médiateur est un radical libre. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres oxydent le β-carotène, molécule hautement insaturée, ce qui entraîne la perte de ses doubles liaisons, et par conséquent la disparition de sa couleur rouge. Cette décoloration est suivie par spectromètre à 490 nm (Reis *et al.*, 2011). Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β-carotène. Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Naidu *et al.*, 2011).

II.4.3.2. Mode opératoire

La capacité des extraits de *C. triflorus* de prévenir le blanchissement du β -carotène est déterminée selon la méthode décrite par Aslan et ses collaborateurs (2006). Une solution de β -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: 0.5 mg de β -carotène est dissous dans 1 mL de chloroforme, ensuite, 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C par le rotavapor. Un volume de 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été ajouté au mélange avec agitation vigoureuse. Le milieu réactionnel contient 2.5 mL de l'émulsion de β -carotène/acide linoléique et 350 μ l des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (BHT). Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydants (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 μ L de méthanol et d'eau distillée) est suivie à 490 nm. La lecture est faite pendant 48 heures avec des intervalles de temps réguliers (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h). Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β -carotène par des extraits a été mesuré comme suit:

$$\text{PI}\% = \text{Abs}_{t=48\text{h}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{t=48\text{h}} (\text{BHT}) * 100$$

II.4.4. Pouvoir réducteur

II.4.4.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Ce test consiste à évaluer l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium (de couleur jaune) en fer ferreux (Fe^{2+}). Cette réduction peut être quantifiée par la mesure de la formation de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Amarowicz *et al.*, 2004).

II.4.4.2. Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de Kalaivani et ses collaborateurs (2010). Un volume égal à 400 μ l de l'échantillon, à différentes concentrations, est mélangé avec 400 μ l d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH = 6.6) et 400 μ l d'une solution de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1%. Le tout est incubé dans un bain marie à 50° C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 400 μ l d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Finalement, 200 μ l du surnageant sont ajoutés à 200 μ l d'eau distillée et 40 μ l de la solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1%. Après 10 min d'incubation à l'obscurité et à température am-

biante, l'absorbance est lue à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales.

II.4.5. Test de chélation des ions ferreux

II.4.5.1. Principe

Le pouvoir chélateur du fer est une méthode utilisée pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné. En effet, la ferrozine forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important. (Zhao *et al.*, 2010).

II.4.5.2. Mode opératoire

Le test de chélation des ions ferreux a été réalisé selon la méthode de Le et ses collaborateurs (2007). Une prise de 250 µl d'extrait à différentes concentrations est ajoutée à 50 µl de Chlorure de fer (0.6 mM) et 450 µL de méthanol. Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 100 µl de ferrozine (5 mM) ont été additionnés au milieu réactionnel, le mélange a été bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc contenant tous les réactifs à l'exception de la ferrozine. Une absorption plus faible indique un pouvoir de chélation plus élevé.

II.4.6. Test anti-hémolytique

II.4.6.1. Principe

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour cette étude, en raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine. Ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs et la stabilité de leurs membranes (Thephinlap *et al.*, 2013).

II.4.6.2. Mode opératoire

Du sang fraîchement prélevé sur un tube d'héparine est centrifugé à 3500 tours/minutes pendant 15 min. Après élimination du surnageant (plasma), les globules rouges sont mis en suspension dans 10 mL de NaCl à 0,9% et centrifugés à 2500 tours/minutes pendant 10 min. Les globules rouges ont été lavés trois fois avec la même solution. La suspension des globules rouges a été incubée avec 5 µM de sulfate ferreux et diverses concentrations des extraits à 37 °C pendant 30 min. Après incubation, une nouvelle centrifugation à 2500 tours/minutes pendant 5 minutes a été

effectuée. L'hémolyse a été déterminée en mesurant la densité optique du surnageant à 540 nm. L'albumine de sérum bovin (ASB) a été utilisée comme standard (Thephinlap *et al.*, 2013).

II.4.7. Activité de piégeage du radical superoxyde

II.4.7.1. Principe

Le dosage de l'anion superoxyde a été effectué par un dosage alcalin au DMSO (diméthylsulfoxyde). Cette méthode évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Ce radical est généré par l'addition de NaOH au DMSO réduisant le NBT^{2+} (de couleur jaune) en bleu de formazan (de couleur mauve) dont l'absorbance est mesurée à 560 nm. Ainsi, un composé antioxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune (Gowri et Madhavan, 2013).

II.4.7.2. Mode opératoire

L'activité est basée sur la méthode décrite par Gowri et Madhavan (2013). Le mélange réactionnel contient 0,1 mL de NBT (1 mg/mL dissous dans le DMSO) et 0,3 mL de l'extrait à différentes concentrations. Un volume de 1 mL de DMSO alcalin (1 mL de DMSO contient 5 mm NaOH) a été ajouté pour donner un volume final de 1,4 mL. L'absorbance est mesurée à 560 nm contre un blanc contenant le DMSO. L'acide ascorbique est utilisé comme standards positif.

II.4.8. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène

II.4.8.1. Principe

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

II.4.8.2. Mode opératoire

Le potentiel de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits de *C. triflorus* est estimé par la méthode de Mukhopadhyay et ses collaborateurs (2016). 250 µl de sulfate d'ammonium ferreux (2 mM) sont ajoutés à 1,5 mL de différentes concentrations d'extrait. Le mélange est agité vigoureusement, puis 62,5 µL de peroxyde d'hydrogène (5 mM) sont ajoutés et le mélange est agité et laissé au repos à la température du laboratoire pendant 5 min. Ensuite, 1,5 mL de 1,10-phénanthroline (1 mM) ont été ajoutés à chaque tube. Le mélange est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Enfin, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 510 nm. La même procédure a été répétée pour l'acide ascorbique qui est utilisé comme standard.

II.4.9. Inhibition du radical hydroxyle

II.4.9.1. Principe

La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical OH• avec une molécule détectrice. Le radical hydroxyle est produit par réaction entre le sulfate ferreux (FeSO₄) et le peroxyde d'hydrogène (Nagarajan et Sellamuthu, 2013).

II.4.9.2. Mode opératoire

La capacité de piégeage du radical hydroxyle est déterminée par le mode opératoire décrit par Ates et ses collaborateurs (2008). Un volume de 500 µl de FeSO₄ (1,5 mM) ajouté à 350 µl de H₂O₂ (6 mM). Après 5 min d'incubation, 150 µl de salicylate de sodium (20 mM) et 1 mL de différentes concentrations des extraits de *C. triflorus* ou l'acide ascorbique (standard) ont été ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min, puis, l'absorbance des échantillons a été lue à 562 nm.

II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque, puisque cette méthode est facile à mettre en œuvre, reproductible et ne nécessite pas d'équipements coûteux.

II.5.1. Principe de l'antibiogramme

La réalisation d'un antibiogramme consiste à la recherche de la sensibilité d'une bactérie envers un nombre donné d'antibiotiques. Parmi les multiples méthodes appliquées, celle dite de diffusion en milieu gélosé qui s'avère la plus utilisée pour la réalisation d'un antibiogramme. Cela consiste à placer un disque de papier imprégné d'antibiotique sur la gélose inoculée au préalable. L'antibiotique diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque (Carson *et al.*, 2002).

II.5.2. Activité antibactérienne

Les différentes espèces bactériennes sont d'abord repiquées par la méthode des stries sur le milieu Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant 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 (Falleh *et al.*, 2008). 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 placés sur les boîtes puis chargés avec 15 µl des différents extraits de *C. triflorus* (E.Br /E.Ch /E.Ae /E.Ep /E.Aq) dissous dans le DMSO avec une concentration de 200 µg/mL. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée et de DMSO. Des

disques standards contenant les antibiotiques de référence (gentamycine et pénicilline) servent de contrôles positifs. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h. Les résultats sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques.

II.5.3. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé citée par Sacchetti et ses collaborateurs (2005). Une ou plusieurs colonies de chaque culture des champignons/levures sont prélevées et transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique afin d'avoir des suspensions de $2 \cdot 10^6$ spores/mL pour les champignons et 10^5 spores/mL pour les levures (Yazdani *et al.*, 2012). Un prélèvement à partir de cet inoculum sert à ensemencer de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu gélose Sabouraud par la technique d'écouvillonnage. Des disques whatman stériles de 6 mm de diamètre sont placés sur les boîtes puis chargés de 15 µl des différents extraits de *C.triflorus* dissous dans le DMSO à une concentration de 200 µg/mL. Les levures ont été incubées 48 h à 37 °C, tandis que les champignons ont été incubés 7 jours à 27 °C. Le Clotrimazon à 50 µg et le DMSO ont été utilisés comme contrôles positif et négatif respectivement. L'activité antifongique des différents extraits a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

II.6. Etude de la toxicité aiguë de *Cytisus triflorus*

II.6.1. Principe

La méthode de toxicité aiguë décrite dans la Ligne directrice Européenne code 425 (OCDE), est une méthode reproductible qui utilise très peu d'animaux d'un seul sexe. Elle consiste à administrer, par voie orale, une dose déterminée de la substance traitée à un groupe d'animaux. Cette méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL_{50} , mais permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance est considérée létale. Pour ceci, la mort d'un nombre d'animaux reste le principal effet observé.

II.6.2. Mode opératoire

L'étude de toxicité a été menée suivant la méthode de « l'ajustement des doses » de la ligne 425 de l'OCDE (OCDE, 2008). Elle consiste à tester l'extrait brut de *C.triflorus* à la dose de 2000 mg/kg. L'essai a été réalisé sur 6 rats mâles et leur comportement ainsi que le nombre de décès ont été observés durant une période de 14 jours.

Après 15 h de jeûne, les rats ont été répartis de la façon suivante: lot témoin constitué de 3 rats recevant de l'eau distillée à raison de 10 mL/kg; lot expérimental constitué de 6 rats recevant l'extrait brut à raison de 2000 mg/kg. Une observation comportementale a été réalisée 3 h après l'administration des substances. Ensuite, l'alimentation des rats a été effectuée de façon quoti-

dienne pendant 14 jours. Pendant cette période, les signes de toxicité notamment la modification du pelage, la motilité, les tremblements, la respiration, la sensibilité au bruit après un choc métallique, l'aspect des selles, la mobilité ainsi que le décès ont été notés. A la fin du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 4h, puis un prélèvement sanguin suivi d'une dissection ont été effectués, et les organes (foies et reins) ont été prélevés.

II.7. Effet hépato-protecteur

Pour reproduire le modèle de d'hépatotoxicité, nous avons utilisé le CCl_4 préalablement dilué dans l'huile d'olive à 50 % (V/V), administré par voie intrapéritonéale une seul fois durant la période d'expérimentation (soit le 1^{er} jour ou le dernier jour de l'expérience).

II.7.1. Effet Préventif

L'induction de l'hépto-toxicité est effectuée selon le protocole de Wang et ses collaborateurs (2004). L'ensemble des rats mâles ont été divisés en quatre groupes, de sept rats chacun. Les 02 groupes tests ont reçu quotidiennement (à la même heure) et par voie orale (gavage), l'E.Br 200 mg/Kg et l'E.Br 400 mg/Kg, respectivement. Les deux groupes contrôles ont reçu le NaCl 0.9 %. Ce traitement est fait durant une semaine. Dans le septième jour, les rats des groupes tests ont été injectés par 3 mL/kg de CCl_4 , alors que les rats des groupes contrôles ont été injectés par 1.5 mL/kg d'huile d'olive et par 3 mL/kg de CCl_4 (contrôle positif). Le groupe des normaux ne reçoit aucun traitement. Les rats sont sacrifiés au bout du huitième jour.

II.7.2. Effet Curatif

L'induction de l'hépto-toxicité est effectuée par l'injection intra-péritonéale de CCL_4 (3 mL/kg) le 1^{er} jour, 30 min avant l'administration par gavage de la première dose de l'extrait brut de *C. triflorus* (1^{er} groupe a reçu 200 mg/Kg et le 2^{ème} groupe 400 mg/Kg). Les deux lots reçoivent quotidiennement, par voie orale, l'extrait brut pendant une période d'une semaine.

II.7.3. Prélèvement du sang et des organes

A la fin de l'expérience, les rats sont anesthésiés par inhalation de Diéthyl éther dans une cloche en verre, et un prélèvement sanguin est effectué à partir de la veine orbitale à l'aide des tubes d'hématocrite. Après dissection, le foie et les reins sont prélevés et déposés dans l'eau physiologique, dégraissés, séchés par le papier filtre et pesés. Une partie du foie et des reins est conservée dans une solution de formol 10 % pour l'étude d'histopathologie, le rest est stocké au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant. Le sang récupéré dans des tubes héparinés est immédiatement centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 min. Les sérums sont récupérés et conservés à -4°C jusqu'à leurs utilisation pour des dosages biochimiques.

II.7.4. Dosage des paramètres sanguins

Les dosages biochimiques concernant les marqueurs hépatiques (ASAT, ALAT et PAL), rénaux (urée et créatinine), lipidiques (Cholestérol et Triglycérides) et le Glucose ont été réalisés dans le laboratoire d'analyse médicale Khaloua -Ain Arnat-Sétif.

II.7.5. Réalisation des coupes histologiques

La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire d'anatomie-pathologique de CHU de Sétif. Après avoir fixé le foie et les reins dans le formol (10%) pendant une semaine, on les a coupés en petits morceaux. Ces échantillons sont déshydratés par passage dans trois bains d'éthanol successifs de 30 min (70°, 90° et 100°C). Ensuite ils sont éclaircis dans deux bains de 20 min de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures chacun). L'opération est automatisée à l'aide d'un automate (TISSUE-TEK). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques. Les blocs de paraffine obtenus sont ensuite coupés par microtome et les coupes de 5 µm d'épaisseur sont étalées sur des lames avec un gel de gélatine à 2 % puis séchées dans une étuve réglée à une température de 35-42 °C, réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine.

II.7.6. Préparation de l'homogénat

Une quantité de 500 mg de foie des différents groupes étudiés, est additionné à 5mL du tampon KCl (0,15 M). Le mélange est homogénéisé à 1200 tours/minute par un homogénéiseur de dounce. L'homogénat est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 min à 4°C (Iqbal *et al.*, 2003). Le surnageant est aliquoté dans des eppendorfs puis conservé à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif (malonyldialdéhyde (MDA), glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase).

II.7.7. Dosage des marqueurs du stress oxydant

II.7.7.1. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase

a. Principe

La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en H₂O et O₂. L'activité de cette enzyme est mesurée par analyse spectrophotométrique (240 nm) du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'une source enzymatique (homogénat ou plasma). L'activité enzymatique est estimée en mesurant la différence d'absorbance par unité de temps (Aebi *et al.*, 1984).

b. Mode opératoire

L'activité de la catalase est déterminée par le mode opératoire décrit par Claiborne (1986). Un volume de 983,5 μl de H_2O_2 (0,091 M) préparé dans le tampon KHPO_4 (0.1 M, pH 7.2) a été ajouté à 16,5 μL d'homogénat ou plasma. Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz et l'échantillon est mesuré contre le blanc. L'absorbance est lue deux fois à 240 nm chaque 15 secondes à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'activité de la catalase est exprimée en μmol de H_2O_2 /min/mg de protéine au niveau tissulaires.

II.7.7.2. Dosage des protéines totales

a. Principe

Le principe de ce test est basé sur la complexation entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin (koller, 1984).

b. Mode opératoire

Les protéines totales dans le plasma ou l'homogénat du foie sont déterminées selon la méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact BSIS30-1). Un volume de 1 mL du réactif est ajouté à 25 μL d'homogénat ou du sérum et le mélange est incubé à 37 °C pendant 10 min. l'absorbance des échantillons est lue à 540 nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon (koller, 1984).

II.7.7.3. Activité de la superoxyde dismutase

a. Principe

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 et O_2 . Son dosage est réalisé avec le pyrogallol. L'auto-oxydation du pyrogallol est stable à pH acide mais elle est oxydée avec l'augmentation du pH, donc à pH=8 la superoxyde dismutase agit comme un inhibiteur puissant de l'oxydation spontanée de pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974).

b. Mode opératoire

L'activité enzymatique de SOD au niveau des homogénats a été effectué selon la méthode de Nandy et ses collaborateurs (2012). Pour un dosage spectrophotométrique, on introduit dans une cuve en polystyrène 1 mL du tampon Tris-EDTA (pH 8.14) avec 36 μL de pyrogallol (100 mM dans 0.01N HCL). L'absorbance est mesurée pendant 30 secondes à 420 nm en présence ou en absence de 16 μL de l'échantillon.

Une unité de SOD: c'est l'équivalent de la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber le ratio de l'auto-oxydation du pyrogallol par 50%. L'activité de SOD, exprimée en Unité/mg, a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Rate (R)} = (\text{Final DO} - \text{Initial DO}) / 0.5$$

Le pourcentage d'inhibition (I%) a été calculé selon la formule suivante:

$$I \% = [(R_p - R_s) / R_p] * 100$$

L'activité enzymatique du SOD en unité internationale a été calculée selon l'équation suivante:

$$\text{SOD (U)} = [(R_p - R_s) / (R_p * 0.5)]$$

Dont : - R_p = Ratio de l'auto-oxydation du pyrogallol (en absence de l'enzyme)

- R_s = Ratio de l'auto-oxydation (en présence de l'enzyme)

- 0.5 = exprime 50% d'inhibition.

II.7.7.4. Dosage du Glutathion réduit

a. Principe

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion, ce qui libère un composé jaune, l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel, à pH alcalin (8-9), présente une absorbance à 412 nm (Ellman, 1959).

b. Mode opératoire

Le dosage du GSH réduit au niveau du plasma et de l'homogénat a été déterminé selon le protocole d'Ellman (1959). Une quantité de 25 µl d'homogénat du foie est diluée dans 5 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). Puis, 3 mL de la solution d'homogénat diluée sont mélangés avec 20 µl de DTNB (0,01 M). La lecture de la densité optique est effectuée après 5 min d'incubation à température ambiante, à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10 %. La concentration du GSH dans l'échantillon est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et les valeurs sont exprimées en nmol/g de tissu de l'homogénat.

II.7.7.5. Dosage du malondialdéhyde

a. Principe

Le malonedialdéhyde (MDA) est dosé par la méthode colorimétrique en présence de l'acide thio barbiturique (TBA). La réaction au TBA est une méthode très sensible qui permet de détecter une quantité de peroxydes lipidiques et plus particulièrement le MDA libre. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C), entre le MDA et deux molécules de TBA, d'un pigment coloré rose absorbant à 530 nm. L'intensité de la coloration rouge augmente avec la concentration de l'MDA (Draper et Hardley, 1990).

b. Mode opératoire

Dans notre étude, le taux du MDA hépatique a été évalué selon la méthode Okhawa (1979). Un volume de 0,5 mL d'homogénat ou du plasma est ajouté à un mélange de 0,5 mL de TCA (20 %) et 1 mL de TBA (0,67 %). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 min. Après refroidissement, 4 mL du n-butanol sont ajoutés suivi par une centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 532 nm. La quantité du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et les valeurs sont exprimées en nmole de MDA formé par gramme de tissu.

II.8. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

II.8.1. Principe

L'injection de carrageenane sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure des rats entraîne l'apparition d'un œdème. L'intensité de cet œdème est évaluée grâce à l'augmentation du volume de la patte (par rapport au volume initial). L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (Winter *et al.*, 1962).

II.8.2. Mode opératoire

L'œdème de la patte induit par la λ -carrageenane chez le rat a été évaluée selon la méthode d'Elion Itou et ses collaborateurs (2014). Dans cette étude, des groupes de 7 rats sont formés. Les rats utilisés sont privés de nourriture pendant 12 h avec accès libre à l'eau avant la période d'expérimentation. Au moment de l'expérimentation, peser les rats, les répartir en cinq lots homogènes et déterminer les volumes des pattes au temps T_0 . Les rats constituant les deux groupes tests sont traités par voie orale (gavage) avec 2 mL de l'E.Br de *C. triflorus* aux doses de 200 et 400 mg/kg. Une heure après, l'injection de 0.2 mL de la λ -carrageenane à 1% a été effectuée par voie sous-cutanée au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure droite des rats. Les rats du groupe contrôle positif sont traités avec 2 mL de Diclofénac par voie orale une heure avant l'injection intrapéritonéale de la carrageenane. Les rats du groupe contrôle négatif sont traités avec 2 mL de NaCl 0.9% par voie orale une heure avant l'injection de la carrageenane. L'effet anti-inflammatoire a été évalué en mesurant l'épaisseur de l'œdème de la patte ayant reçu la carrageenane 1 % à 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h 6h et 12 h à l'aide d'un pied à coulisse. Le pourcentage d'augmentation (% AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe. Il est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ AUG} = \frac{(D_n - D_0) * 100}{D_0}$$

D_n : diamètre de la patte la $n^{\text{ième}}$ heure après l'injection de la carrageenane.

D0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carrageenane.

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe traité par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante:

$$\% \text{ INH} = \frac{(\% \text{ AUG témoin} - \% \text{ AUG traité}) * 100}{\% \text{ AUG témoin}}$$

II.9. Etude de l'activité cicatrisante

II.9.1. Principe

L'évaluation de l'activité cicatrisante consiste à créer des plaies sur des animaux préalablement anesthésiés puis à les traiter avec les préparations de pommade à tester.

II.9.2. Mode opératoire

Le protocole suivi est celui décrit par Sagliyan et ses collaborateurs (2010). Cette étude a été réalisée avec l'E.Br de *C. triflorus* à 200 et 400 mg/kg, préparé dans la vaseline à une concentration de 5% (w/w). La vaseline a été choisie comme excipient car elle donne une bonne consistance aux préparations destinées à un usage topique, ce qui permet un étalement rapide et permet d'augmenter la durée de conservation des différentes préparations. La crème Framycitin est utilisée comme crème standard et le groupe témoin ne reçoit que de la vaseline. Les rats ont été anesthésiés par une injection intra-péritoniale de 1mL de l'urithan 2% (W/V) en raison de 5mg/kg. Les poils de la partie dorsale de nos rats ont été enlevés à l'aide d'un rasoir et des plaies circulaires de 300 mm² ont été réalisées à l'aide d'une règle de surface et une lame de bistouri. Ces dernières sont ensuite nettoyées avec du coton avant l'application de la pommade. Les animaux ont été mis dans des cages individuelles munies de litières propres afin de les isoler aux moments de l'application des différents produits. Le pansement des plaies a été fait tous les jours en raison d'une fois par jour avec une quantité précise de la pommade (environ 0.4 g). Les mesures des plaies ont été faites tous les trois jours jusqu'à guérison complète. L'aspect, la couleur et l'odeur des plaies ont été notés pendant toute la durée du traitement. Le pourcentage de contraction ou rétrécissement des plaies est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Contraction de la plaie (\%)} = \frac{(\text{surface de la plaie M J1} - \text{surface de la plaie M Jn}) * 100}{\text{surface de la plaie M J1}}$$

Ou : M J₁ : Mesure au premier jour

M J_n : Mesure au n^{ème} jour

II.10. Activité protectrice de la muqueuse gastrique

II.10.1. Principe

L'étude de l'activité antiulcéreuse gastrique consiste à vérifier l'action protectrice des extraits contre l'ulcère provoqué chez les animaux par administration d'un agent ulcérogène telle que l'éthanol. L'évaluation de l'activité antiulcéreuse se fait par la détermination et l'appréciation d'une échelle de gravité des lésions ou de l'indice d'ulcère (Germano *et al.*, 1996).

II.10.1. Mode opératoire

La méthode suivie est celle décrite par Germano et ses collaborateurs (1996). Elle consiste à vérifier l'action protectrice de l'E.Br à 200 et à 400 mg/kg contre l'ulcère provoqué chez les animaux par administration de l'éthanol. Au total, quatre lots de sept rats ont été constitués pour le test à raison d'un lot pour chaque dose d'extrait (200 et 400 mg/Kg), un lot pour le témoin (l'eau distillée) et un lot pour la Ranitidine (5 mg/kg) qui est utilisée comme contrôle positif. Les rats ont été mis à jeun pendant 24 heures avec accès libre à l'eau glycosylé, ils sont placés séparément dans des cages individuelles avant expérimentation.

Au temps T= 0, les rats ont reçu par voie intra gastrique l'extrait brut (0,5 mL/ 200 g) aux doses de 200 et 400 mg/kg. Le lot témoin a reçu seulement l'eau distillée. Une heure après, chaque rat a reçu par voie intra gastrique 0,5 mL d'éthanol à 70%. Une demi-heure après administration de l'éthanol, les rats ont été sacrifiés. L'estomac de chaque rat a été prélevée, ouverte selon la grande courbure à l'aide d'un ciseau, lavée avec la solution physiologique puis bien étalée et fixée sur une tablette pour mieux observer les ulcères formés à l'œil nu. Les estomacs ont été photographiés pour une meilleure vision. Les analyses histologiques de la muqueuse gastrique glandulaire ont été réalisées afin de déterminer les degrés de sévérité des ulcères. La surface totale des lésions et la surface totale de l'estomac a été mesurée à l'aide d'un logiciel AUTOCAD-2018. Le pourcentage d'ulcération est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'ulcération} = (\text{Surface totale des lésions} / \text{Surface totale de l'estomac}) * 100$$

Le pourcentage d'inhibition de l'ulcère a été calculé pour chaque groupe traité selon cette formule :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{SUc} - \text{SUt}) * 100}{\text{U Sc}}$$

Où :

SUc : Surface ulcérée du contrôle.

SUt : Surface ulcérée du test.

II.11. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SD et moyenne \pm SEM, respectivement. Les valeurs d'CI₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les sigmoïdes de la cinétique sont effectués par le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Résultats Et Discussion

I. Extraits de *Cytisus triflorus*

L'extraction des extraits de mélange de feuille et fleurs de *C. triflorus* a été réalisée en deux étapes, la première est une extraction par le méthanol pour obtenir initialement l'E.Br contenant les polyphénols totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par une série de solvants à polarité croissante (éther de pétrole → chloroforme → acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'E.Br selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés). De ce fait, cinq différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait brut (E.Br), l'extrait d'éther de pétrole (E.Ep), l'extrait du chloroforme (E.Ch), l'extrait d'acétate d'éthyle (E.Ae) et l'extrait aqueux (E.Aq). Le rendement de chaque extrait par rapport au poids de l'E.Br est représenté dans le tableau V. Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'E.Br, l'E.Aq représente le rendement le plus élevé (38 %), suivi par E.Ep (28,06 %), E.Ch (17,2 %) et enfin E.Ae (8,2 %). Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes, à l'origine géographique, aux conditions et à la durée du stockage, à la période de la récolte, aux méthodes d'extraction appliquées, aux solvants utilisés et aux conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Sousa *et al.*, 2006).

II. Polyphénols totaux et flavonoïdes.

Afin de caractériser les extraits du *C. triflorus*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans le tableau V.

Tableau V: Rendement d'extraction, teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *C. triflorus*.

Extrait	Rendement de l'extraction %	Polyphénols totaux $\mu\text{g GAE/mg d'extrait}$	Flavonoïdes $\mu\text{g QE/mg d'extrait}$
E.Br	17.00 \pm .338	79.85 \pm 3.51	9.84 \pm 0.29
E.Ep	28.06 \pm 0.006	54.36 \pm 10.79	3.77 \pm 0.60
E.Ch	17.20 \pm 0.008	69.78 \pm 2.97	17.4 \pm 0.46
E.Ae	08.20 \pm 0.008	98.11 \pm 2.02	1.42 \pm 0.008
E.Aq	38.00 \pm 0.101	53.89 \pm 5.07	9.87 \pm 0.33

D'après les résultats, on constate que tous les extraits de la plante sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes. Le tableau V montre que l'E.Ae contient la teneur la plus élevée en polyphénols suivi par l'E.Br et l'E.Ch, tandis que l'E.Aq et E.Ep contiennent la même teneur (54 µg EAG/mg d'extrait).

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'E.Ch est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $17.4 \pm 0,46$ µg EQ/mg d'extrait suivi par E.Br et E.Aq ($9 \pm 0,077$ µg EQ/mg d'extrait). Cependant, E.Ep et E.Ae représentent des teneurs assez faibles qui sont respectivement $3.77 \pm 0,60$ et $1,42 \pm 0,008$ µg EAG/mg d'extrait.

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (Ryan *et al.*, 1999 ; Anusuya et Manian, 2013), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Perron et Brumaghim, 2009), la température et le solvant d'extraction (Sousa *et al.*, 2006 ; Conde *et al.*, 2009).

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques de l'espèce étudiée ont été réalisés. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de *C.triflorus* sont relativement identiques à ceux trouvés par Larit (2017) sur la même espèce obtenus en d'autres sites (Constantine-Algérie). Cependant, la teneur en flavonoïdes de l'espèce étudiée semble être légèrement inférieure à ces résultats.

III. Activité antioxydante *in vitro*

III.1. Effet piègeur du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de *C. triflorus vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Les résultats d'activité antiradicalaire obtenus (Fig.2) révèlent que les extraits de *C. triflorus* possèdent une activité remarquable vis à-vis du piégeage du DPPH.

L'E.Br représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre 34 µg/mL suivi par l'E.Aq et E.Ae ($CI_{50} = 45$ µg/mL et 68 µg/mL, respectivement). Telle activité est significativement supérieure à celle du BHT (87 µg/mL). Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'E.Ep ($CI_{50} = 343$ µg/mL), ce qui montre que les antioxydants apolaires sont inactifs vis-à-vis le DPPH.

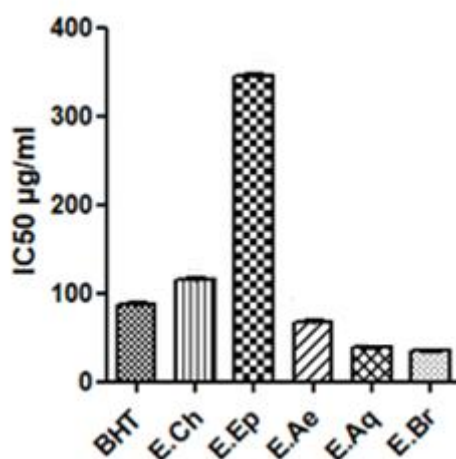


Fig. 2: CI₅₀ des différents extraits de *C. triflorus* vis-à-vis du radical DPPH. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **BHT:** hydroxytoluènebutylé. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

La comparaison entre ces résultats et les résultats du dosage où l'E. Ae présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes et polyphénols totaux, mais il ne présente pas l'activité antiradicalaire la plus forte. L'E.Ch aussi, présente une teneur en flavonoïdes supérieure à celle de l'E.Br mais l'activité anti-radicalaire a été mentionnée pour ce dernier. Ceci est probablement lié à la complexité de la composition de l'E.Br en substances polyphénoliques (y compris les tanins et les flavonoïdes) entre lesquelles la synergie peut résulter en meilleure activité antioxydante (Vermerris et Nicholson, 2006). Liu et ses collaborateurs (2010), ont testé l'effet synergique entre plusieurs antioxydants en utilisant le test de DPPH. Ils ont montré l'existence de plusieurs facteurs qui influence l'effet synergique d'un mélange des antioxydants dans un système biologique. La concentration et la combinaison sont les facteurs les plus importants qui influencent sur la synergie moléculaire. Il a été montré que des concentrations et des combinaisons particulières des antioxydants ont une activité supérieure à celle des molécules pures.

L'E.Aq est plus actif (CI₅₀ = 45 µg/mL) que les fractions d'E.Ae et E.Ch, cette activité antiradicalaire peut être expliquée par la présence de flavonoïdes détectés uniquement dans les extraits polaires (Popovici *et al.*, 2010). Dans un autre côté, Nos résultats vis-à-vis L'E.Br est en parfaite concordance avec les résultats de Larit (2017), dont l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *C. triflorus* a montré une activité antioxydante élevée avec une valeur d'CI₅₀ de l'ordre de 0,42 µg/mL.

III. 2. Réduction du radical-cation ABTS^{•+}

Le test ABTS était la méthode spectrophotométrique la plus populaire car elle est simple, rapide, sensible et reproductible. Sa réaction implique un processus de transfert d'atomes d'hydrogène et d'électrons (Re *et al.*, 1998). Le potentiel antioxydant de tous les extraits de *C. triflorus* a été évalué (Fig.3). Les résultats ont montré que l'extrait d'E.Ae ($CI_{50}=15,52 \mu\text{g/mL}$) a une activité non significative à celle de l'acide ascorbique ($13,79 \pm 1,05 \%$) utilisé comme contrôle positif. Cependant, l'E.Ch et E.Aq, avec une CI_{50} identique de $7,61 \mu\text{g/mL}$, ont présenté une capacité intéressante, qui est supérieur à celle de l'acide ascorbique. Les polyphénols contenus dans nos extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante. Par contre, les extraits E.Br et E.Ep ont une capacité moindre à piéger le radical ABTS^{•+} ($CI_{50}= 45,09 \mu\text{g/mL}$ et $68,7 \mu\text{g/mL}$ respectivement) qui est en accord avec la faible quantité en flavonoïdes.

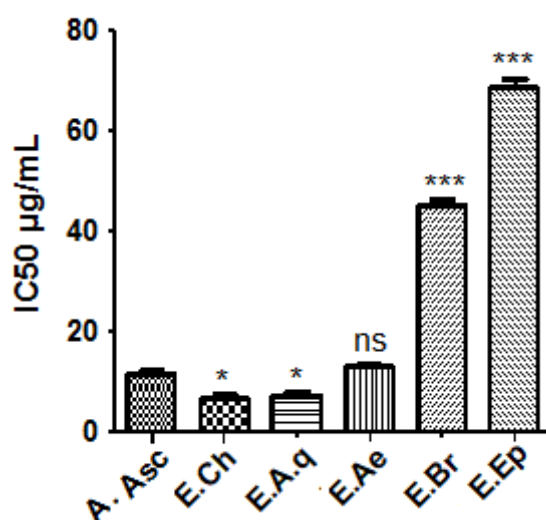


Fig. 3: Test de piégeage de l'ABTS des extraits de *C. triflorus* et de l'acide Ascorbique. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **A.Asc:** acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n= 3)

Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les CI_{50} et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes (Athamena *et al.*, 2010 ; Ghedadba *et al.*, 2015). En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Popovici *et al.*, 2010). L'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (Siddhuraju et Becker, 2007 ; Ghedadba *et al.*, 2015). Tous les extraits de *Cytisus triflorus* ont une CI_{50} supérieure à celle d'*Indigoferatinctoria L.* (Fabaceae), une étude menée selon Anusuya et Manian (2013).

III.3. Blanchissement du β -carotène

L'inhibition du blanchissement du β -carotène, dans une oxydation couplée à l'acide linoléique, est une méthodologie sensible, rapide et simple, et elle est utilisée pour évaluer l'activité antioxydant. D'après les résultats, une activité anti-péroxydation lipidique très importante a été obtenue avec tous les extraits de *C. triflorus* (Fig. 4). L'E.Br présentait un effet important qui est similaire à celui du BHT ($92,79 \pm 1,05$ %). De plus, il n'existe pas une différence significative entre ces extraits: l'E.Aq, E.Ch et E.Ae, dont leurs activités antioxydants relatives sont de $83,43 \pm 1,88$ %, $82,29 \pm 1,68$ % et $81,32 \pm 1,28$ %, respectivement. Cette activité est peut être due à leurs capacité d'inhiber la peroxydation lipidique et/ou piéger les radicaux provenant de l'acide linoléique. Nous notons aussi que l'E.Ep représente l'extrait le moins actif avec une activité antioxydant égale à $17,70 \pm 3,40$ %. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs. Il existe une corrélation entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et l'activité antipéroxydation lipidique des extraits de *C. triflorus*. Selon Gao et ses collaborateurs (1998), les flavonoïdes et autres polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et, par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides. Il a été décrit que les propriétés réductrices sont généralement associés à la présence de structures réductrices, qui exercent une action antioxydante par rupture de la chaîne radicalaire en propagation en cédant des atomes d'hydrogènes (Dacosta, 2003).

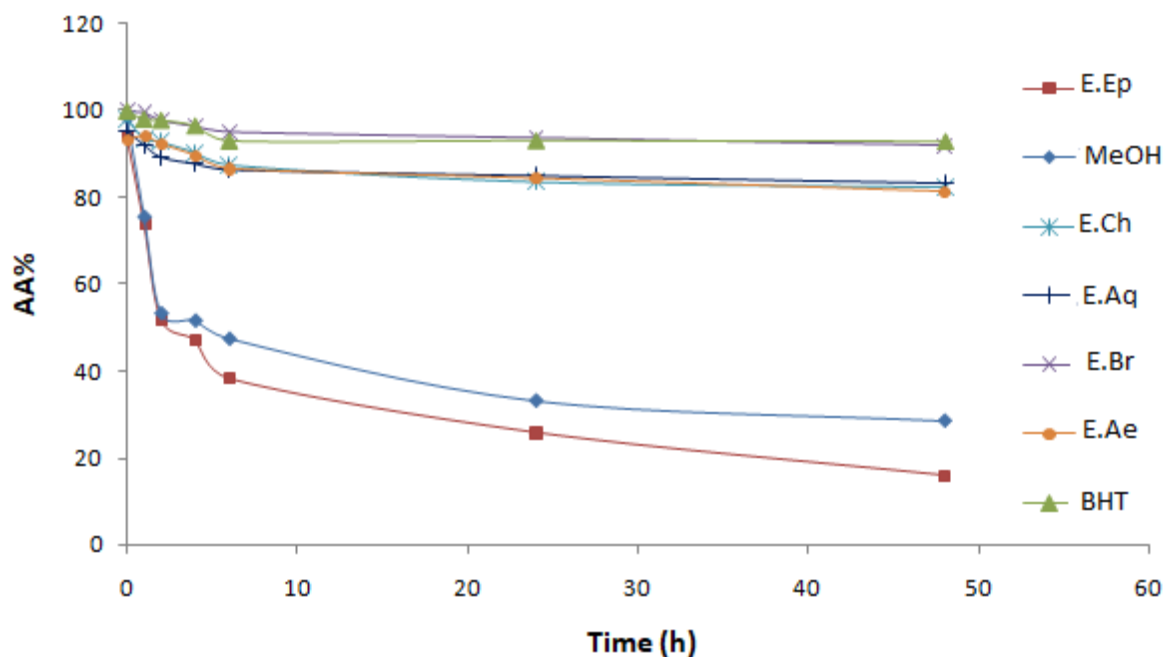


Fig. 4: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de *C. triflorus*. **E.Br**: l'extrait brut, **E.Ep**: l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch**: l'extrait du chloroforme, **E.Ae**: l'extrait d'acétate d'éthyle et **E.Aq**: l'extrait aqueux. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

D'après Liyana-Pathirana et Shahidi (2006), un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire. De ce fait, on peut dire que nos fractions réagissent bien avec les radicaux libres, particulièrement les radicaux peroxydes, dérivés majeurs dans la propagation de l'auto-oxydation des chaînes lipidiques et sont donc capables de mettre à terme la propagation en chaîne de l'oxydation lipidique dans les systèmes biologiques. Les valeurs obtenues avec l'extrait brut sont supérieures à celles trouvées par Luna et ses collaborateurs (2013) avec l'espèce végétale *Ramorinoa girolae* Speg qui appartient à la même famille que *C. triflorus*.

III.4. Pouvoir réducteur

Cette méthode est utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur des extraits via la réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) (Barros *et al.*, 2007). Les résultats ont montré que la capacité réductrice des extraits est inférieure à celle de l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 150 \mu\text{g/mL}$). Le pouvoir réducteur de l'extrait E.Aq est le plus puissant parmi les différentes fractions avec une valeur de $\text{CI}_{50} = 320 \mu\text{g/mL}$, suivi par l'E.Br et E.Ch avec des CI_{50} de $460 \mu\text{g/mL}$ et $510 \mu\text{g/mL}$ respectivement, puis l'E.Ae avec une $\text{CI}_{50} = 960 \mu\text{g/mL}$ et enfin l'E.Ep qui est le plus faible parmi ces extraits avec une CI_{50} d'environ $1800 \mu\text{g/mL}$ (Fig.5).

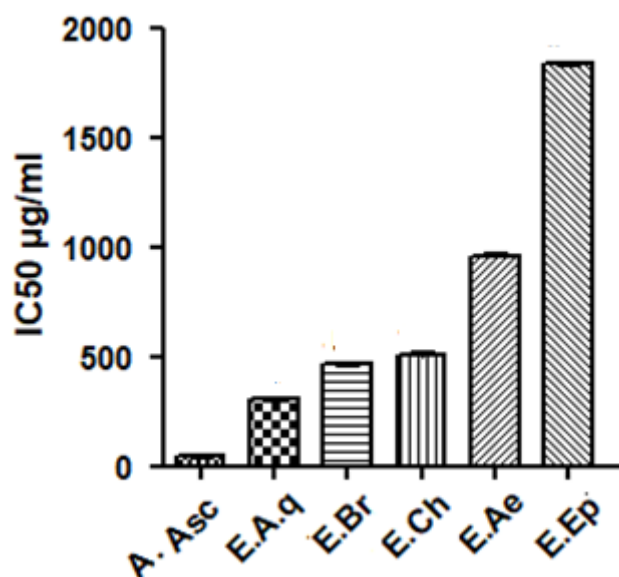


Fig. 5: Pouvoir réducteur des extraits de *C. triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **A.Asc:** Acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$).

Bentabet et ses collaborateurs (2014) ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes. Ce processus d'autoxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH et la présence d'agents complexants (Ghedadba et al., 2015). L'E.Ch est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'E.Aq peut être constitué de flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tétra-glycosylés). En effet, les flavonoïdes aglycones sont plus actifs que ceux glycosylés (Sökmen et al., 2012). L'activité réductrice de *C.triflorus* est plus faible que celle obtenue par Pamulaparathi et ses collaborateurs (2016) avec l'espèce *Senna alata* avec des valeurs de CI_{50} des extraits aqueux et méthanoliques égales à 56,68 et 42,45 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Cependant, elle est supérieure à celle obtenue avec *Indigoferatinctoria Linn*, espèce de la famille Fabaceae (Singh et al., 2015).

III.5. Chélation du fer ferreux

L'activité 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 (Kumaravel et al., 2013). Les résultats obtenus montrent que les extraits de *C. triflorus* possèdent une activité chélatrice (Fig.6) en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine. Les différents extraits de *C.triflorus* ont exercé des effets chélateurs des métaux de transition selon l'ordre décroissant suivant : E.Br > E.Aq > E.Ae > E.Ch > E.Ep correspondant aux valeurs suivantes des CI_{50} : 226 $\mu\text{g/mL}$, 290 $\mu\text{g/mL}$, 560 $\mu\text{g/mL}$, 630 $\mu\text{g/mL}$ et 800 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Ces résultats sont loin d'être comparés avec l'EDTA (CI_{50} = 6.87 $\mu\text{g/mL}$), Cela est dû à sa structure unique, il possède deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, qui peut chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation d'un complexe Fe^{2+} -Ferrozine (Luo et al., 2011). L'E.Ac et l'E.Ch contiennent les teneurs les plus élevées des polyphénols et en flavonoïdes, respectivement. Cependant, ils ne sont pas les plus actifs. Cela laisse penser qu'il y'a une faible corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité chélatrice des fractions de *C. triflorus*. L'activité chélatrice des extraits peut être justifiée par l'intervention de substances autres que les polyphénols et par la nature complexe des extraits dont la synergie entre les différents composés antioxydants existants.

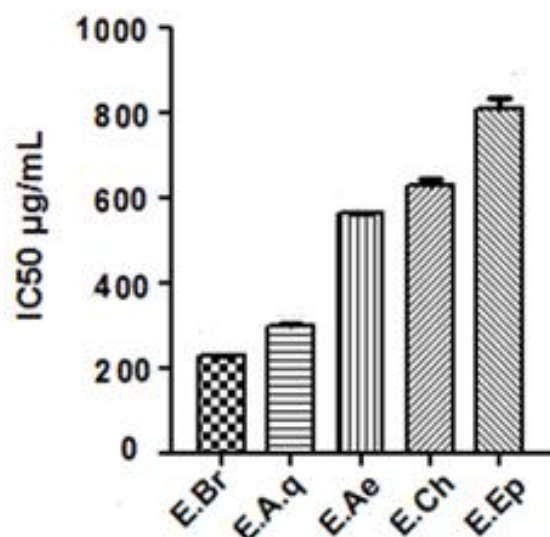


Fig. 6: Activité chélatrice des extraits de *C. triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle et **E.Aq:** l'extrait aqueux. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

III.6. Effet anti-hémolytique

Dans la présente étude, tous les extraits présentent des propriétés inhibitrices satisfaisantes contre l'hémolyse à de faibles concentrations. L'E.Ae et l'E.Br ($CI_{50} = 23,65 \mu\text{g/mL}$) ont montré un potentiel antihémolytique plus élevé. Cette constatation trouve sûrement son explication, dans son effet synergique entre les constituants de ces extraits, et l'effet pourrait être attribué à la présence de fortes concentrations de substances phénoliques dans ces extraits. Les composés phénoliques contenus dans ces extraits peuvent probablement jouer un rôle important dans les voies biologiques de la protection contre l'hémolyse induite par les radicaux (Ak et Gulcin, 2008). Pour les autres extraits, l'E.Ch est le plus actif suivi de l'E.Aq et de l'E.Ep dont les valeurs de CI_{50} sont $39,37 \mu\text{g/mL}$, $54,24 \mu\text{g/mL}$ et $78,69 \mu\text{g/mL}$ respectivement. Cependant, BSA a montré une activité plus élevée par rapport aux différents extraits avec une activité anti-hémolytique de $7,36 \mu\text{g/mL}$. Une observation similaire de l'inhibition de l'hémolyse a également été rapportée pour les extraits d'*Indigofera tinctoria L* (Anusuya et Manian, 2013).

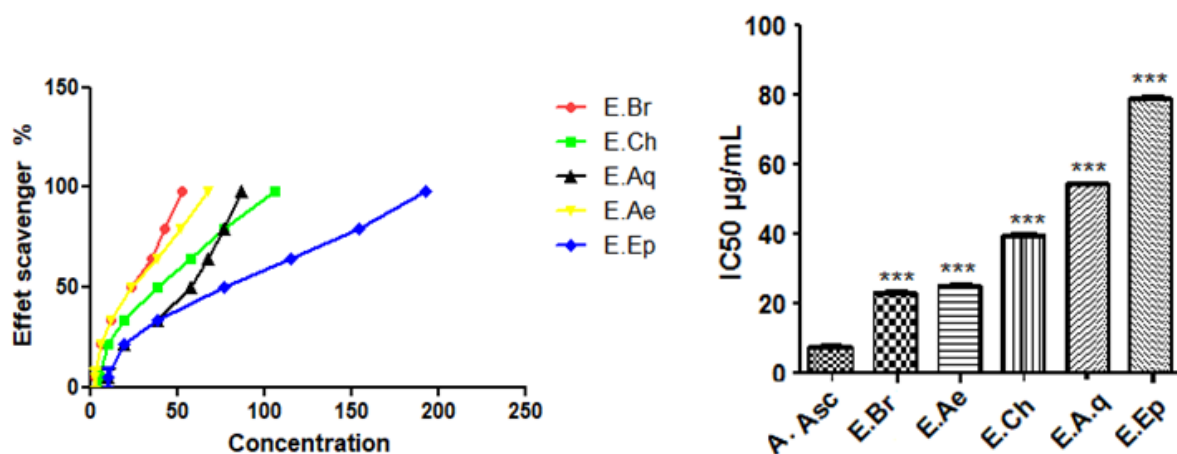


Fig. 7: Effet anti-hémolytique des extraits de *C.triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle et **E.Aq:** l'extrait aqueux. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

III.7. Piégeage de radical superoxyde

Le pouvoir piégeur du radical de l' $O_2^{\cdot -}$ par les différents extraits de *C.triflorus* a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT en formazan. Les différents extraits de *C.triflorus* ont montré un bon potentiel de piégeage du $O_2^{\cdot -}$ (Fig. 8). Les valeurs de CI_{50} des extraits E.Br, E.Ae, E.Aq, E.Ch et E.Ep étaient respectivement de 36,35 $\mu\text{g/mL}$, 38,15 $\mu\text{g/mL}$, 64,38 $\mu\text{g/mL}$, 182,57 $\mu\text{g/mL}$ et 432,76 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait E.Br et E.Ae possèdent un effet piégeur très important du superoxyde, il est inférieur ou égale à l'activité antioxydante de l'acide ascorbique (39,59 $\mu\text{g/mL}$). Alors que l'E.Ch et E.Ep sont à de faibles piégeurs du superoxyde. Alors que l'E.Ch et E.Ep sont à de faibles piégeurs du $O_2^{\cdot -}$. L'E.Br, le plus actif, a présenté une teneur élevée en polyphénols. Par contre, l'E.Ae a présenté une teneur supérieure à celle de l'E.Br mais ils avaient presque la même activité. D'après ces résultats, l'activité de l'E.Ae n'est pas attribuée seulement à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes mais aussi à la nature des flavonoïdes présents dans cet extrait. Popovici et ses collaborateurs (2010) ont montré que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Il existe une hétérogénéité structurale au sein des composés phénoliques qui se traduit par des propriétés différentes. Les résultats obtenus indiquent une très bonne activité pour tous les extraits de *C. triflorus*. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature sur les extraits de *Mucuna pruriens* L. qui fait partie de la famille des Fabaceae (Kumar *et al.*, 2010).

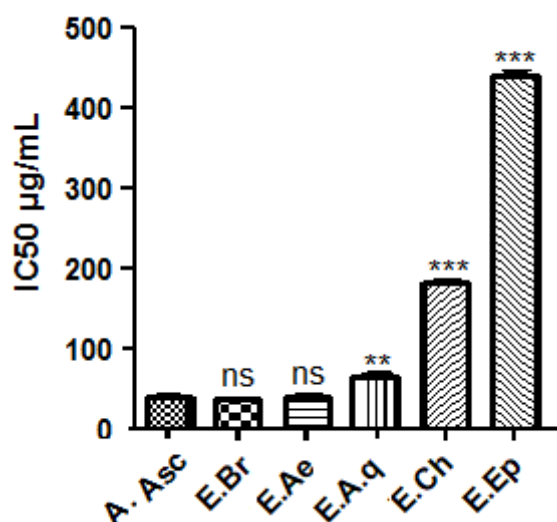


Fig. 8: Effet piègeur du radical superoxyde par les extraits de *C. triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **A. Asc:** l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). La comparaison a été réalisée contre l'acide ascorbique, ***: $p \leq 0.001$.

III.8. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Bien que le H_2O_2 ne soit pas un radical libre proprement dit, lui-même n'est pas très réactif, mais il peut parfois être toxique pour les cellules car il peut donner naissance à un radical hydroxyle, qui traverse les membranes cellulaires et peut oxyder et endommager de nombreux composés cellulaires (Muthu *et al.*, 2014). Les résultats indiquent que tous les extraits ont une bonne capacité de neutraliser le peroxyde d'hydrogène (Fig.9). L'extrait le plus puissant sur H_2O_2 est l'E.Ae avec CI_{50} presque égale à la valeur de l'acide ascorbique ($CI_{50} = 1,54 \mu\text{g/mL}$), pris comme référence. E.Ch et E.Br n'ont pas montré de différence significative dans leur capacité de neutralisation du peroxyde ayant des valeurs de $4,36 \pm 1,88 \mu\text{g/mL}$ et $4,69 \pm 1,68 \mu\text{g/mL}$ respectivement. Alors que les fractions E.Aq et E.Ep se sont révélées moins puissantes avec des valeurs de $7,57 \mu\text{g/mL}$ et $9,24 \mu\text{g/mL}$ respectivement.

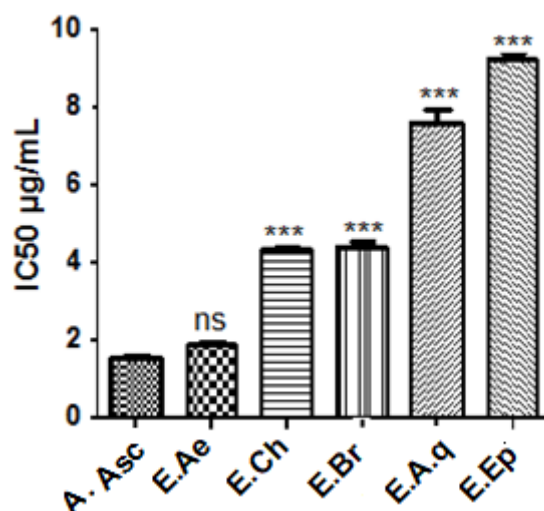


Fig. 9: Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits de *C. triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **A. Asc:** l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les substances contenues dans ces fractions (polyphénols et flavonoïdes) réagissent directement et très rapidement avec le H_2O_2 . En effet, les noyaux phénoliques des antioxydants agissent en neutralisant les radicaux libres des lipides et du peroxyde d'hydrogène (Dacosta, 2003). Tous les extraits de *C. triflorus* ont des CI_{50} inférieurs à celle des extraits de la partie aérienne de l'espèce *Cicer arietinum L.* qui appartient à la famille de Fabaceae (Vadnere *et al.*, 2012).

III.9. Radical hydroxyle

Le OH est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d' $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (Yang *et al.*, 2008). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé lui permettant de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN (Siddhuraju et Becker, 2007). Les résultats indiquent qu'il n'existe pas une différence significative entre E.Ch, E.Br et E.Ac, dont leurs activités antioxydants relatives sont de 440,45 $\mu\text{g/mL}$, 442,51 $\mu\text{g/mL}$ et 458 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Tandis que les fractions E.Aq et E.Ep se sont révélées moins puissantes avec des valeurs de 840,84 $\mu\text{g/mL}$ et 921,38 $\mu\text{g/mL}$ respectivement (Fig. 10). Ces résultats sont loin d'être comparés avec l'acide ascorbique ($CI_{50} = 10,03 \mu\text{g/mL}$).

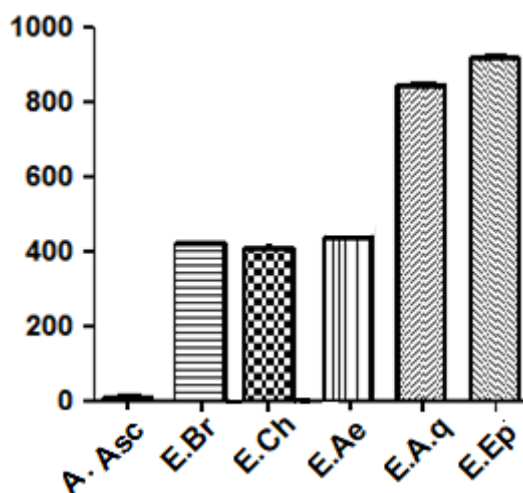


Fig. 10: Effet piégeur du radical hydroxyle par les extraits de *C. triflorus*. **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux et **A. Asc:** l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

La richesse des E.Ch, E.Br et E.Ac en constituants polyphénoliques, les rend capables de piéger les radicaux libres. Etant donné que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2007). L'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (Siddhuraju et Becker, 2007). Les résultats obtenus présentent une corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols ou flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire. Nos résultats sont en parfaite concordance avec les résultats de Vадnere et ses collaborateurs (2012) ainsi que Lavhale et mishra (2007) obtenus avec l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *Cicer arietinum* Linn. (Famille : Fabaceae) et celui de *Butea monosperma* L. respectivement.

IV. Activité antimicrobienne

L'effet antibactérien des extraits de *C. triflorus* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar. Le DMSO a été testé comme solvant, et les résultats ont montré qu'il est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. Les résultats obtenus de l'effet antibactérien des extraits sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI: Activité antibactérienne des extraits de *C. triflorus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

	Lis	Sal	Ec	B	Ent	Ac	Ps	St	Kl	Pro
E.Br	-	7.5	-	-	7	-	-	9	-	-
E.Ep	-	-	-	-	-	-	-	8.5	-	-
E.Ch	-	9.5	-	7.5	-	-	-	-	-	-
E.Ae	-	9.5	-	-	9	-	-	-	-	-
E.Aq	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
Pen	10	18	8	-	-	-	-	22.5	24	24
Gent	19	16	25	26	28	28	21	25	25	23
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H₂O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gent: Gentamicine, **Pen:** Pénicilline, **E.Br:** l'extrait brut, **E.Ep:** l'extrait d'éther de pétrole, **E.Ch:** l'extrait du chloroforme, **E.Ae:** l'extrait d'acétate d'éthyle, **E.Aq:** l'extrait aqueux, **Lis:** *Listeria monocytogenes*, **Sal:** *Salmonella typhimurium*, **Ec:** *Escherichia coli*, **B:** *Bacillus cereus*, **Ent:** *Enterococcus faecalis*, **Ac:** *Acinetobacter baumannii*, **Ps:** *Pseudomonas aeruginosa*, **St:** *Staphylococcus aureus*, **Kl:** *Klebsiella pneumoniae* et **Pro:** *Proteus mirabilis*. (-) : sans effet.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les extraits de *C. triflorus* ont un faible effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. En effet : L'E.Br a induit des zones d'inhibition d'un diamètre qui varie entre 7 et 9 mm seulement sur trois souches bactériennes: *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* (tableau VII), alors que l'E.Ch et l'E.Ae ont induit deux zones d'inhibition d'un diamètre qui varie entre 7 et 9.5 mm, mais l'E.Aq et l'E.Ep ont induit une seule zone d'inhibition sur *Salmonella typhimurium* d'un diamètre de 11 mm et *Staphylococcus aureus* 8.5 mm respectivement.

Le profil d'activité antimicrobienne des extraits de *C. triflorus* contre les souches testées a indiqué que *Salmonella typhimurium* est la bactérie la plus sensible de toutes les souches. L'activité inhibitrice de la plante pourrait être due à la présence et à la nature chimique des polyphénols et des flavonoïdes, ce qui explique la remarquable activité des extraits E.Br, E.Ch et E.Ae qui sont riches en polyphénol et en flavonoïdes (tableau V). L'efficacité optimale de l'extrait brut peut être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés. L'activité inhibitrice des extraits est plus faible que celle obtenue avec les antibiotiques standards utilisés, à savoir la Gentamicine (Gent) et la Pénicilline (Pen). Il est clair que l'activité antibactérienne de nos extraits reste inférieure à celle des antibiotiques de référence. Cependant, ces extraits exercent une activité antibactérienne dans la mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits (Sökmen *et al.*, 2012).

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires ainsi que le nombre et la position des groupements hydroxyles présents sur le noyau aromatique de ces composés pouvant entraîner la toxicité des microorganismes (Mahboubi et Haghi, 2008). L'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir: l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé et la sensibilité des bactéries. Les conditions de séchage et de broyage de la plante peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antibactérienne (Jones *et al.*, 2014).

Les résultats de l'activité antifongique ont révélé l'inefficacité de tous les extraits contre l'ensemble des souches testées (levures et les moisissures). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Larit (2017) qui a révélé l'absence d'activité anti-fongique et la faible activité microbienne des extraits de *C.triflorus*.

IV. Toxicité aiguë du *Cytisus triflorus*

Au cours de toute la période d'expérimentation, après l'administration par voie orale d'une dose unique de 2000 mg/kg de l'extrait brut de *C. triflorus* ; aucun décès n'a été constaté chez les rats traités tout au long de l'étude et aucun signe de toxicité n'a été observé pendant les 4 h qui ont suivi l'administration de l'extrait notamment la baisse de la sensibilité au stimulus (douleur et bruit). D'après Dragstedt et Lang, tout animal ayant survécu à une dose donnée aurait survécu à toute dose inférieure à celle-ci.

Les pesées hebdomadaires des rats ont montré que la différence entre les moyennes obtenues des deux lots (temoin et traité par l'extrait) n'était pas significative. Le poids moyen des lots expérimental a évolué de 230 ± 8 g jusqu'à 229 ± 7 g vers la fin de la deuxième semaine, ceci implique que l'extrait brut de *C.triflorus* n'a pas perturbé la croissance des rats.

Généralement, les paramètres biochimiques concernant le bilan hépatique et le bilan rénal évalué ont montré qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le contrôle et l'extrait brut de *C. triflorus* (Fig.11). Ces résultats ont été confirmés par les coupes histologiques du rein et du foie, qui n'ont montré aucune anomalie à l'examen microscopique (Fig.12).

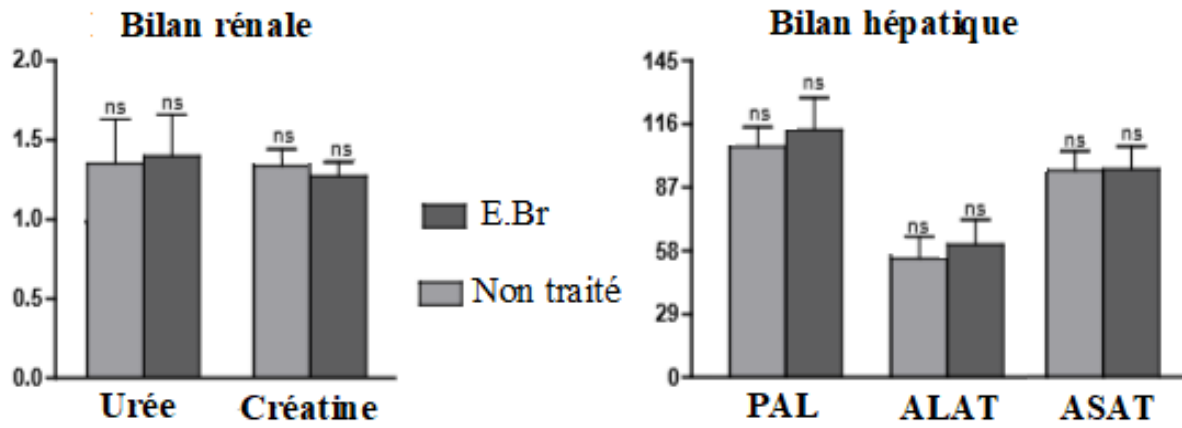


Fig. 11: Paramètres biochimiques de contrôle et des rats traités par l'extrait brut de *C. triflorus*, mesurés pendant la toxicité aiguë. **E.Br:** l'extrait brut, **ASAT:** Aspartateaminotransférase, **ALAT:** Alanine aminotransférase, **PAL:** phosphatase alcaline et **ns:** non significatif. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 7).

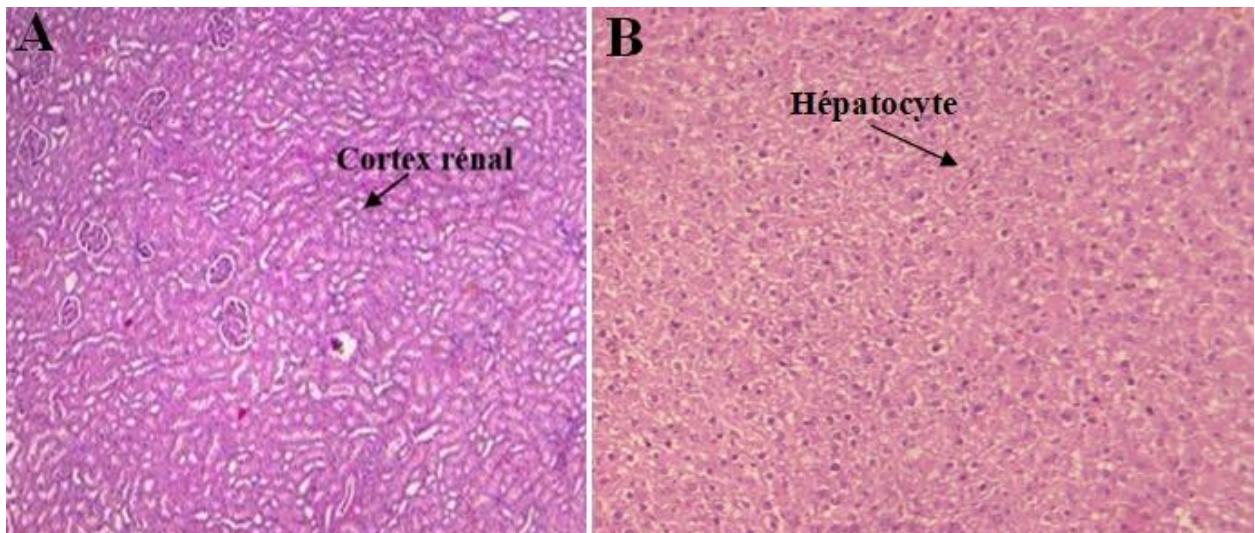


Fig. 12: Coupe histologique du tissu hépatique et rénale des rats traités avec l'extrait brut de *C. triflorus* en toxicité orale aiguë. Grossissement (X 200), **A:** Tissu rénal et **B:** tissu hépatique.

V. Activité antihépatotoxique

V.1. Evaluation de poids

Le poids corporel et le poids du foie/Rein ainsi que le poids relatif du foie/Rein [(poids de l'organe/ poids de l'animal)*100] des rats traités et ceux des témoins non traités sont reportés dans le tableau VII.

Tableau VII: Poids corporel, poids du foie/rein et poids relatif du foie/rein des différents lots de rats.

Lots	Poids corporels (g)	Poids d'organe (g)		Poids relatif du foie (%)	
		Foie	Rein	Foie	Rein
Normaux	197.4± 5.4	7.56± 0.36	1.33±0.14	3.83± 0.36	0.67±0.03
E.Br 400 mg/Kg	193.8± 3.5	7.54± 0.52	1.29±0.09	3.89±0.27 ^{ns}	0.66±0.05 ^{ns}
E.Br 200 mg/Kg	196.2±8.25	8.09±0.76	1.34±0.11	4.13± 0.22 [*]	0.68±0.03 ^{ns}
P-E.Br-200 mg/Kg	190.3±3.56	9.32±0.18	1.28±0.06	4.91± 0.11 ^{**}	0.67±0.08 ^{ns}
P-E.Br-400 mg/Kg	194±9.92	8,14±0,35	1.33±0.08	4.19± 0.42 ^{**}	0.68±0.05 ^{ns}
CCl₄	192.6±4.56	9.79±0.18	1.31±0.16	5.08± 0.11 ^{**}	0.69±0.08 ^{ns}

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=7). **ns**: non significatif, *: p < 0.05, **: p < 0.01. **E.Br**: effet curatif de l'extrait brut à concentration 200/400 mg/Kg/J, **P-E.Br**: effet curatif de l'extrait brut à concentration 200/400 mg/Kg/J.

Concernant l'effet curatif, les rats intoxiqués par le CCl₄ et traités par l'E.Br à la concentration de 400 mg/kg/j ont indiqué des poids relatifs identiques aux lots des rats normaux (sans l'injection de CCl₄). Le poids relatif de l'E.Br (400 mg/Kg) est de 3.89%. Les rats intoxiqués par le CCl₄ et traités par l'extrait à la concentration de 200 mg/kg/j ont donné des résultats significatives avec le lot de CCl₄. La comparaison du poids relatif du foie des rats traités par CCl₄ avec le lot témoin montre une augmentation significative du poids relatif (5.10%) de ce dernier. Cette augmentation remarquable nous indique une hépatomégalie provoquée par le produit chimique CCl₄, une anomalie du foie étant signalé par de nombreux auteurs observée suite à l'agression par le CCl₄ (Huang *et al.*, 2012).

Les lots ayant subi l'effet préventif s'avèrent non sensibles au deux concentrations de l'extrait végétal. Le poids relatif a passé de 3,82% à 4,91% indiquant un effet positif de la substance chimique CCl₄. Al-Said et ses collaborateurs (2015) ont signalé que l'augmentation des poids relatifs des organes des animaux est un indicateur de la toxicité induite par les substances toxiques utilisées.

En ce qui concerne le poids relatif des reins des lots de l'E.Br, que ce soit pour l'effet curatif ou préventif, aucune modification significative n'a été observée.

Les valeurs calculées indiquent l'intensité du pouvoir curatif de l'extrait brut de *C. triflorus* en fonction de la concentration 400 mg/Kg/J.

V.2. Paramètres biochimiques

V.2.1. Paramètres biochimique hépatique

Dans plusieurs organes, les lésions cellulaires sont suivies par la libération d'un certain nombre d'enzymes cytoplasmiques dans le sang; phénomène sur lequel est basé le diagnostique clinique. Dans notre étude, on note des modifications significatives des paramètres biochimiques (Fig. 13). La comparaison du lot témoin avec le lot CCl₄, où il y a une augmentation significative de l'ASAT, ALAT et PAL, reflète qu'il y a eu une altération structurale et/ou fonctionnelle du foie; puisqu'il est reconnu que, les altérations du foie se traduiseront par une augmentation des enzymes hépatiques spécifiques.

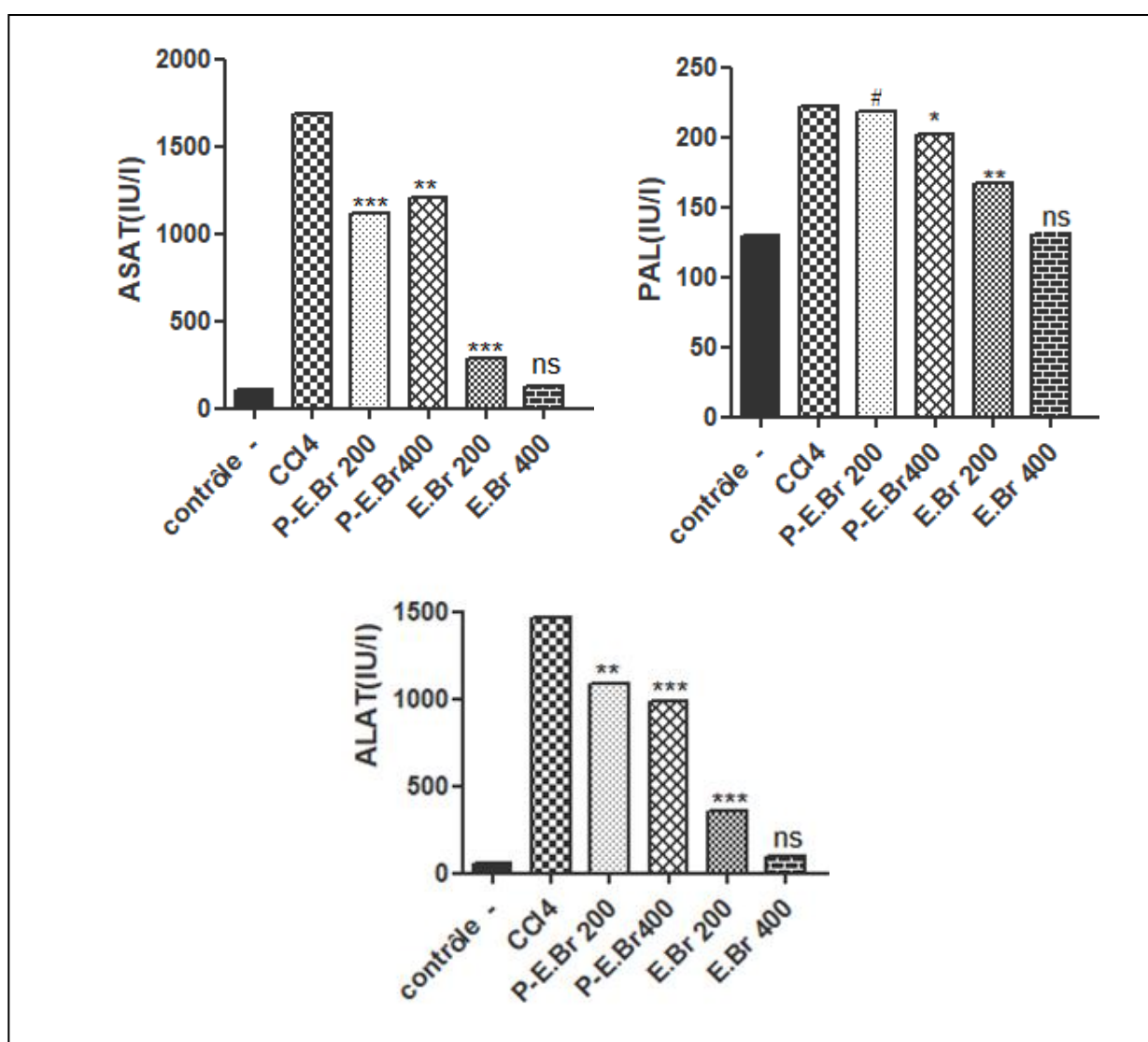


Fig. 13: Bilan hépatique des groupes des rats traités avec le CCl₄ en présence et en absence de l'extrait brut. Les valeurs sont exprimées en tant que moyennes ± SEM (n = 7). ***: p ≤ 0,001 une différence significative par rapport au groupe CCl₄, #: non significative par rapport au CCl₄ et ns: non significative par rapport au contrôle négatif. **E.Br**: effet curatif de l'extrait brut à concentration 200/400 mg/Kg/J et **P-E.Br**: effet préventif de l'extrait brut a concentration 200/400 mg/Kg/J.

D'une manière générale, le produit chimique CCl_4 entraîne une augmentation de tous les paramètres biochimiques étudiés. Cependant, le traitement curatif à base d'E.Br de *C.triflorus* avec les différentes concentrations, provoque une diminution des taux des métabolites étudiés. La meilleure protection contre l'hépto-toxicité induite par CCl_4 était observée chez l'E.Br à la concentration 400 mg/kg/j ou nous avons enregistré des taux respectifs de ALAT, ASAT et PAL de 97 UI/L, 128 UI/L et 138 UI/L, respectivement.

Les analyses statistiques montrent des différences très hautement significatives avec $P_\alpha = 0,001$ pour les transaminases ALAT et ASAT, et significatives avec $P_\alpha = 0,05$ pour l'enzyme PAL. Les enzymes sériques (ALAT, ASAT et PAL) sont des enzymes synthétisées au niveau du cytoplasme de la cellule et déchargées dans la circulation en cas de cellules endommagées (Ozturk et al., 2009). Ces derniers sont considérés comme de bons indicateurs de la cytolyse hépatique. Ainsi, des taux élevés des enzymes du foie, notamment ALAT et ASAT, sont fréquemment attribués aux effets métaboliques et/ou toxiques de différentes drogues (Himmerich et al., 2005). Nos résultats sont en accord avec les investigations de Elberry et ses collaborateurs (2010) sur des rats intoxiqués et non traités qui signalent une augmentation de la concentration sérique de ALAT et ASAT.

Si l'on se réfère à la figure 13 qui présente les valeurs de l'activité enzymatique évaluée pour le traitement préventif, on relève une augmentation très significative des taux des enzymes testés par rapport à ceux du lot contrôle négatif, par contre, elle n'est pas significative par rapport au lot de CCl_4 . Une activité hépto-préventive faible de l'extrait brut pour les deux concentrations testées 200 et 400mg/Kg de la plante *C.triflorus* a été observée.

V.2.2. Paramètres biochimiques rénaux et lipidiques

En ce qui concerne les autres métabolites biochimiques, concernant, le bilan rénal, les résultats montrent que le taux de l'urée et le taux plasmatique de la créatinine ne présente aucune différence significative entre les différents groupes d'animaux traités par rapport au groupe de contrôle (Fig.14), que ce soit pour l'effet hépto-curatif ou hépto-préventif.

Pour le bilan lipidique, une augmentation significative ($p \leq 0,001$) a été enregistrée chez les rats traités avec CCl_4 , dont les triglycérides sont 2.89 fois et le cholestérol 5.7 fois plus élevés, en comparaison avec le contrôle normal. Cependant, le prétraitement des rats avec l'extrait a permis de diminuer significativement ($p \leq 0,001$) le taux sérique des triglycérides et du cholestérol d'une manière dose dépendante.

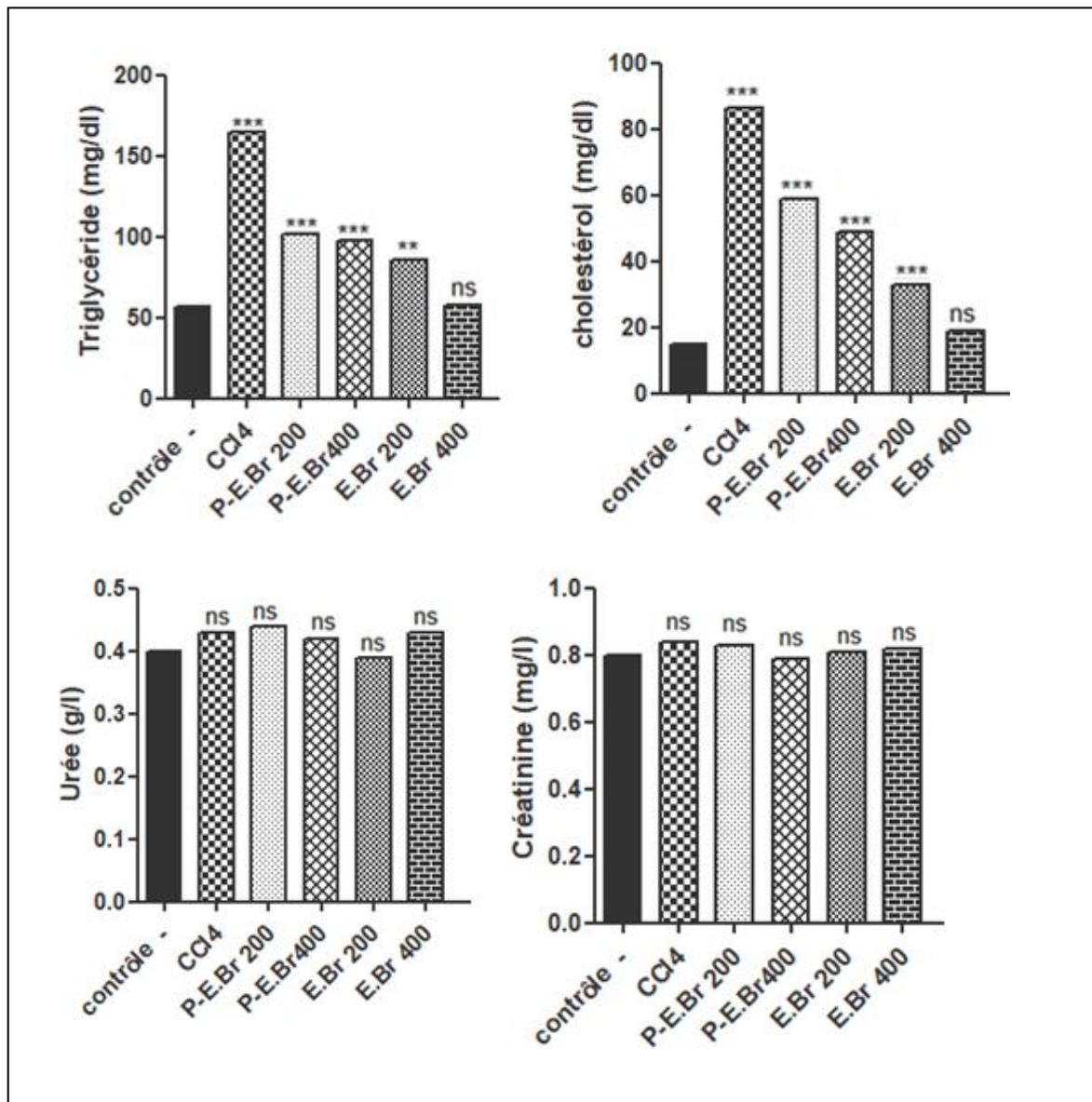


Fig. 14: Bilan rénal et lipidique des groupes de rats traités avec le CCl_4 en présence et en absence de l'extrait brut. Les valeurs sont exprimées en tant que moyennes \pm SEM ($n = 7$). ***: $p \leq 0,001$ une différence significative par rapport au groupe CCl_4 , et ns: non significative par rapport au contrôle négatif. **E.Br:** effet curatif de l'extrait brut a concentration 200/400 mg/Kg/J et **P-E.Br:** effet préventif de l'extrait brut a concentration 200/400 mg/Kg/J.

Une augmentation du taux de lipides serait liée à l'oxydation enzymatique du CCl_4 et sa transformation en CCl_3 libre au niveau de la membrane plasmique. Cette oxydation conduit à l'apparition de radicaux libres ou de formes toxiques de l'oxygène qui induisent une peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des membranes cellulaires. Une autre explication est avancée par Iqbal et ses collaborateurs (2003) qui affirme que l'intoxication par le CCl_4 est semblable à l'hépatite en cas de catabolisme de triglycérides. Cette situation pourrait être également attribuée à la réduction de l'activité de la lipase. Le traitement par l'extrait brut de *C.triflorus* améliore l'activité des enzymes sériques chez les rats traités par ce dernier, ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'E.Br contient des molécules antioxydantes qui ont probablement stabilisé

la membrane cellulaire hépatique et protégé les hépatocytes contre les effets toxiques de CCl_4 , ce qui a diminué la fuite des enzymes vers le plasma (Elberry *et al.*, 2010).

V.3. Paramètres du stress oxydant

Le stress oxydatif représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des radicaux libres. Il est généralement lié à l'existence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes (superoxydes dismutase, catalase, glutathion, peroxydase) (Karakus *et al.*, 2011). L'augmentation du stress oxydant au niveau du foie a été démontré par plusieurs études expérimentales et semble jouer un rôle central dans la nécrose, la cirrhose et l'hépatite provoquées par le CCl_4 (AL-Shabanah *et al.*, 2000 ; Teocharis *et al.*, 2001 ; Brai *et al.*, 2014).

Dans la présente étude, le taux hépatique de MDA a été déterminé sur la fraction cytosolique du foie. Nous avons constaté que chez les rats injectés par le CCl_4 , l'hépatotoxicité provoquée est associée à une peroxydation lipidique exprimée par l'augmentation hautement significative du taux du MDA au niveau hépatique (Tableau VIII). Par contre un traitement de 7 jours par l'extrait brut 400 mg/Kg de *C.triflorus* a baissé le taux du MDA de 63 % par rapport au lot de CCl_4 . Les résultats obtenus dans le cas de l'hépatopréventif montre une augmentation des teneurs plasmatiques en MDA chez les rats traités par l'extrait brut aux concentrations 200/400 mg/Kg par rapport au lot témoin. La concentration élevée de MDA est un indice qui suggère qu'il y a une forte peroxydation lipidique au niveau du sérum et du foie et cette augmentation peut être due à la diminution des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

La peroxydation lipidique représente un marqueur clé du stress oxydant. C'est un processus médié par les radicaux libres, conduisant à la dégradation oxydative des lipides polyinsaturés (Guangwei *et al.* 2010). Dans notre étude, on a enregistré une augmentation hautement significative du taux hépatique en MDA chez les rats traités par le CCl_4 . Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Patel *et al.*, (2010) et Yin *et al.*, (2014). L'augmentation du taux de MDA est le résultat de l'augmentation des ERO qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoquent la peroxydation lipidique. Toutefois, cette constatation est cohérente avec celle apportée par Al-Said *et al.*, (2015) qui suggèrent que le CCl_4 provoque, au niveau hépatique, une production excessive de O_2^- , H_2O_2 et des radicaux hydroxyles qui pourraient en outre favoriser la peroxydation lipidique.

Tableau VIII: Effet de l'extrait brut de *C. triflorus* sur les paramètres du stress oxydant.

	Catalase	SOD	GSH	MDA
Normaux	11.4± 1.4	43.06± 9.36	56.33±2.14	76.83± 14.36
E-Br 200	8.58± 2.5**	67.54± 12.52***	37.29±9.09***	98.89±17.27***
E-Br 400	9.52±1.25*	61.76±3.76***	36.34±6.11***	64.13± 9.22*
P-E.Br-200	63.3±13.56***	69.32±11.18***	42.28±6.06***	118.91± 10.11***
P-E.Br-400	6.03±0.52**	63,14±7,35***	42.12±7.08**	132.19± 19.42***
CCl₄	4.25±0.56**	42.09±5.18 ^{ns}	38.31±5.16***	174.18± 16.11***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (N = 7); * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$ une différence significative par rapport au groupe des rats contrôle, **ns** : une différence non significative.

Le taux hépatique du GSH est présenté dans le tableau VIII. Chez les rats traités par le CCl₄, nous avons constaté une diminution significative du taux du GSH hépatique par rapport à celui enregistré chez les témoins sains. Par contre, la déplétion du glutathion réduit (GSH) hépatique causée par le CCl₄ a été restaurée par l'administration de l'extrait brut de *C.triflorus* pendant 7 jours à la dose quotidienne de 200 /400 mg/kg où nous avons constaté une augmentation du taux de GSH par rapport au lot de CCl₄. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par Karakus *et al.*, (2011) qui ont trouvés une diminution du taux hépatique en GSH après un traitement des rat par le CCl₄. L'augmentation de la concentration du GSH dans le foie chez les rats traités par la plante pourrait être un facteur responsable de la réduction de la concentration du MDA dans ces tissus. Dans le cas du traitement hépato-préventif, le traitement avec 200/400 mg/Kg de l'E.Br a montré une diminution non significative du taux de GSH par rapport aux rats traités avec CCl₄.

Les cellules possèdent un système de défense antioxydant incluant des enzymes telles que la SOD. Nos résultats ne montrent aucune différence significative de l'activité de cette enzyme dans le foie chez les rats traités par CCl₄ en comparaison avec les témoins. Par contre un traitement curatif ou préventif par l'extrait brut de *C.triflorus* a augmenté le taux du SOD par 32 % et 23 % de E.Br 400 mg/Kg et E.Br 200 mg/Kg respectivement par rapport au lot CCl₄.

Dans notre étude nous avons constaté une réduction significative de l'activité de la catalase au niveau du foie chez les rats témoins injectés par le CCl₄ par rapport aux des rats sains (Tableau VIII). D'autre part, on a constaté que l'administration de l'extrait brut (400 mg/Kg) a permis une augmentation hautement significative de l'activité de la catalase réduite par l'administration du CCl₄. Cette augmentation est de l'ordre de 57.57 %, mais elle reste encore inférieure à celle des rats du contrôle négatif. L'augmentation de l'activité de la CAT laisse penser que cette défense oxydante pourrait être réactivée par des principes actifs présents dans l'extrait brut de *C. triflo-*

rus, qui ont pu provoquer une augmentation de la capacité de détoxification par l'amélioration de la capture des radicaux libres. De nombreux travaux ont montré l'effet hépatoprotecteur des plantes médicinales (AL-Shabanah *et al.*, 2000 ; Teocharis *et al.*, 2001 ; Brai *et al.*, 2014).

D'une façon générale, Ces résultats suggèrent que la réduction de la peroxydation lipidique par la plante *C. triflorus* peut être due à l'augmentation du statut antioxydant, car l'E.Br à 400 mg/Kg de *C.triflorus* a présenté une haute activité antioxydante (une augmentation de l'activité de la CAT, SOD et de la concentration du GSH). La présence des polyphénols et des flavonoïdes pourrait être directement liée à l'effet hépatoprotecteur et antioxydant de la plante. Les explications possibles du mécanisme étant à la base des propriétés antihépatotoxiques de ces substances naturelles de *Cytisus triflorus* incluant la prévention de l'épuisement des radicaux libres. Ces facteurs sont probablement liés aux propriétés antihépatotoxiques de l'extrait végétal. Ces mêmes hypothèses sont avancées dans les travaux de Chandan *et al.*, (2007) et Raja *et al.*,(2007) obtenus avec les espèces *Aloe barbadensis* et *Cytisus scorparius*.

V.4. Etude histopathologique

V.4.1. Histopathologie du foie

Les coupes histologiques du foie des rats normaux ont révélé des cellules polyédriques (hépatocytes) avec un noyau rond. Les hépatocytes forment des travées bien agencées autour de la veine centro-lobulaire. Ces travées sont séparées par des sinusoides (Fig.15-A). On note aussi une coloration mauve claire caractéristique du cytoplasme (éosinophile) due à la présence de très nombreuses mitochondries. Le noyau des hépatocytes à structure basophile est coloré en bleu violacé.

Tandis que ceux du foie des rats traités par CCl₄ présentaient une architecture endommagées avec une congestion sinusoidale, une nécrose étendue des hépatocytes, vacuolisation cytoplasmique ainsi que des zones d'une infiltration de cellules inflammatoires diffuses comprenant des mononucléaires, des polynucléaires et des histiocytes (Fig.15-B).

Dans le cas de l'hépatocurative, le lot des rats intoxiqués par le CCl₄ et traités par 400 mg/Kg/j d'extrait de la plante, présentent un foie ayant un aspect histologique sub-normal. La dilatation veineuse (veines centro-lobulaires) est peu marquée, les hépatocytes sont bien agencées autour de la veine, le parenchyme hépatique ne présente aucune nécrose hépatocytaire, à l'exception d'une discrète congestion observée et une discrète infiltration inflammatoire (Fig.15-C). Alors que, le prétraitement avec 200 mg/kg a révélé une faible amélioration de l'architecture hépatique traduite par une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires autour de la veine centro-lobulaire, une discrète nécrose et discrète infiltration inflammatoire (Fig.15-D).

Les coupes réalisées sur les tissus hépatiques concernant l'effet hépato-préventive, que se soit pour la dose 200 ou 400 mg/Kg, ne montrent aucune amélioration sur la modification structurale du tissu hépatique provoquée par le CCl₄. Les coupes des deux concentrations présentaient une architecture endommagées avec une congestion sinusoidale, des Hitiocytes spumeux, nécrose étendue des hépatocytes, vacuolisation cytoplasmique, des zones d'une infiltration de cellules inflammatoires (Fig.15-E et D).

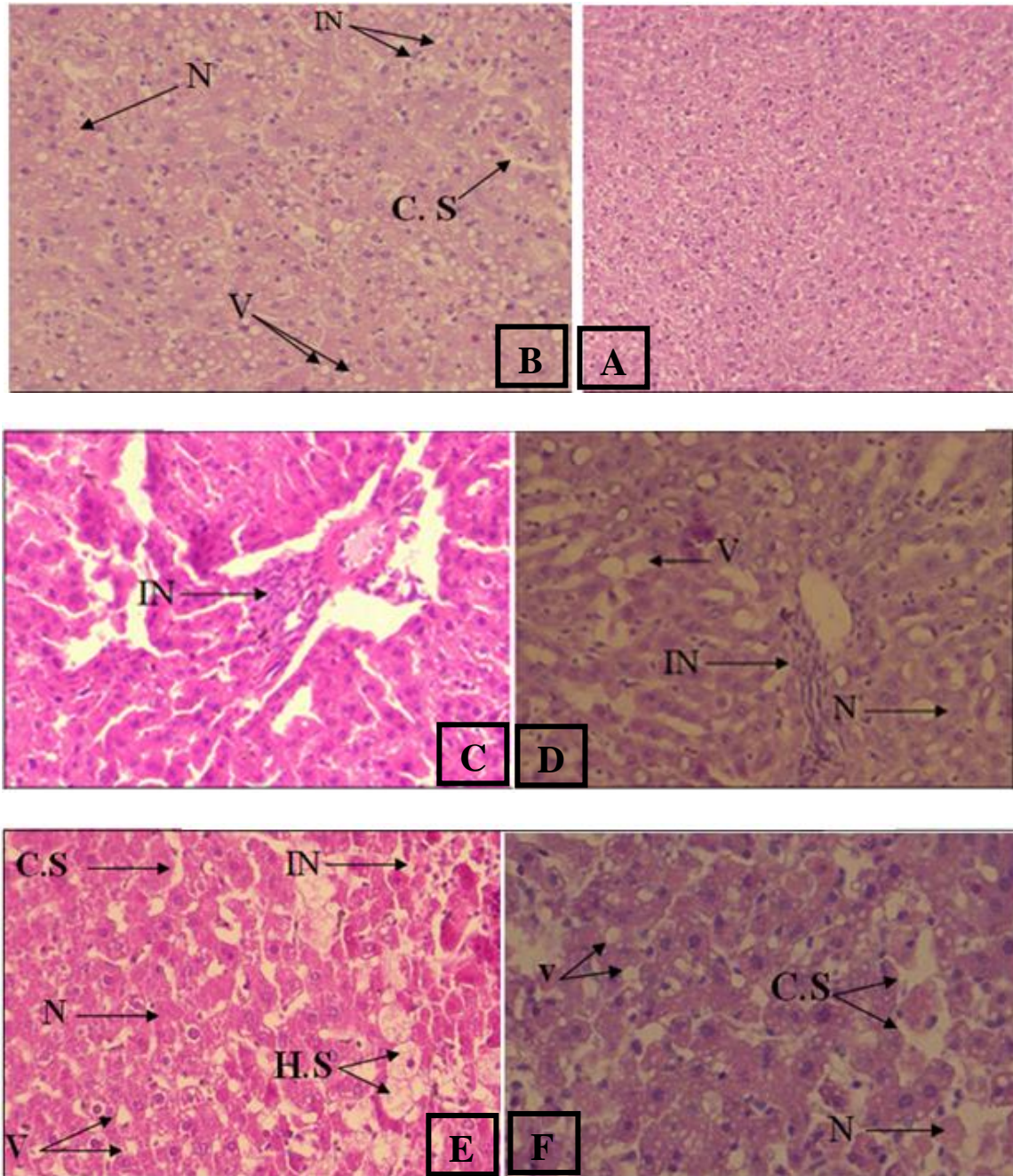


Fig. 15: Coupes histologique du foie. **A:** foie des rats non traités, **B:** foie des rats intoxiqué par le CCl₄. **C:** foie des rats traitées par l'E.Br-400 mg dans les conditions de l'hépatocurative. **D:** foie des rats traitées par l'E.Br-200 mg dans les conditions de l'hépatocurative, **E:** foie des rats traitées par l' E.Br-200mg dans les conditions de l'hépatopréventif, **F:** foie des rats traitées par l' E.Br-200mg dans les conditions de l'hépatopréventif, **In:** infiltration inflammatoire, **N:** nécrose, **V:** vacuolisation cytoplasmique, **C.S:** congestion sinusoidale, **E.Br:** extrait brut et **H.S:** Hitiocyte spumeux.

V.4.2. Histopathologie du rein

Les coupes histologiques des reins ont montré l'absence des lésions tissulaires à l'exception de la présence de discrète congestion non pathologique dans tous les groupes expérimentaux traités avec E.Br, que se soit l'effet hépato-curatif ou hépato-préventif (Fig. 16).

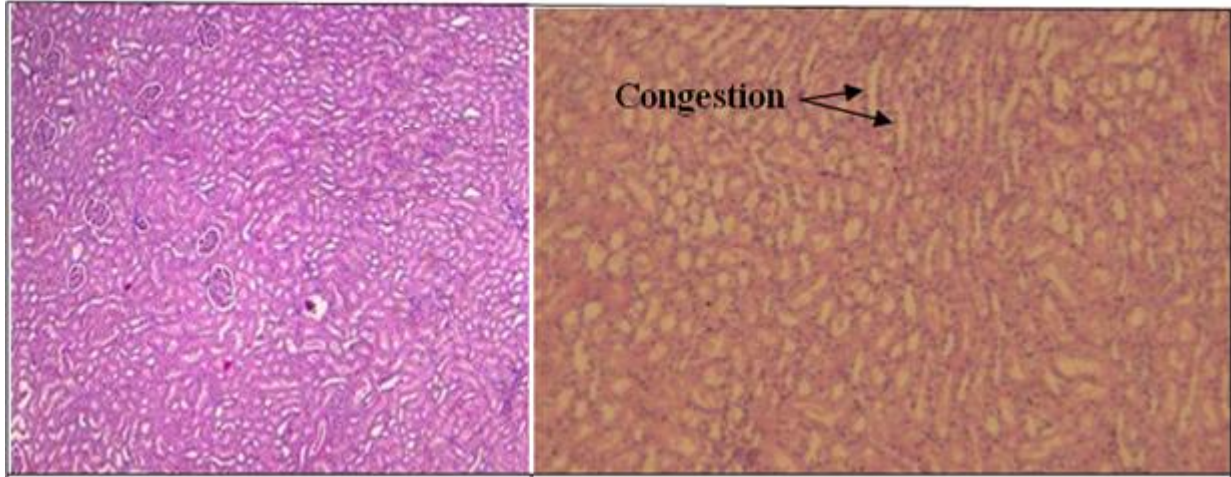


Fig. 16: Coupes histologiques du rein. **A:** rein des rats non traités et **B:** rein des rats intoxiqué par le CCl₄ et traité par l'extrait brut de *C.triflorus*.

VI. Activité anti-inflammatoire

VI.1. Œdème de la patte induit par la carragénine

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'E.Br de *C. triflorus* aux doses de 200 et 400 mg/kg, un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte de rat induit par la carragénine à été sélectionné.

La figure 17 montre que l'injection de la carragénine provoque une augmentation progressive du volume de l'œdème chez les rats traités avec l'eau physiologique durant les six heures de l'expérimentation. La carragénine, est un mucopolysaccharide qui induit un maximum d'œdème à partir de la 3^{ème} heure qui suit son injection (Elion Itou et *al.*, 2014). En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1h30min – 3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Wantana et *al.*, 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Rousselet et *al.*, 2005).

L'effet anti-inflammatoire de l'E.Br de *C. triflorus* a dose 400 mg s'est révélé plus actif, il induit une diminution significative d'épaisseur de la patte des rats à partir de la deuxième heure, et jusqu'à la sixième heure de l'expérimentation (Fig.17), alors que l'effet anti-inflammatoire de l'E.Br à 200 mg/kg est observé dès la 3^{ème} heure. Les effets de l'E.Br de *C. triflorus* à 400 mg/kg étant semblables à ceux du Diclofénac (une réduction significative est observée à partir de la deuxième heure et continue jusqu'à la fin de l'expérimentation).

Les pourcentages d'inhibition de l'œdème à 4 h et 6 h étant respectivement de 80,05 et 88,56 % pour la dose 400 mg/kg et diclofénac, 79,16 et 83,23 % pour la dose de 200 mg/kg (Fig.18).

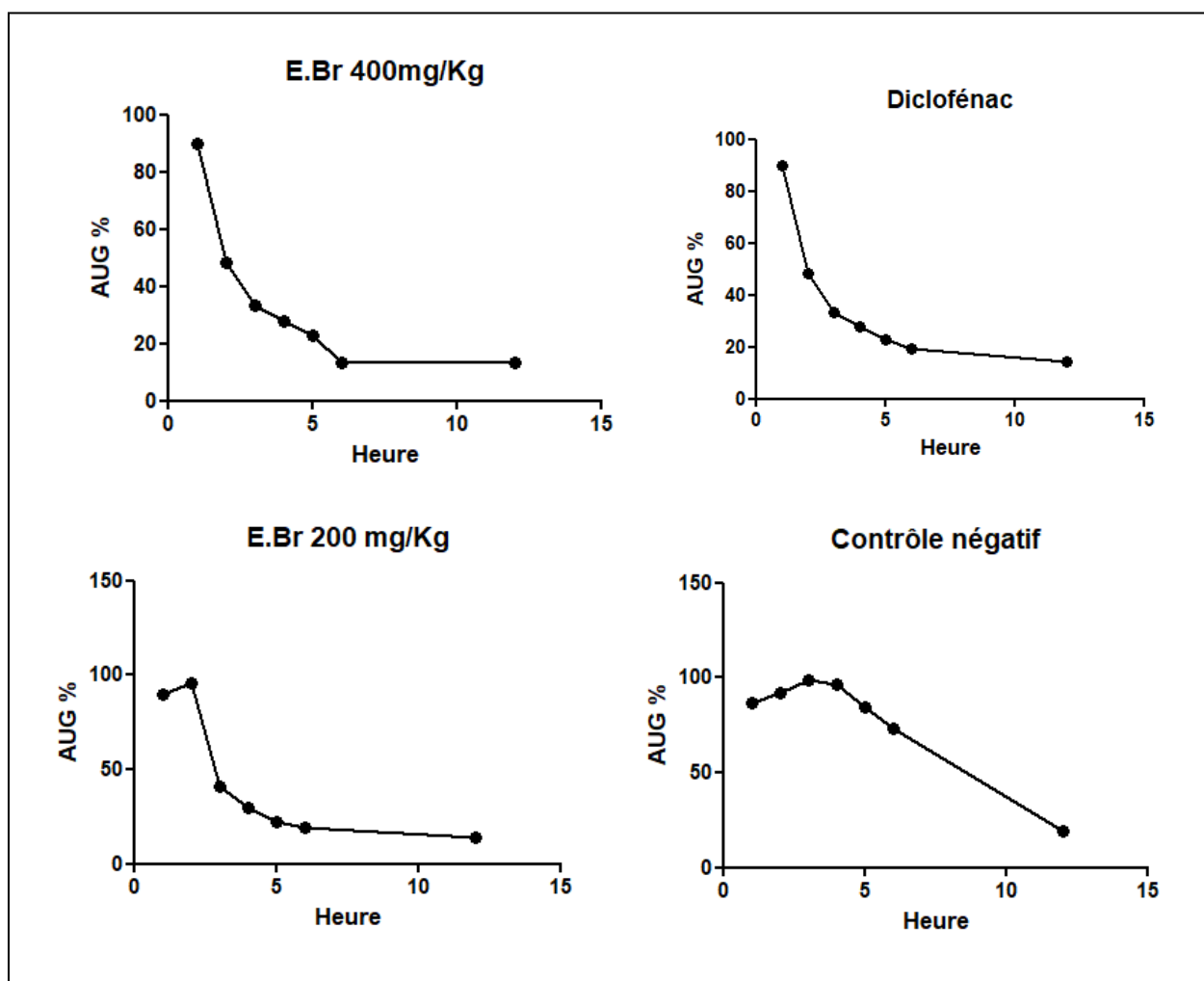


Fig. 17: Pourcentage de l'augmentation d'épaisseur de la patte (AUG%) des rats traitées par 200 /400 mg/Kg de l'extrait brut de *C.triflorus*, Diclofénac et l'eau physiologique pour le contrôle négative. **E.Br:** l'extrait brut.

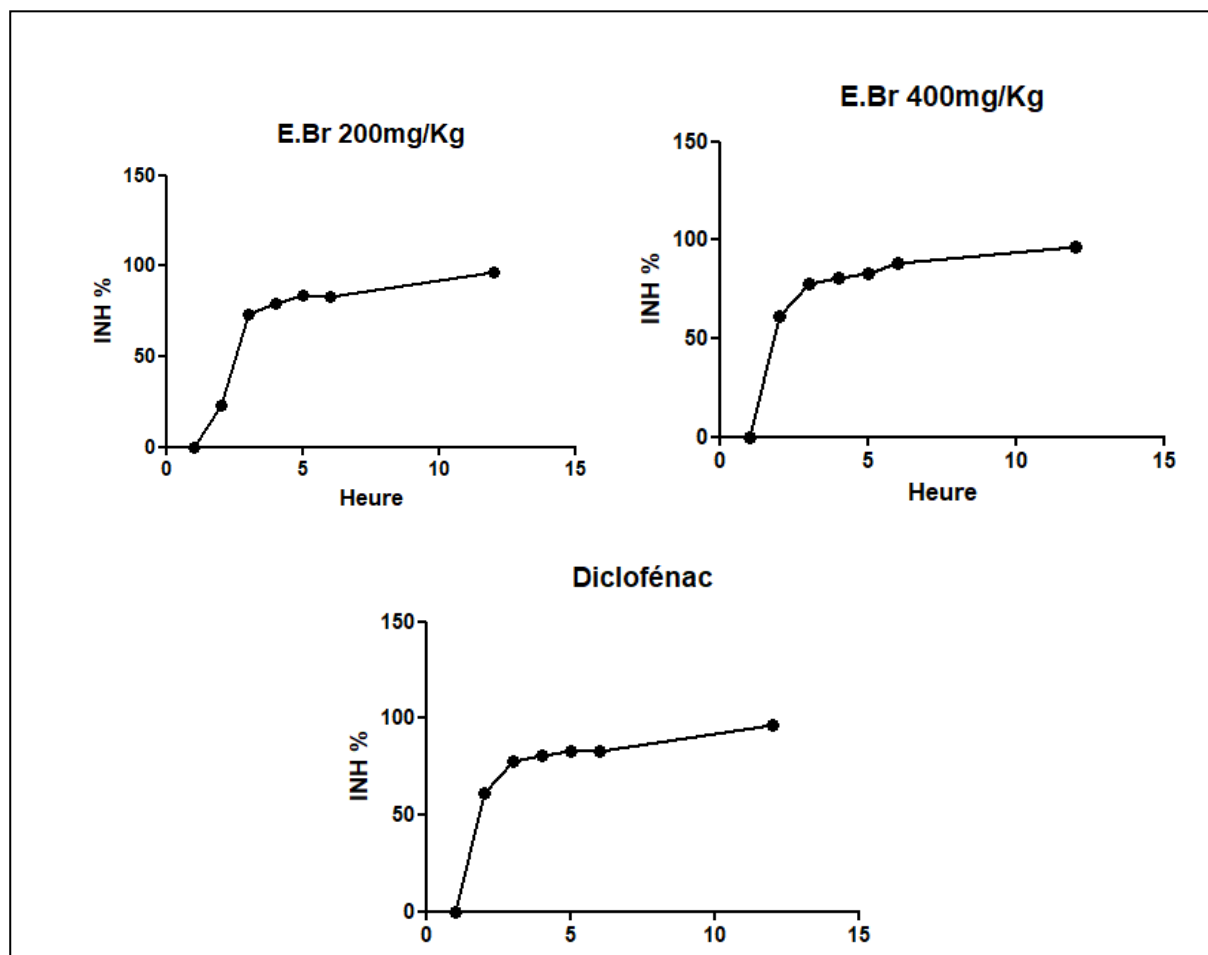


Fig. 18: Pourcentage d'inhibition d'épaisseur de la patte (INH%) des rats traitées par 200 /400 mg/Kg de l'extrait brut de *C.triflorus* et Diclofénac. **E.Br:** l'extrait brut.

La richesse de l'E.Br en constituants phénoliques et flavonoïdes (tableau V) capables d'empêcher la formation des prostaglandines qui provoquent l'inflammation. De plus, certaines indiquent que les flavonoïdes contenus dans les extraits de plantes, possèdent des propriétés anti-inflammatoires capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par l'inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2007 ; Vauzour *et al.*, 2010 ; Majdalawieh et Fayyad 2015). De plus, Kim et ses collaborateur (2014) ont démontré que les flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine, les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine et ont une activité inhibitrice de Cyclooxygénase.

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

des composés polyphénoliques sur l'immunité humorale et cellulaire (Corrado *et al.*, 2009 ; Trécot et Jouzeau, 2014). Nos résultats indiquent que l'extrait brut méthanolique présente une activité anti-inflammatoire remarquable. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Ait-KaciAourahoun ses collaborateurs (2015).

VII. Activité cicatrisante

L'évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo* de la crème dermique a été réalisée sur des rats Albinos. Elle a pour but l'appréciation de la potentialité accélératrice de la néoformation des tissus dermiques. La comparaison a été faite avec un groupe d'animaux recevant une crème de référence Framycitin et un groupe témoin traité par la vaseline.

Le processus de guérison s'est passé par plusieurs phases; une disparition progressive de l'inflammation (plaies devenant moins rouges), une phase de contraction (les plaies devenaient dures et se couvraient de croûtes un peu noirâtres) et enfin la phase de guérison, le traitement a permis d'obtenir une guérison complète des plaies (Fig.19). Les plaies étaient sans odeur tout au long du traitement. Les superficies des plaies mesurées aux jours: 3, 6, 9, 12, 15,18 et 21 après l'excision dans tous les groupes traités par les pommades préparées à base d'extraits étaient inférieures à celles du témoin (Tableau IX). L'extrait brut 400 mg a montré un effet cicatrisant presque 50 % au bout du 6^{ème} jour de traitement. Cet effet été meilleur que celui de la Framécitine (9^{ème} jour). L'effet de l'extrait brut à 400 mg a augmenté au 9^{ème} et 12^{ème} jour pour atteindre à peu près 65 % - 80 % de cicatrisation. Au bout de J18, une cicatrisation complète a été obtenue avec presque les deux concentrations d'extraits brut de *C. triflorus*, le remodelage des tissus et une réapparition des poils ont été constatés au niveau des cicatrices (Fig.19), sauf le lot témoin négatif qui a eu sa cicatrisation vers le 21 J (87 %).



Fig.19: Les phases de guérison. **A:** plaies circulaires de 300 mm², **B:** une disparition progressive de l'inflammation, **C:** une phase de contraction, **D:** la phase de guérison, **E:** cicatrisation complète.

Tableau IX: Evaluation des pommades de l'extrait brut de *C. triflorus* à la concentration 200 et 400 mg sur la cicatrisation par la méthode d'excision des plaies.

Groupe	Zone des plaies en mm ² (pourcentage de contraction de la plaie)						
	J1	J3	J6	J9	J12	J15	J18
Non traité	257.58±0.82 -	236.64±5.79 (8.23%)	211.90±5.53 (17.68%)	165.84±6.73 (32.70%)	107.42±2.52 (54.41%)	67.08±2.52 (64.56%)	57.08±2.52 (72.56%)
Framycitin	244.14±12.92 -	188.29±15.22 (23.28%)	173.31±13.16 (29.41%)	87.78±7.19 (53.23%)	52.33±5.04 (77.29%)	36.43±3.76 (82.17%)	24.43±3.76 (90.06%)
E.Br-400	245.36±9.38 -	174.21±19.11 (29.00%)	116.87±19.13 (42.22%)	70.90±12.60 (67.92%)	36.02±4.36 (81.14%)	7.33±1.89 (89.76%)	7.33±1.89 (98.66%)
E.Br-200	247.59±7.33 -	199.63±20.47 (20.05%)	153.68±18.56 (38.30%)	83.69±14.64 (56.65%)	58.12±12.86 (76.76%)	29.94±4.73 (81.42%)	29.94±4.73 (90.20%)

Les données sont exprimées par moyenne ± SEM (n=8). **J:** jour et **E.Br:** l'extrait brut.

La cicatrisation est caractérisée 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 de l'extrait brut a induit une diminution des diamètres des plaies, cette diminution est importante que celle de la framycitine utilisée comme standard. L'effet cicatrisant de l'extrait peut être attribué à la présence des polyphénols et les flavonoïdes ayant la capacité d'accélérer le processus de régénération tissulaire par stimulation de la production du collagène et de fibronectine (Lopes-Lutz *et al.*, 2008 ; Suriyamoorthy *et al.*, 2014). La qualité de la cicatrisation est affectée par la concentration 400 mg, un effet puissant sur la croissance des poils du rat albinos, ils ont entièrement récupéré leurs poils contrairement aux lots témoins négatifs qui ne présentaient aucun cas de repousse de poils durant les 21 jours de traitement. Il est probable que l'effet de la promotion de la croissance des poils est dû à une stimulation hormonale de l'extrait brut de *C. triflorus*. Les œstrogènes prolongent la phase anagène de la croissance des poils (Upadhyay, 2012). Les travaux réalisés par Khadri et ses collaborateurs (2018) sur la même espèce, affirment que l'extrait méthanolique est très puissant sur la cicatrisation des plaies.

VIII. Activité protectrice de la muqueuse gastrique

Dans le cadre d'évaluer les propriétés gastroprotectrices de l'extrait brut de *C.triflorus*, la méthode d'ulcération a été induite par l'éthanol 70 % selon le protocole décrit par Germano *et al.*, 1996).

VIII.1. Evaluation macroscopique des lésions

Les observations à l'œil nu ont révélés une production massive des lésions gastriques caractéristiques dans l'estomac chez les rats gavés par l'éthanol 70 % ainsi que de fortes lésions hémorra-

riques et une dilatation (Edème) au niveau de la partie glandulaire de l'estomac, représentées dans la figure 20-A. Contrairement aux estomacs sains du groupe témoin, l'estomac qui a été traité par l'E.Br 400 mg/Kg et le Ranitidine (5 mg/kg), ne présentait aucune de ces caractéristiques (Fig. 20). L'extrait brut à 200 mg/Kg a réduit significativement l'ulcération, de façon à restaurer l'aspect normal de l'estomac, les lésions étaient superficiels (figure 20-E).

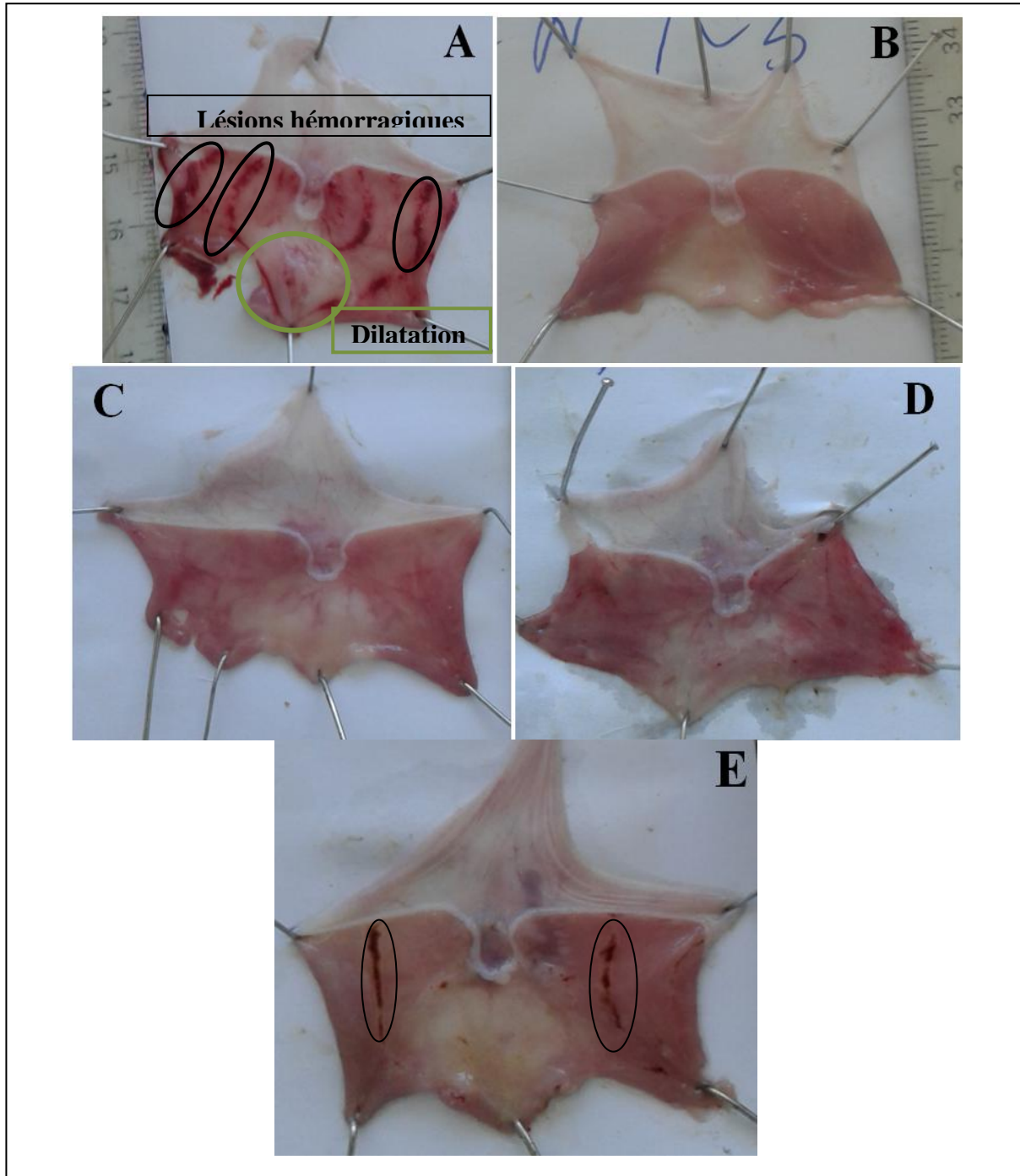


Fig. 20: Observations macroscopiques des estomacs des rats non traité, des rats intoxiqués par l'éthanol et des rats traités par l'extrait brut de *C.triflorus*. **A:** l'effet d'éthanol 70 %, **B:** témoin négative, **C:** l'effet de Ranitidine (5 mg/kg), **D:** l'effet de l'extrait brut à 400 mg/Kg et **E:** l'effet de l'extrait brut à 200 mg/Kg.

VIII.2. Evaluation du degré d'ulcération par le calcul des surfaces

L'approximation des surfaces lésées totales, en utilisant le logiciel d'AUTOCAD-2018, a permis d'évaluer l'effet gastro-protecteur de l'E.Br contre les lésions induites par l'éthanol. La figure 21 illustre les pourcentages d'ulcération des différents groupes (témoin et tests) en comparaison avec le groupe qui n'a reçu que l'éthanol. Le pourcentage d'ulcération maximal correspond au groupe d'éthanol avec $23,15 \pm 1,19$ %. Par contre, une réduction très significative des surfaces lésées a été constatée chez les groupes traités par Ranitidine et l'E.Br de *C.triflorus*, aux doses 200 ou 400 mg/Kg, avec des pourcentages de $0,75 \pm 0,16$ %, $2,71 \pm 0,13$ % et $1,49 \pm 0,14$ % respectivement.

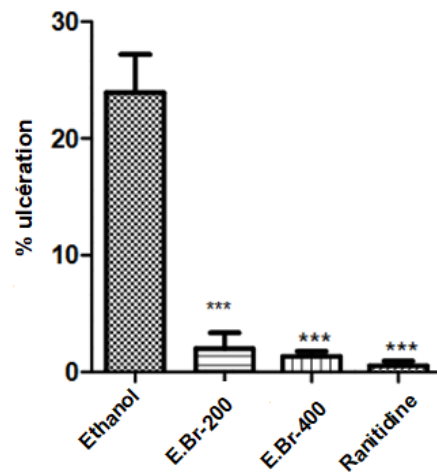


Fig. 21: Pourcentage d'ulcération induite par l'éthanol (surface totale des lésions). Les valeurs sont exprimées en tant que moyennes \pm SEM (n = 7). ***p<0,001 très hautement significativement.

VIII.3. Observations microscopiques

Les résultats macroscopiques ont été confirmés par l'étude des coupes histologiques réalisées à partir des estomacs. En effet, l'observation des coupes histologiques confirme que les rats qui n'ont reçu ni le produit ulcérogène, ni aucun autre produit, ont une muqueuse gastrique normale (Fig.22), alors que les rats ayant reçu l'éthanol ont présenté une organisation folliculaire dans le cadre d'une gastrite inflammatoire aiguë (Fig.22), c'est une gastrite avec un mélange d'éléments inflammatoires lymphoplasmocytaires et polynucléaires.

L'éthanol est à l'origine d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, comme l'anion superoxyde, l'hydrogène peroxyde et le radical hydroxyl qui favorisent la peroxydation lipidique et la formation d'ulcérations hémorragiques, aboutissant au déclenchement de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs pro-inflammatoires (histamine), aggravant ainsi les lésions (Sandhar *et al.*, 2011).

Le prétraitement des rats avec l'extrait brut à 200 mg/kg a amélioré les blessures causées par l'éthanol à un certain degré (Fig. 22). L'analyse histopathologique a démontré une discrète gas-

trite inflammatoire, ponctuée de quelques lymphocytes. Les animaux ayant reçu l'E.Br à 400 mg/Kg et le Ranitidine ont été complètement protégés contre l'action de l'éthanol, en conservant tous les aspects histologiques par rapport au groupe d'animaux ulcérogènes par l'éthanol (Fig.22). Leurs parois sont régulières, ayant une couche Muqueuse, Musculaire-muqueuse et chorion lache descretement congestive.

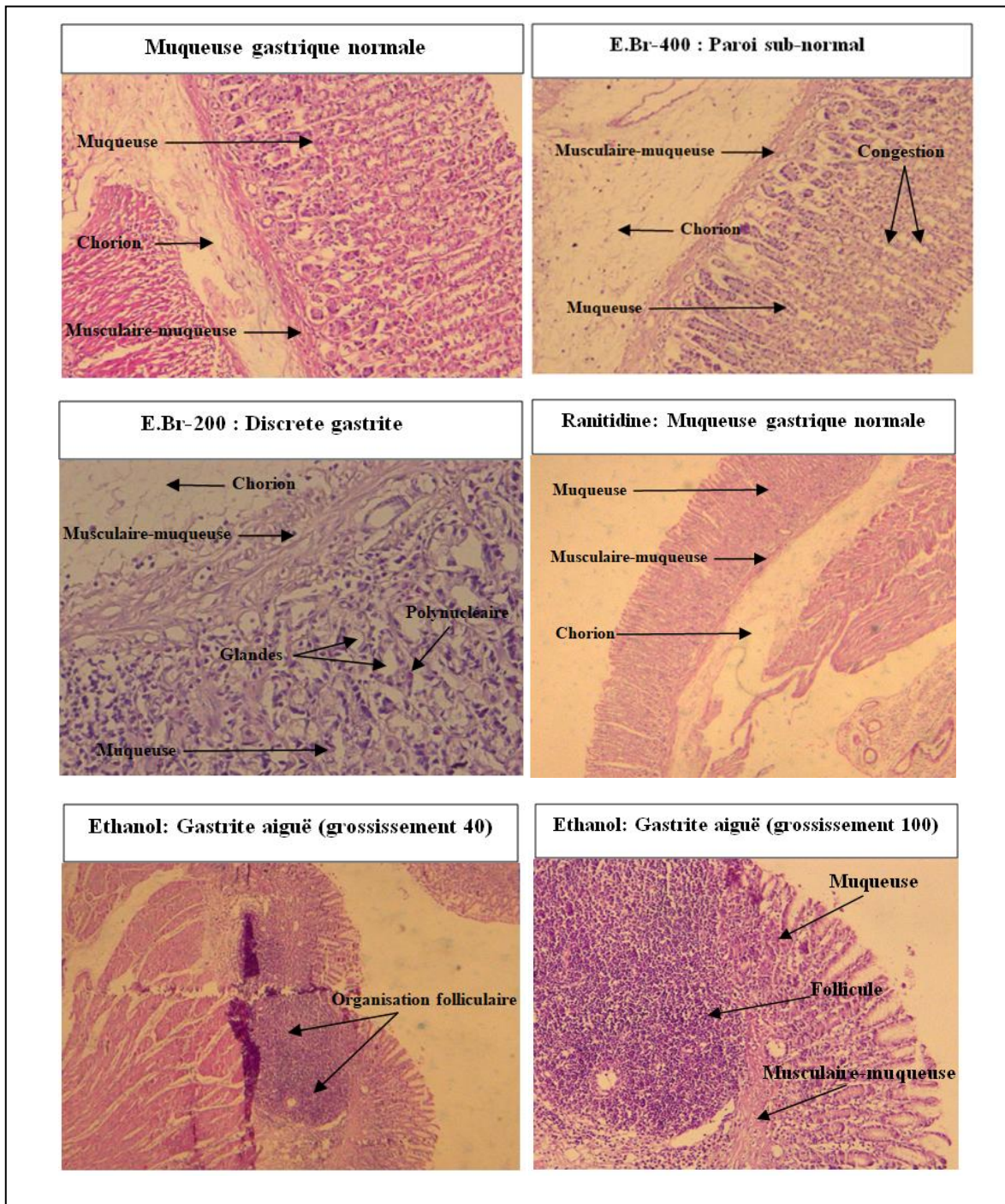


Fig. 22: Coupes histologiques de l'estomac de rat non traité et des rats intoxiqué par l'éthanolet traité par l'extrait brut de *C.triflorus*.

D'après ces résultats, notre extrait est considéré comme étant un puissant gastro protecteur, par ailleurs, la richesse de *C.triflorus* en composés phénoliques et en flavonoïdes peut être responsable de l'activité gastro protectrice observée. Il a été démontré que les constituants chimiques bioactifs incluant les flavonoïdes, les phénols et les tanins présentent un potentiel gastroprotecteur. Ces composants forment des complexes avec des protéines de la paroi cellulaire, stimulant la contraction de la plaie (Sandhar *et al.*, 2011). Les flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes qui en plus du renforcement de système de défense de la muqueuse par la stimulation de la sécrétion gastrique de mucus, peuvent piéger les espèces réactives de l'oxygène (anions super-oxyde) et les radicaux libres qui jouent un rôle important dans les lésions ulcéreuses et érosifs du tractus gastro-intestinal (Srivastava *et al.*, 2010; Santin *et al.*, 2010). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet gastroprotecteur des flavonoïdes; ceux-ci comprennent l'augmentation du contenu de la muqueuse en prostaglandine et la diminution de la sécrétion d'histamine par les mastocytes par l'inhibition de l'histidine décarboxylase (Sandhar *et al.*, 2011). Il est connu que de nombreux flavonoïdes présentent des propriétés anti-sécrétoires et cytoprotecteurs dans différents modèles expérimentaux de l'ulcère gastrique (Srivastava *et al.*, 2010; Santin *et al.*, 2010). En comparant nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres plantes, nous avons constaté que l'extrait brut de *C.triflorus* a des effets gastro-protecteurs semblables à ceux de *Glycyrrhiza glabra*.L (Fabaceae) (bruneton, 2008).

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail était d'adopter des bases scientifiques pour l'évaluation de certaines études biologiques attribuées à la plante médicinale « *Cytisus triflorus* », choisie sur la base de son usage traditionnel. Dans cette étude, les extraits de cette plante semblent présenter un intérêt réel dans la protection contre les effets du stress oxydatif, potentiel dans le traitement de l'inflammation aigue ainsi que l'inhibition de la croissance de certaines bactéries.

Le solvant méthanolique s'est avéré 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.

Tous les extraits possèdent une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres, chélatant les métaux et protégeant les macromolécules contre l'oxydation. Ce potentiel est par ailleurs confirmé par le test de l'activité antihépatotoxique. Dans le cas de l'effet curatif, les résultats montrent une amélioration considérable de l'activité des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL) et le statut des marqueurs du stress oxydant (SOD, CATA, GSH, MDA) au niveau plasmatiques et tissulaires. Une amélioration du tissu hépatique à travers les coupes histologiques a été également observée.

D'autre part, les extraits de la plante ont montré une activité antibactérienne considérable vis-à-vis de quelques souches testées. Ils n'ont également pas montré d'activité antifongique.

Finalement, La toxicité aigue évaluée sur les rats a montré que l'extrait méthanolique n'induit aucun effet toxique à la dose de 2000 mg/Kg de. Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de cet extrait a été évaluée chez les rats, l'extrait brut de la plante administré par voie orale exerce des effets anti-œdémateux et une activité protectrice de la muqueuse gastrique importants, même lors de son application locale cicatrisante justifiant ainsi leur usage traditionnel.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans les extraits de *Cytisus triflorus* et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliquée dans les processus inflammatoires ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Misih S.R.Z. and Bloomston M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics of North America*. 90, 643-653.
- Abdel-Salam O.M.E., Czimmer J., Debreceni A., Szolcsanyi J. and Mozsik G. (2001). Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *Journal of Physiology-Paris*. 95(5-1), 105-127.
- Adinortey M.B., Ansah C., Galyuon I. and Nyarko A. (2013). In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcers agents. *Ulcers*. 1-12.
- Aebi, H. (1984). Purification, characterization, and assay of antioxygenic enzymes: Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- Ait-KaciAourahoun K., Fazouane F. and Benayache S. (2015). Pharmacological potential of Cytisustriflorusl'Hérit. extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Der Pharmacia Lettre*. 7(5), 104-110.
- Ak T. and Gulcin I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interactions*. 174(1), 27-37.
- Alam M.N., Bristi N.J. and Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2), 143-152.
- Al-Rasheed N., Faddah L., Sharafi A., Mohamed A.M., AlRasheed N. and Nayira A. (2015). Assessment of the Potential Role of Silymarin Alone or in Combination with Vitamin E and/ or Curcumin on the Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rat. *Brazilian Archives of Biology And Technology*. 58(6), 833-842.
- AlSaid M., Mothana R., Raish M., Al-Sohaibani M., AlYahya M. and Ahmad A. (2015). Evaluation of the Effectiveness of Piper cubeba Extract in the Amelioration of CCl4-Induced Liver Injuries and Oxidative Damage in the Rodent Model. *BioMed Research International*. 5(1)-142-147.
- AL-Shabanah O.A., Alam K., Nagi M.N., Alrikabi A.C. and Al-Bekairi A.M. (2000). Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Science*. 66(3), 265-270.
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B. and Weil J. A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551-555.
- Andriamparany J.N., Brinkmann K., Jeannoda V. and Buerkert A. (2014). Effects of socio-economic household characteristics on traditional knowledge and usage of wild yams and medicinal plants in the Mahafaly region of south-western Madagascar. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. 10, 61-69.
- Anusuya N. and Manian S. (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of Indigoferatinctoria l. leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1, 142-147.
- Ashley T.N., Weil Z.M. and Nelson R.J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review*. 43, 385-406.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladoniafoliacea*, *Dermatocarponminiatum*, *Everniadivaricata*, *Everniaprunastri*, and *Neofuscellapulla*. *Pharmaceutical Biology*. 44(4), 247-252.
- Asmat U., Abad K. and Ismail K. (2015). Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24, 547-553.
- Ates B., Abraham L., Ercal N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetyl cysteineamide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radical Research*. 42(4), 372-377.
- Athamena S., Chalghem I., Laouark.A., Laroui S. and Khebri S. (2010). Activiteanti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de cuminumcyminum. *Lebanese Science Journal*. 11(1),69-81.
- Auvray G. and Malécot V. (2013). A revision of cytissus sections alburnoides, spartopsis and verzinum (genisteeae, fabaceae). *Edinburgh Journal of Botany*. 70, 61-120.
- Awaad A.S., El-Meligy R.M. and Soliman G.A. (2013). Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi Chemical Society*. 17, 101-124.
- Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B. and Rhee S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 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 extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-Forschung*. 46(11), 1086-1089.
- Bakr R.O., El-Naa M.M., Zaghloul S.S. and Omar M.M. (2017). Profile of bioactive compounds in *Nymphaea alba* L. leaves growing in Egypt: hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17,52-54.
- Barros L., Dueñas M., Carvalho A.M., Ferreira I.C. and Santos-Buelga C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1576-1582.
- Barros L., Ferreira M.J., Queiros B., Ferreira I.R. and Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, beta-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 103(2), 413-419
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z. and Boucherit K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie*. 12(6), 364- 371.
- Berger M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20, 48-53.
- Berkelhamer S.K., Kima G.A., Radder J.E., Wedgwood S., Czech L., Steinhorn R.H., and Schumacker P.T. (2013). Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radical Biology and Medicine*. 61, 50-61.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S. and Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5(1), 9-19.
- 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. *Nature*. 405, 458-62.
- Bossche V.H., Engelen M. and Rochette F. (2003). Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 26(1), 5-29.
- Brai B.I.C., Adisa R.A. and Odetola A.A. (2014). Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea americana*, mill (Lauraceae) 'avocado' against CCl₄-induced damage in rats. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*. 11(2), 237-244.
- Brigelius-Flohé R. and Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830, 3289-3303.
- Bruneton J. (2008). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1188.
- Buckley C.D., Gilroy D.W. and Serhan C.N. (2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*. 40, 315-327.
- Cano N., Barnoud D., Schneider S. M., Vasson M.P., Hasselmann M. and Leverve X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, p 255.
- Caquet R. (2008). Numération formule sanguine, in: 250 examens de laboratoire, Issy-les-Moulineaux: éditions Elsevier Masson. P 290-293.
- Carson C.F., Rilley T.V. And Bosque F. (2002). Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78(3), 264-269.
- Chandan B.K., Sexenam A.K., Shukla S., Sharma N., Gupta D.K. and Suri K.A. (2007). Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* mill. against CCl₄ induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(3), 560-6.
- Chang W.C., Sei C. K., Soon S.H., Bong K.C., Hye J.A., Min Y.L., Sang H.P. and Soo K.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163(6), 1161-1168.
- Choudhary M.K., Bodakhe S.H. and Gupta S.K. (2013). Assessment of antiulcer potential of *Moringa oleifera* root-bark extract in rats. *Journal of acupuncture and meridian studies*. 6(4), 214-220.
- 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 Complementary and Alternative Medicine*. 10(53), 2-8.
- Chung W.J. (2014). Management of portal hypertensive gastropathy and other bleeding. *Clinical and Molecular Hepatology*. 20(1), 1-5.

- Claiborne A. (1986). Catalase activity. In Greenwald R.A. CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press: Boca Raton, Florida. 283-284.
- Conde E., Cara C., Moure A., Ruiz E., Castro E. and Dominguez H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*. 114 (3), 806-812.
- Corrado B., Marco T., Rocchina C., Matteo F., Luca A., Narcisa G. and Mario D.T. (2009). Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharmacological Research*. 59, 90-100.
- Crotty G.F., Ascherio A. and Schwarzschild M.A. (2017). Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Experimental Neurology*. 298, 210-224.
- Cuendet M., Hostettmann K., Dyatmiko W. and Potterat O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea abulmei*. *Helvetica Chimica Acta*. 80(4), 1144-1152.
- Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed. Yves Dacosta, Paris. p 317.
- Daglia M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2), 1-8.
- Delattre J., Beaudoux J.L. and Bonnefont-Rousselot. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales*, Paris, p 14, 93, 94.
- Desjardins I. and Cadore J.L. (2006). Analyses sanguines équine. II- Biochimie. *Pratique Vétérinaire Equine*. 38(152), 7-16.
- Devi R.S., Narayan S., Vani G. and Devi C.S.S. (2007). Gastroprotective effect of Terminalia arjuna bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chemico Biological Interactions*. 167(3), 71-83.
- Di Giorgio C., Delmas F., Tueni M., Cheble E., Khalil T. and Balansard G. (2008). Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 14(2), 157-162.
- Diegelman R.F. and Evans M.C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed. *Frontiers in Bioscience*. 9, 283-289.
- Dipiro J.T., Talbert R.L., Yee G.C., Matzke G.R., Wells B.G. and Posey L.M. (2002). In: Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach, 5th Edition. *The McGraw-Hill Companies*. p 625-369.
- Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C. and Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*. 135(2), 182-199.
- Draper H.H. and Hardley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186, 421-431.
- Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S. and Seeff L.B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*. 46(12), 2027-2049.
- Dworkin M.M. and Falkow S. (2006). Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, p. 1248.
- Ekor M. (2014). Nephrotoxicity and nephroprotective potential of African medicinal plants. In Kuete V. Toxicological survey of African medicinal plants. *First edition, Elsevier: Amsterdam*. 357-393.
- Ekstedt M., Franzén L.E., Holmqvist M., Bendtsen P., Mathiesen U.L., Bodemar G., Kechagias S. (2009). Alcohol consumption is associated with progression of hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 44(3), 366-74.
- Elberry A.A., Fathalla M., Harraz A., Ghareib S., Ayman A., Nagy S.A., Gabr M.I. and AbdelSattar E. (2010). Antihepatotoxic effect of Marrubium vulgare and Withania somnifera extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 1(4), 247-254.
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82, 70-77.
- Eming S.A., Krieg T. and Davidson J.M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 127(3), 514-525.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C. (2008). Phenolic composition of *Cynaracardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331(5), 372-379.
- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 6, 108-115.
- Feher J. (2017). Quantitative human physiology: an introduction. *Second edition, Elsevier: Amsterdam*. P. 1007.

- Fukai T. and Ushio-Fukai M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15(6), 1583-1606.
- Gao R., Yuan Z., Zhao Z. and Gao X. (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*. 45, 41-45.
- Germanò M.P., De Pasquale R., Iauk L., Galati E.M., Keita A. and Sanogo R. (1996). Antiulcer activity of Vernoniakotschyana Sch. Bip. *Phytomedicine*. 2 (3), 229-239.
- Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi M. C., Aberkane H., Bousselsela S. M. and OueldMoukhtar. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydant et antimicrobienne des feuilles de Marrubiumdeserti de Noé. *Phytothérapie*. 13(2), 118 -129.
- Gião M.S., González-Sanjósé M.L., Rivero-Pérez M.D., Pereira C.I., Pintado M.E. and Malcata F.X. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 2638-2647.
- Godeau P., Herson S. and Charles Piette J. (2010). Hépatites aiguës médicamenteuse, hépatite aiguë toxique, hépatite alcoolique. *Traité de médecine interne*. 3^{ème} édition. Paris: Flammarion. 288, 1164.
- González N., Ribeiro D., Fernandes E., Nogueira D.R., Conde E., Moure A., Vinardell M.P., Mitjans M. and Domínguez H. (2013). Potential use of Cytisusscoparius extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 125, 83-89.
- Gonzalez-Gallego J., Sanchez-Campos S. and Tunon M.J. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*. 22 (3), 287-293.
- Gowri R. and Madhavan V. (2013). Evaluation of Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of SphaeranthusAmaranthoidesBurm. *International Journal of Drug Development and Research*. 5(4), 320-329.
- Guangwei X., Rongzhu L., Wenrong X., Suhua W. and Xiaowu Z. (2010). Curcumin pretreatment protects against acute acrylonitrile-induced oxidative damage in rats. *Toxicology*. 267 (1), 140-146.
- Gulfraz M., Mehmood S., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K. and ArshadG. (2008). Composition and antimicrobial properties of essential oil of Foeniculum vulgare. *African Journal of Biotechnology*. 7 (24), 4364-4368.
- Haddouchi F., Chaouche TM and Zaouali Y.(2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. *Food Chemistry*. 141(1), 253-8.
- Halliwell B. and Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British Journal of Pharmacology*. 142(2), 231-255.
- Hanganu D., Vlase L. and Olah N. (2010). LC/MS analysis of isoflavones from Fabaceae species extracts. *Farmacia*. 58(2), 177-183.
- Harborne A.J. (1998). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3^{ème} édition. *Chapman & Hall*. London. p. 320.
- Henzen C. (2003). Traitement aux glucocorticoides: risques et effets secondaires. *Forum Medical Suisse*. 3 (9), 442-446.
- Hewawasam R.P., Jayatilaka K.A.P.W. and Pathirana C. (2016). Protective effect of Asteracanthalongifolia against carbon tetrachloride and paracetamol induced oxidative stress and lipid peroxidation in mice. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(5), 179-183.
- Himmerich H., Kaufmann C., Schuld A. and Pollmacher T. (2005). Elevation of liver enzyme levels during psychopharmacological treatment is associated with weight gain. *Journal of Psychiatric Research*. 39(1), 35-42.
- Hodgson E. and Levi P.E. (2004). Hepatotoxicity. In Hodgson E. A textbook of modern toxicology. Third edition, *John Wiley & Sons, Inc.* Hoboken and New Jersey. 263-272.
- Holmström K. M. and Finkel T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(6), 411-421.
- Huang Q.F., Zhang S.J., Zheng L., He M., Huang R.B. and Lin X. (2012). Hepatoprotective effects of total saponins isolated from Taraphochlamysaffinis against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50(3-4), 713-718.
- Iqbal M., Sharma S.D., Okazaki Y., Jujisawa M. and Okada S. (2003). Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocity. *Pharmacology and Toxicology*. 92(1), 33-38.

- Jahn C.E., Schaefgetr E.J., Taam L.A., Hoofnagle J.H., Lindgren F.T., Albers J.J., Jones E.A., Brever H.B., (1985). Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification, *Gastroenterology*. 89(6), 1266-1278.
- Jalili J., Askeroglu U., Alleyne B. and Guyuron B. (2013). Herbal products that may contribute to hypertension. *Plastic and reconstructive surgery*. 131, 168-173.
- Johnson R.J., Sautin Y.Y., Oliver W.J., Roncal C., Mu W., Gabriela S.L., Rodriguez-Iturbe B., Nakagawa T. and Benner S.A. (2009). Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *Journal of Comparative Physiology*. 179 (1), 67-76.
- Jones M., Ying J., Huttner B., Evans M., Maw M., Nielson C., Rubin M.A., Green T., Samore M.H. (2014). Relationships between the importation, transmission, and nosocomial infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an observational study of 112 Veterans Affairs Medical Centers. *Clinical infectious diseases*. 58(1), 32-39.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Jachak S.M. and Saklani A. (2007). Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Current science*. 92(9), 1251-1257.
- Kalaivani T. and Mathew L. (2010). Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. exDelile, an Indian medicinal tree. *Food and Chemical Toxicology*. 48(1), 298-305.
- Kanaan G.N. and Harper M.E. (2017). Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* . 1861(11), 2822-2829.
- Kanitakis J. (1998). Immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*. 8, 539-547.
- Kansara S. and Sakhreliya B.D. (2013). Peptic ulcer. Its Pathogenesis and Recent Approaches for the Treatment. *Journal of pharmaceutical science and bioscientific research*. 3 (4), 136-144.
- Karakus E., Karadeniz A., Simsek N., Can I., Kara A. and Yildirim S. (2011). Protective effect of *Panax ginseng* against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl₄). *Journal of Hazardous Materials*. 195, 208-213.
- Kardeh S., Ashkani-Esfahani S. and Alizadeh A.M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *European Journal of Pharmacology*. 735, 150-168.
- Khadri S., Boutefnouchet N., Hadeif Y. and Djerrou Z. (2018). Evaluation of the *Cytisus Triflorus* (Lam.) Polyphenols Cicatrizing Activity on Experimental Thermal Burns in New Zealand Rabbits. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 18(3), 298-303.
- Kim J., Lee K.W. and Lee H.J. (2014). Polyphenols suppress and modulate inflammation: possible roles in health and disease. In Watson R.S., Preedy V.R. and Zibadi S. Polyphenols in human health and disease. First edition, *Elsevier: Amsterdam*. 393-408.
- Koller A. (1984). Total serumprotein. In Kaplan LA, Presce AJ, eds. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, and Correlation*. St. Louis: *Mosby Company*. p: 1316-1319.
- Kordali S., Cakir A., Ozer A.H., 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. *Bioresource Technology*. 99(18), 8788-8795.
- Krishna M. and Upendra K. (2012). Enhancement of wound healing with roots of *Ficus racemosa* L. in albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(4), 276-80.
- Kumar A., Singh V., Chaudhary A.K. (2011). Gastric antisecretory and antiulcer activities of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loudin Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 134(2), 294-297.
- Kumar S.D., Muthu K.A., Anton S.A. and Manavalan R. (2010). In vitro antioxidant activity. *International Journal of PharmTech Research*. 2(3), 2063-2070.
- Kumaravel R.S., Maleeka Begumb S.F., Parvathib H. and SenthilKumarc M. (2013). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of ethyl acetate leaf extracts of *Pterocarpus marsupium* Roxb (Fabaceae). *International Journal of Current Science*. 9, 46-55.
- Larit F. (2017). Phytochemical and Biological Studies of Two Algerian Medicinal Plants: *Cytisus villosus* Pourr. (Fabaceae) and *Hypericum afrum* Lam. (Hypericaceae). University of brothersmentouri-Constantine. *Thesis of Doctor*.
- Lavhale M.S and Mishra. (2007). Evaluation of free radical scavenging activity of *Butea monosperma* Lam. *Indian Journal of Experimental Biology*. 45(04), 376-384.
- Layné F. and Guyader D. (2003). Conduite à tenir devant une cytolysse chronique. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Hépatologie*. Paris: *Elsevier SAS*. p 69-78.

- Le K., Chiu F. and Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in Fructuslycii. *Food Chemistry*. 105(1), 353-363.
- Lee H.N. and Surh Y. J. (2012). Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochemical pharmacology*. 8410, 1340-1350.
- Lewis S.M., Margeret M., Heitkemper S. and dirksen R. (2011). Soins infirmiers: Médecine-Chirurgie. De boek, 305.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102(3), 771-776.
- Lindsay D. T. (1996). The integument. In Functional human anatomy. (Smith, J. M., Ed). Mosby-Year Book, St-Louis. P 345-375.
- Lismont C., Nordgren M., Van Veldhoven P.P., and Fransen M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 3, 1-19.
- Liu J., Luo J., Yea H., Suna Y., Lua Z. and Zenga X. (2010). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacilluspolymyxa EJS-3. *Carbohydrate Polymers*. 82(4), 1278-1283.
- Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .54(4), 1256-1264.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S. and Kolodziejczyk P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*. 69(8), 1732–1738.
- Lü J.M., Lin P.H., Yao Q. and Chen C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*. 14(4), 840-860.
- Luís A., Domingues F., Gil C. and Duarte A. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs.Pterospartumtridentatum, Cytisusscoparius and Erica. *Journal Of Medicinal Plant Research*. 3(11), 886-893.
- Luna L.C., Pigni N.B., Torras-Claveria L., Monferran M.V., Maestri D., Wunderlin D.A., Feresin E. and Bastida J. (2013). RamorinoagirolaeSpeg (Fabaceae) seeds, an Argentinean traditional indigenous food: Nutrient composition and antioxidant activity. *Journal of food composition and analysis*. 31, 120-128.
- Luo W., Zhao M., Yang B., Ren J., Shen G., Rao J. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from Phyllanthusemblica L. fruit. *Food Chemistry*. 26, 277-282.
- 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. *Alternative medicine review* . 11(2), 114-127.
- Mahboubi M. and Hagi G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of Menthapulegium L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*. 119(2), 325-327.
- Majdalawieh A.F. and Fayyad M.W. (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of Nigella sativa and thymoquinone: A comprehensive review. *International immunopharmacology*. 28(1), 295-304.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification (Chapter 1 and 2). First edition, *Academic Press* : London.1-113.
- Marklund S. and Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47, 469-474.
- Mateen S., Moin S., Zafar A. and Khan A. (2016).Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clinicachimicaacta*. 463,4-10.
- Mesaros N., Bambeke F.V., Avrain L., Glupczynski Y., Vanhoof R., Plesiat P. and 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.
- Mineur Y.S., Somenzi O. and Picciotto M.R. (2007). Cytisine, a partial agonist of high-affinity nicotinic acetylcholine receptors, has antidepressant-like properties in male C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*. 52(5), 1256-1262.
- Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska A.M. and Zujko M.E. (2017). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*. 63(1), 68-78.

- Mohammad A., Al-Mofarreh, Ibrahim A. and Al Mofleh K. (2003). Esophageal ulceration complicating doxycycline therapy. *World journal of gastroenterology*. 9(3), 609-611.
- Mukhopadhyay D., Dasgupta P., Sinha Roy D., Palchoudhuri S., Chatterjee I., Ali S. and Dastidar S.A. (2016). In vitro spectrophotometric hydrogen peroxide scavenging assay using 1,10phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*. 6(1), 124-132.
- Munita J.M. and Arias C.A. (2016). Mechanisms of antibiotics resistance. *Microbiology spectrum* .4(2), 1-16.
- Muthu Lakshmi L.T., Radha R. and Jayshree N. (2014). In vitro antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content in extracts from the bark of DalbergiasissooRoxb. *International journal of pharmaceutical sciences and research* . 5(5), 226-231.
- Nagarajan A. and Sellamuthu M. (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of Indigoferatinctoria L. leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(1), 142-147.
- Naidu M.M., Shyamala B.N., Naik P.J., Sulochanamma G. and Srinivas P. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Science and Technology*. 44(2), 451-456.
- Nandy S., Shekhar H.P., Ranjan B.N. and Chakraborty B. (2012). In vitro evaluation of antioxidant activity of Leucasplukenetii (Roth) Spreng. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(3), 254-262.
- Naziroglu M., Cay M., Ustundag B., Aksakal M. and Yekeler H. (1999). Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochemistry and Function*. 17(4), 253-259.
- Nedelcheva A.M., Dogan Y. and Guarrera P.M. (2007). Plants traditionally used to make brooms in several European countries. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 3(2), 1-11.
- Nirmal J., Babu C.S., Harisudhan T. and Ramanathan M. (2008). Evaluation of behavioural and antioxidant activity of Cytisusscoparius Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC complementary and alternative medicine*. 8(15), 45-56.
- OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development. (2008). Guideline for testing of chemicals, 425, Acute oral toxicity-fixed dose method. Paris.1-27.
- Okhawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *AnalyticalBiochemistry*. 95(2), 351-358.
- Ortega N., Doña I., Moreno E., Audicana M.T., Barasona M.J., Berges-Gimeno M.P., Blanca-Lopez N., Lobera T., Padial A., Rosado A. and Torres M.J. (2014). Practical Guidelines for Diagnosing Hypersensitivity Reactions to Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 24(5), 308-323.
- Ouédraogo N., Lompo M., Sawadogo R.W., Tibiri A., Hay A. E., Koudou J., Dijoux M. G. and Guissou I. (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de Pterocarpuserinaceus Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*. 10(5), 286-292.
- Ozturk I.C., Ozturk F., Gul M., Ates B. and Cetin A. (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*. 27(5), 309-315.
- Paletz J. L. and Morris S. F. (1996). Burn care: outpatient management. *Canadian Journal of Diagnosis*. 13, 64-75.
- Pamulaparathi A., Prathap V.R., Banala M. and Swamy Nanna R. (2016). Total Phenolic, Flavonoid contents and Antioxidant assays in leaf extracts of Senna alata (L.) Roxb. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(9), 981-985.
- Patel N., Joseph C., Corcoran G.B. and Ray S.D. (2010). Modulates doxorubicin-induced oxidative stress, BclxL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 10(2), 143-15.
- Patro K., Sasmal D., Mazumder P.M., Pattnaik A., Behera P. and Ghosh A. (2014). Studies on gastroprotective activity of ethyl acetate leave fraction obtained from Canthiumcoromandelicum (Burm.f.) Alston in albino rats. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9 (5), 52-64.
- Percival S.L. (2004). Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.
- Pereira O.R., Macias R.I., Perez M.J., Marin J.J. and Cardoso S.M. (2013). Protective effects of phenolic constituents from Cytisusmultiflorus, Lamium album L. and Thymus citriodorus on liver cells. *Journal of Functional Foods*. 5(3), 1170-1179.

- Perron N.R. and Brumaghim J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*. 53(2), 75-100.
- Pinela J., Barros L., Carvalho A.M. and Ferreira I.C. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and chemical toxicology*. 49(11), 2983-2989.
- Pisoschi A.M. and Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97, 55-74.
- Popovici C., Saykova I. and Tylkowskib. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. (4), 1-8.
- Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C. and Valko M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*. 38(, 592-607.
- Prior R.L., Wu X. and Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(53), 4290-4302.
- Qin L. and Crawford J.M. (2018). Anatomy and cellular functions of the liver. In Sanyal A.J., Lindor K.D., Boyer T.D. and Terrault N.A. Zakim and Boyer's hepatology. *Seventh edition, Elsevier* : Amsterdam. 2-19.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. and Pouységu L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 50(3), 586-62.
- Raja S., Haja N.A., Kumar V., Mukherjee K., Bandyopadhyay A. and mukherjee K. (2007). Exploring the Effect of CytisusScoparius on Markers of Oxidative Stress in Rats. *RanianJournal of Pharmacology&Therapeutics*. 6,15-21.
- Rankin J.A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*. 15(1), 3-17.
- Re R., Pellegrinni N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10), 1231-1237.
- Reis F.S., Ferreira I.C.F.R., Barros L. and Martins A. (2011). A Comparative Study of Tocopherols Composition and Antioxidant Properties of in Vivo and in Vitro Ectomycorrhizal Fungi. *Food Science and Technology*, 44, 820-824.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. and Ribéreau-Gayon P. (1968). Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. *Dunod*, Paris, p 671.
- Rodrigo R. and Gil-Becerra D. (2014). Implications of polyphenols on endogenous antioxidant defense systems in human diseases. In Watson R.S., Preedy V.R. and Zibadi S. Polyphenols in human health and disease. *First edition, Elsevier*: Amsterdam. 201-217.
- Rodríguez-Riaño T., Ortega-Olivencia A. and Devesa J. (2004). Reproductive biology in Cytisusmultiflorus (Fabaceae). *Annales Botanici Fennici*. 5, 179-188.
- Rodríguez-Riaño T., VALTUEÑA F.J. and Ortega-Olivencia A. (2006). Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in Cytisustristriatus and C. multiflorus (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of botany*. 98(4), 777-791.
- Romanik G., Gilgenast E., Przyjazny A. and Kaminski M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 70(2), 253-61.
- Rosa D.P., Bona S., Simonetto D., Zettler C. and MARRONI C.A. (2010). Marron melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de Gastroenterologia*. 47(1), 57-65.
- Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P. and Chatelet F.P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. *Association française des enseignants et chercheurs en anatomie pathologie*. 1-57.
- RubalyaValantina S. and Neelamegam P. (2015). Selective ABTS and DPPH- radical scavenging activity of peroxide from vegetable oils. *International Food Research Journal*. 22(1), 289-294.
- Ryan M.T., Muller H. and Pfanner N. (1999). Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 274(29), 20619-20627.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. and Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91(4), 621-632.
- Sanchez-Munoz F., Dominguez-Lopez A. and Yamamoto-Furusho J.K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 14,4280-4288.

- Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. and Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *International PharmaceuticaScientia*. 1 (1), 25-41.
- Santin J.R., Lemos M., Junior L.C.K., Niero R., Andrade S.F. (2010). Antiulcer activity of *Achyrolinea-tureoides* Lam. (Asteraceae). A folk medicinal plant in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. 130(2), 334-339.
- Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A. and Perry G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*. 41(2), 143-164.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V. and Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different In vitro methods. *Free RadicalResearch*. 36, 177-187.
- Schneider I. and 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. *PhytotherapyResearch*. 19(4), 263-272.
- Seragui S., Derraji S., Mahassin F. and Cherrah Y. (2013). Résistance bactérienne: Etat de lieu au Maroc. *Maroc Medical*. 35(3), 199-205.
- Serhan C.N., Ward P.A. and Gilroy D.W. (2010). Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press*. p. 13-14.
- Sharma U., Sharma K., Sharma N., Sharma A., Singh H. and Sinha A. (2008). Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophaerhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high performance liquid chromatography (RPHPLC). *Journal of agricultural and foodchemistry*. 56(2), 374-379.
- Siddhuraju P. and Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vignaunguiculata* (L.) Walp. seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1), 10-19.
- Singh S.P. (2015). Postharvest Oxidative Stress in Fresh Fruits/ Postharvest Fruit and Vegetable Technology. Edited by *Ron B. H. Wills and John Golding*. 237-260.
- Smaga I., Niedzielska E., Gawlik M., Moniczewski A., Krzek J., Przegaliński E., Pera J. and Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports*. 67(3), 569-580.
- Smith K.L. and Dean S.J. (1998). Tissue repair of the epidermis and dermis. *Journal of Hand Therapy*. 11, 95-104.
- Sökmen B.B., Aydın S. and Kınalıoğlu K. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb) Norman. *IUFS Journal of Biology*. 71(1), 43-51.
- Sousa R., Dias S. and Antunes C. (2006). Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*. 559, 135-148.
- Srivastava V., Viswanathaswamy M. and Mohan G. (2010). Determination of the antiulcer properties of sodium cromoglycate in pylorus ligated albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 42(3), 185-190.
- Steinbeck M.J., Khan A.U. and Karnovsky M.J. (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9, 10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(21), 15649-15654.
- Stevens A. and Lowe J. (2009). Core Pathology. *Ed Mosby Elsevier*. China, 50-54.
- Stevens C.D. (2010). Clinical immunology and serology. Third edition, F.A. *Davis Company* Philadelphia. p. 2-10.
- Sundararajan R. and Koduru R. (2014). *Cytisus scoparius*: A review of ethnomedical, phytochemical and pharmacological information. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 4(4), 2151-2169.
- Sundararajan R., Haja N.A., Venkatesan K., Mukherjee K., Saha B.P., Bandyopadhyay A. and Mukherjee P.K. (2006). *Cytisus scoparius* link-A natural antioxidant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6(8), 1-7.
- Suriyamoorthy S., Subramaniam K., Raj-Durai S.J., Wahaab F. and Chitraselvi R.P.E. (2014). Evaluation of wound healing activity of *Acacia caesia* in rats. *Wound Medicine*. 7, 1-7.
- Tennant B.C. and Center S.A. Hepatic function. In Kaneko J.J., Harvey J.W. and BRUSS M.L. (2008). Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed., *San Diego*, 379-412.
- Teocharis S.E., Margeli A.P., Skaltsas S.D., Spiliopoulou C.A. and Koutselinis A.S. (2001). Induction of methallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. *Toxicology*. 161, 129-138.

- Thephinlap C., Pangjit K., Suttajit M. and Srichairatanakool S. (2013). Anti-oxidant properties and anti-hemolytic activity of Psidiumguajava, Pandanusodoros and Rhinacanthusnasutus. *Journal of medicinal plant research*. 7(27), 2001-2009.
- Toro J. and Rodrigo R. (2009). Oxidative stress: basic overview. In Rodrigo R. Oxidative stress and anti-oxidants: their role in human disease. First edition, *Nova Biomedical Books* : New York. 124.
- Tortora G.J., Grabowski S.R. and Parent J. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou: *Centre Éducatif et Culturel inc.*. 1203.
- Tramutola A., Lanzillotta C., Perluigi M. and Butterfield D.A. (2017). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*. 133, 88-96.
- Tréchet P. and Jouzeau J-Y. (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des INS. *Revue Française d'Allergologie*. 54(3), 212-217.
- Tsai J.C., Chiu C.S., Chen Y.C., Lee M.S. and Hao X.Y. (2017). Hepatoprotective effect of Coreopsis tinctoria flowers against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 7(1), 139-141.
- Upadhyay R.K. (2012). Plant latex: its toxicity and defense against herbivorous insects: A review *International Journal of Current Research*. 4(01): 5-10.
- Vadnere G.P., Patil A.V., Wagh S.S. and Jain S.K. (2012). In vitro free radical scavenging scavenging and antioxidant activity of Cicer arietinum L. (Fabaceae). *International Journal of Pharm Tech Research*. 4, 0974-4304.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007). Free radicals and anti-oxidants in normal physiological functionand human disease. *The international journal of biochemistry&cellbiology*. 39(1), 44-84.
- Vaškóvá J., Vaško L. and Kron I. (2012). Oxidative processes and antioxidativemetaloenzymes. In ElMisiry M.A. Antioxidant enzyme. First edition, *InTech* : Croatia. 19-58.
- Vauzour D., Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha M.J. and Spencer J.P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2, 1106-1131.
- Vermerris W. and Nicholson R. (2006) .Phenolic compound chemistry. Ed. *SPRINGER*. p 1-70.
- Wagner J.G. and Roth R.A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological Reviews*. 52, 349-374.
- Waller D.G., Renwick A.G. and Hillier K. (2005). Medical Pharmacology and Therapeutics, 2nd ed. *El Sevier Limited*. 347-401.
- Wang B.J., Liu C.T., Tseng C.Y., Wu C.P. and Yu Z.R. (2004). Hepatoprotective and antioxidant effects of Bupleurumkaoli Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO2 on CCl4-induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. 42, 609-617.
- Wantana R., Tassanee N. and Subhadhirasakul S. (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of Putranjivaroxburghii Wall.leaf extract in experimental animals. *Journal of Natural Medicinal*. 63(3), 290-296.
- Waterman P.G., Sprent J. and McKey D. (1994). Costs and benefits of secondary metabolites to the Leguminosae. *Advances in Legume Systematics*. 5, 129-149.
- Weill B., Batteux F. and Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds, *De Boeck Université* (Paris), p.12-23.
- Williamson E.M., Okpako D.T. and Evans F.J. (1996). Selection, preparation and pharmacological Evaluation of plant Materiel (pharmacological methods in phytotherapy Research). Edition *Wiley*. 1(25), 46-228.
- Winter C.A., Risley E.A. and Nuss G.W. (1962). Carrageenin-induced oedema in hind paws of rats as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 111, 544-547.
- Yang J., Guo J. and Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *Journal Food Science Technology*. 41, 1060-1066.
- Yazdani D., Zainal Abidin M.A., Tan Y.H., Kamaruzaman S. and Jaganath I.B. (2012). Screening of phytochemical from ethnomedicinal plants in Malaysia for use against toxigenic Aspergillus flavus. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(42), 5464-5468.
- Ye Z.-W., Zhang J., Townsend D.M. and Tew K.D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1850(8), 1607-1621.
- Yin L., Wei L., Fu R., Ding L. and Guo Y. (2014). Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Veronica ciliata Fisch. Extracts Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Molecules*. 19(6), 7223-7236.

- Zeinali M., Reezae S.A. and Housseinzadeh H. (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomedicine&pharmacotherapy*. 92, 898-1009.
- Zhang D.X. and Gutterman D.D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatoryphysiology*. 292(5), 2023-2031.
- Zhao S., Zhao X., Su H., Liu X. and Suo X. (2010). Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine. *China animal husbandry & veterinarymedicine*. 37(12), 35-38.