

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

BENKHALED Abderrahim

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Activités anti-inflammatoire, anti-oxydante et antimicrobienne de
l'extrait aqueux de *Limoniastrum guyonianum***

Soutenue publiquement le 11/02/2018

DEVANT LE JURY

Président	Bouriche Hammama	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Senator Abderrahmane	Pr. Univ. Batna2
Examineurs	Zerroug M. Mihoub	Pr. UFA Sétif 1
	Madani Khodir	Pr. Univ Bejaia
	Boudjelal Amel	MCA. Univ M'sila

Laboratoire de Biochimie Appliquée

La plupart des hommes ont, comme les plantes,

des propriétés cachées que le hasard fait découvrir

François de La Rochefoucauld

Dédicaces

A la mémoire de Ma sœur Nadia et de mon oncle et ami Abdelkrim

Que Dieu vous accueille dans son vaste Paradis

A mes frères et sœurs et leurs enfants

A ma belle famille

A mes enfants vous êtes l'espoir de ma vie

Abderrahim alias Rachid

Sommaire

Remerciements	
Résumé	
Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Revue bibliographique	
I. <i>Limoniastrum guyonianum</i>	
I.1. Introduction	03
I.2. Description Botanique et nomenclature vernaculaire	03
I.3. Utilisation de <i>Limoniastrum guyonianum</i>	04
I.4. Activités pharmacologiques	05
I.4.1. Propriétés antioxydantes	06
I.4.2. Activité antibactérienne	07
I.4.3. Activité immunomodulatrice	07
I.4.4. Activité antiproliférative	08
II. Stress oxydant	
II.1. Radicaux libres	10
II.2. Antioxydants	11
II.3. Antioxydants d'origine végétale	13
II.3.1. Vitamine C	13
II.3.2. Vitamine E	14
II.3.3. Caroténoïdes	15
II.3.4. Oligoéléments	15
II.3.5. Polyphénols	16
II.4. Modes d'action des polyphénols	18
II.4.1. Piégeage des radicaux libres	18
II.4.2. Chélation des ions métalliques	20
II.4.3. Inhibition enzymatique	21
III. Inflammation	
III.1. Généralités	22
III.2. Phases de la réaction inflammatoire	23
III.2.1. Phase vasculaire	25
III.2.2. Phase cellulaire	26
III.2.3. Phase de résolution	28
III.3. Médiateurs de l'inflammation	28
III.3.1. Médiateurs lipidiques	28
III.3.1.1. Eicosanoïdes	30
III.3.1.2. Leucotriènes	30
III.3.1.3. PAF-acether	30
III.3.2. Cytokines	30
III.3.3. Radicaux libres	31
III.4. Anti-inflammatoires	31

III.4.1. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	31
III.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	32
III.4.3. Anti-inflammatoires polyphénoliques d'origine végétale	33

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal	35
I.1. Site de récolte de la plante	35
I.2. Traitement préliminaire de la plante	36
II. Méthodes d'analyses phytochimiques	36
II.1. Taux d'humidité	36
II.2. Teneurs en matière organique et minérale	37
II.3. Détermination de la teneur en substances extractibles	37
II.3.1. Teneur en substances extractibles par l'eau	37
II.3.2. Teneur en substances extractibles par le méthanol ou l'acétone	38
II.4. Tests phytochimiques	39
II.4.1. Préparation de l'infusé	39
II.4.2. Réactions de mise en évidence	39
II.4.2.1. Polyphénols	39
II.4.2.2. Flavonoïdes	39
II.4.2.3. Tanins	39
II.4.2.4. Saponosides	40
II.4.2.5. Anthocyanes	40
II.4.2.6. Coumarines	40
II.4.2.7. Quinones libres et combinés	40
II.4.2.8. Stérols et polyterpènes	40
II.4.2.9. Réaction de révélation des alcaloïdes	41
II.5. Extraction	41
II.6. Dosage des polyphénols totaux	42
II.7. Dosage des flavonoïdes totaux	42
II.8. Dosage des tanins totaux	43
II.9. Analyse de l'extrait par HPLC-MS	43
II.9.1. Principe de l'analyseur à temps de vol	43
II.9.2. Analyse de l'extrait par HPLC-TOF/MS	44
III. Etude Toxicologique	44
III.1. Toxicité aiguë	44
III.1.1. Animaux	44
III.1.2. Constitution des lots et traitement des souris	45
III.1.3. Troubles symptomatiques	45
III.1.4. Détermination des doses létales et tolérée	45
III.1.5. Paramètres biochimiques sériques	46
III.1.6. Examens histologiques	46
III.2. Effet hémolytique	47

IV. Etude de l'activité antioxydante	50
IV.1. Activité antioxydante in vitro	50
IV.1.1. Effet piègeur du radical DPPH•	50
IV.1.2. Test de réduction du radical-cation ABTS•+	51
IV.1.3. Test de blanchissement du β-carotène	51
IV.1.4. Pouvoir réducteur (FRAP)	52
IV.1.5. Chélation du fer ferreux	52
IV.2. Effet préventif de l'extrait contre l'hématotoxicité causée par le nickel	53
V. Activité anti-inflammatoire	55
V.1. Œdème de la patte du rat induit par la carragénine	55
V.2. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris	55
VI. Activité analgésique	56
VI.1. Activité analgésique périphérique	56
VI.1.1. Test de torsion	56
VI.1.2. Méthode analgésimétrique directe	56
VI.2. Test du Tail Flick	57
VII. Activité Antipyrétique	58
VIII. Activité thrombolytique	58
IX. Activité antibactérienne	61
IX.1. Méthode des disques	62
IX.2. Méthode des microdilutions en milieu solide	63
X. Analyses statistiques	63

Résultats et discussion

I. Analyses phytochimiques	64
I.1. Taux d'humidité	64
I.2. Teneurs en matière organique et minérale	64
I.3. Teneur en substances extractibles	65
I.4. Tests phytochimiques	66
I.5. Extraction	69
I.6. Dosage des polyphénols totaux	69
I.7. Dosage des flavonoïdes	71
I.8. Dosage des tanins totaux	73
I.9. Analyse de l'extrait par HPLC-TOF/MS	73
II. Etude Toxicologique	78
II.1. Toxicité aiguë	78
II.1.1. Signes généraux	79
II.1.2. Evolution pondérale	79
II.1.3. Masses relatives des organes	81
II.1.4. Paramètres biochimiques	83
II.1.4.1. Marqueurs de la fonction hépatique	84
II.1.4.2. Marqueurs de la fonction rénale	85
II.1.5. Examen histopathologique	86
II.1.5 .1. Histopathologie du foie	86

II.1.5.2. Histopathologie des reins	88
II.2. Effet hémolytique	90
III. Etude de l'activité antioxydante	94
III.1. Activité antioxydante in vitro	94
III.1.1. Effet piègeur du radical DPPH•	94
III.1.2. Test de réduction du radical-cation ABTS•+	96
III.1.3. Test de blanchissement du β -carotène	97
III.1.4. Pouvoir réducteur (FRAP)	99
III.1.5. Chélation du fer ferreux	101
III.2. Effet préventif de l'extrait contre l'hématotoxicité causée par le nickel	102
IV. Activité anti-inflammatoire	105
IV.1. Œdème de la patte du rat induit par la carragénine	105
IV.2. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris	107
V. Activité analgésique	109
V.1. Activité analgésique périphérique	109
V.1.1. Test de torsion	109
V.1.2. Test à l'algésimètre	111
V.2. Activité analgésique centrale par le test du Tail Flick	113
VI. Activité Antipyrétique	115
VII. Activité thrombolytique	117
VII.1. Mise en évidence de l'activité thrombolytique	117
VII.2. Mesure de l'activité thrombolytique en <i>ex vivo</i>	118
VII.3. Etude cinétique de l'activité thrombolytique	119
VIII. Activité antibactérienne	120
Conclusion	124
Annexes	
Références bibliographiques	

Remerciements

Plusieurs années de thèse m'ont permis de développer diverses compétences techniques et humaines. Cet aboutissement personnel n'aurait pu se réaliser correctement sans la présence des nombreuses personnes qui m'ont entourée. Que les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Ma profonde gratitude s'adresse en premier lieu à mon encadreur Pr. Senator Abderrahmane pour la grande liberté qu'il m'a donné dans la réalisation de ce travail. Je tiens également à le remercier de toute la patience et des corrections minutieuses dont il a su faire preuve au cours de la rédaction de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger

ce travail :

Mme BOURICHE Hamama, professeur à l'université de Sétif qui m'a fait l'honneur de présider ce jury,

M. MADANI Khodir, professeur à l'université de Bejaia qui m'at fait l'honneur en acceptant de participer à ce jury malgré ses multiples occupations.

Mme BONDJELAL Amel, maitre de conférences à l'université de M'sila qui a bien voulu examiner ce travail,

Au Professeur ZEROUQ M Mouhoub, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés aux personnes qui me sont les plus chères. Rien ne m'aurait été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille. Je remercie ma mère et mon père, de m'avoir soutenue et accompagnée aux moments les plus durs. Pour finir, il est des rencontres dans la vie auxquelles on ne s'attend pas. Je remercie ici la plus belle d'entre elles, ma femme, pour tout l'amour qu'elle m'a donné de m'avoir soutenue et surtout supportée pendant ces années.

Résumé

Ce travail a été consacré à l'étude phytochimique, toxicologique et de certaines activités pharmacologiques (antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, thrombolytiques et antibactérienne) de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*. Les résultats de l'analyse phytochimique ont montré une richesse de la plante en polyphénols (64.3 µg/mg EAG/mg Ex), en flavonoïdes (34.1 µg EQ/mg Ex) et plus particulièrement en tanins (63.25 µg EAT/mg Ex). L'analyse par HPLC-TOF/MS a montré la présence prépondérante d'acide fumarique, d'acides phénoliques, de flavones aglycones, de catéchine (flavanol) et de naringine (flavanone glycosilé) à l'état de traces. Les tests de toxicité *in vivo* et sur globules rouges ont montré l'innocuité de l'extrait. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* par les tests de DPPH, ABTS, β-carotène, FRAP, β carotène et chélation de fer et *in vivo* contre le stress oxydatif induit par le nickel a montré le potentiel antioxydant de l'extrait. L'extrait s'est avéré plus efficace que la vit C dans la réduction de l'effet hématotoxique du nickel et ceci de manière dose-dépendante. D'autre part, l'extrait aqueux a inhibé de façon significative l'évolution de l'œdème la patte (74.0 %) et de l'oreille (86.15 %) ce qui démontre la présence de substances à potentiel anti-inflammatoire élevé. Le criblage de l'effet analgésique périphérique de l'extrait a été confirmé par le test de Koster (63.0 %) et par analgésimètre (287.48 %). Par ailleurs, un faible pouvoir analgésique central morphine-like est enregistré par le test de Tail Flick aux doses étudiées. De surcroît, l'extrait a réduit l'hyperthermie provoquée par l'injection de la levure mais son effet antipyrétique est moins efficace que celui du paracétamol. L'extrait s'est montré avoir également des propriétés thrombolytiques (30.08 %). Enfin, on note les effets antibactériens de l'extrait, particulièrement contre *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). En conclusion, cette étude a permis de dévoiler des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques très prometteuses de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* pour être concrétiser en biopharmaceutique.

Mots clés : *Limoniastrum guyonianum*, extrait aqueux des feuilles, phytochimie, toxicité, activités pharmacologiques.

Abstract

This work was devoted to the phytochemical, toxicological and many pharmacological activities (antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, thrombolytic and antibacterial activity) of the aqueous extract of the leaves of *L. guyonianum*. The phytochemical analysis showed the richness of the plant in polyphenols (64.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ EAG/mg Ex), flavonoids (34.1 μg EQ/mg Ex) and particularly in tannins (63.25 μg EAT/mg Ex). Analysis by HPLC-TOF/MS allowed us to demonstrate the predominant presence of fumaric acid, phenolic acids and aglyconic flavones, catechin (flavanol) and naringin (flavanone glycosylated) as trace. Toxicity tests on animal models and on red blood cells demonstrated the safety of the extract. The *in vitro* antioxidant potency tested by DPPH, ABTS, β -carotene, FRAP, β carotene and iron chelation and the *in vivo* against nickel-induced oxidative stress showed the antioxidant potential of the extract. The extract was more effective than vit C in reducing the hematotoxic effect of nickel in a dose-dependent manner. On the other hand, the aqueous extract significantly inhibited the evolution of the ear (74.0 %) and paw edema (86.15 %), which demonstrates the presence of substances with a high anti-inflammatory potential. The screening of the peripheral analgesic effect of the extract was demonstrated by the Koster test (63.0 %) and by analgesimeter (287.48 %). On the other hand, a low morphine-like central analgesic power is recorded by the Tail Flick test at the doses studied. In addition, the extract reduced the hyperthermia caused by the injection of yeast but its antipyretic effect is less effective than of paracetamol. The extract was also shown to have thrombolytic properties (30.08 %). Finally, we note antibacterial effects of the extract particularly against *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). In conclusion, this study revealed very promising pharmacological and therapeutic properties of the aqueous extract of the *L. guyonianum* leaves to be realized in biopharmaceuticals.

Key words: *Limoniastrum guyonianum*, aqueous leaves extract, phytochemistry, toxicity and pharmacological activities.

ملخص

يوضح هذا العمل ما تم إنجازه بشأن الدراسة الكيميائية، الأهمية وتقييم الخصائص العلاجية (النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المأكن للألم، النشاط الخافض للحرارة، النشاط التحليلي لخرارة الدم والنشاط المضاد للبكتيريا) للمنتج المائي لأوراق *L. guyonianum*. أظهرت نتائج التحليل الكيميائية غنى النبات بمتعددة الفينول (64.3 µg/mg EAG/mg Ex) والفلافونويدات (34.1 µg EQ/mg Ex)، والدباغ على وجه الخصوص (63.25 µg EAT/mg Ex). كما مكنت تقنية الفحص الكروماتوغرافي HPLC-TOF/MS من إثبات الوجود الغالب لحمض fumarique، للأحماض الفينولية، فلافونات، catéchine (فلافانول) و naringine (فلافانول الاسكري) على شكل آثار. وقد أظهرت اختبارات الأهمية على النموذج الحيواني و على خلايا الدم الحمراء أن المنتج غير سام تماما. كما بينت دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة للمنتج في الزجاج بواسطة اختبارات DPPH, ABTS, FRAP, β-carotène et chélation de fer و في الحي ضد الاكسدة الناجمة عن النيكل قدرات مضادة للأوكسدة. حيث كان المنتج أكثر فاعلية من فيتامين ج في الحد من تأثير التآكل الدموي للنيكل بطريقة تعتمد على الجرعة. من ناحية أخرى، فإن المنتج المائي حال بفعالية دون تطور التهاب القدم (74.0 %) والأذن (86.15 %) مما يوحي باحتوائه على مواد مضادة للالتهابات ذات قدرة عالية. من جهة أخرى تم الكشف باستعمال جهاز قياس الألم (287.48 %) واختبار Koster (63.0 %) أن للمنتج خصائص مأكنة للألام الطرفية. على عكس ذلك، أظهر المنتج باستعمال اختبار Tail Flick قدرة ضعيفة على تكبير الألام المركزية عكس المورفين. علاوة على ذلك، أبان المنتج قدرة على خفض درجة حرارة الجرذان الناجمة عن حقن الخميرة ولكن بفاعلية أقل من الباراسيتامول. كما تبين أن للمنتج خصائص تحليل خثرارة الدم (30.08 %). وأخيرا نوه بقدرة المنتج الكبيرة المضادة للبكتيريا وخصوصا ضد *Staphylococcus epidermidis* و *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). و في الختام، مكنت هذه الدراسة من الكشف عن خصائص دوائية وعلاجية واعدة جدا للمنتج المائي لأوراق *L. guyonianum* يمكن تطبيقها في المنتجات البيولوجية الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية : *Limoniastrum guyonianum*، المستخلص المائي للأوراق، الكيمياء النباتية، السمية، الخصائص الدوائية.

Abréviations

AA : acide ascorbique
AAR : activité antioxydante relative
AIC : activité antiradicalaire
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens
ALAT : Alanine aminotransférase
ARP : pouvoir antiradicalaire
ASAT : Aspartate aminotransférase
ATCC: American Type Culture Collection
BHT: Butylated hydroxytoluene
CAT : Catalase
CK : Créatine kinase
CMI : Concentration minimale inhibitrices
COX : Cyclooxygénase
DHA : acide déhydroascorbique
DL : Dose Létale
DMM : Dose Minimale Mortelle
DMT : Dose Maximale Tolérée
EC : concentration effectrice
FNS : Formule numérique sanguine
GB: globules blancs
GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : glutathion S-transférase
Hb : hémoglobine
Hc : Hémolyse cellulaire
Ht : Hématocrite
IL : Interleukines
INF γ : Interféron gamma

PC : Poids des caillots formés

MS : Matière sèche

NF-Kb : facteur de transcription de l'ADN

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

NIH: National Institutes of Health

NOS: Nitrique oxyde synthase

PAF: Platelet Activating Factor

PAL : Phosphatase alcaline

PC : Poids des caillots formés

PLA₂ : Phospholipase A₂

Plt : Plaquettes

PMNs : Polymorphonucléaires neutrophiles

PTK : protéine tyrosine kinase

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SOD: Superoxyde dismutase

STTs: Short-Term Test

TGF : Facteur de croissance de transformation

TNF-α : Facteur de nécrose tumorale

UFC: Colony forming units

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1

VGM : Volume globulaire moyen

Liste des figures

Figure 01 : Aspects morphologiques de <i>Limoniastrum guyonianum</i>	04
Figure 02 : Origine des différents espèces réactives de l'oxygène	11
Figure 03 : Espèces oxygénées activées (EOA) et les antioxydants régulateurs de leur production	12
Figure 04 : Principales enzymes antioxydantes	12
Figure 05 : La vitamine C et l'acide ascorbique	14
Figure 06 : Régénération de la vit E par l'acide ascorbique	14
Figure 07 : Principaux caroténoïdes à pouvoir antioxydant	15
Figure 08 : Principaux systèmes enzymatiques antioxydants et leurs cofacteurs métalliques	16
Figure 09 : Principaux acides, esters et alcools phénoliques d'origine végétale	17
Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes	18
Figure 11 : Piégeage des ROS (X•) par un noyau catéchol	19
Figure 12 : Piégeage des ROS (X•) par un noyau catéchol	20
Figure 13 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes	21
Figure 14 : Réaction inflammatoire	22
Figure 15 : Etapes de l'inflammation aigue	24
Figure 16 : Médiateurs de l'inflammation	25
Figure 17 : Formation d'un exsudat	26
Figure 18 : Diapédèse	27
Figure 19 : Production et effets des dérivés de l'acide arachidonique	29
Figure 20 : Mécanismes d'action proposés des flavonoïdes sur la réaction inflammatoire	34
Figure 21 : Sites de récolte de <i>Limoniastrum guyonianum</i>	35
Figure 22 : Détermination de la teneur en substances extractibles des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	38
Figure 23 : Procédé d'obtention de l'extrait aqueux à partir des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	41

Figure 24 : Protocole expérimental de mesure de l'effet hémolytique	49
Figure 25 : Protocole expérimental de l'étude de l'effet hématopréventif de l'extrait vis-à-vis le nickel	54
Figure 26 : Protocole expérimental de la mesure de l'activité thrombolytique	60
Figure 27 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de de <i>L. guyonianum</i> obtenu sur un chromatographe HPLC équipé d'un détecteur LC-MS 6210 TOF et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100 mm, 3.5 µm)	74
Figure 28 : Evolution du poids corporel des souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> aux doses 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc après 14 jours de traitement	80
Figure 29 : Comparaison du gain de poids au dernier jour avant sacrifice (J14) entre souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (1000, 2000 et 5000 mg/kg pc). Chaque valeur représente la moyenne (n=10) ± SEM.	80
Figure 32 : Photomicrographies de sections de tissus rénales (H&E 100x) des souris témoins (A) et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	89
Figure 33 : Effet hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> mesuré par la libération d'Hb	91
Figure 34 : Effet hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> mesuré par comptage cellulaire (Hc).	93
Figure 35 : Evolution des pourcentages d'hémolyse mesurés par spectrophotométrie (H _{Hb}) et par comptage cellulaire (Hc)	93
Figure 36 : Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> et du BHT vis-à-vis du radical DPPH	95
Figure 37 : Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> et du BHT vis à vis du radical ABTS	97
Figure 38 : Cinétique d'inhibition du blanchissement de β-carotène par l'extrait de <i>L. guyonianum</i> et de l'antioxydant de référence BHT	98
Figure 39 : Activité antioxydante relative de l'extrait aqueux de <i>L. guyonianum</i> et du BHT dans le système acide linoléique/β-carotène après 24 heures	99
Figure 40 : Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de <i>L. guyonianum</i> et du BHT	99

Figure 41 : Pouvoir chélateur de l'extrait aqueux de <i>L. guyonianum</i> et du l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux	101
Figure 42 : Variation des taux des globules rouges (GR) et blancs (GB), d'hémoglobine (Hb) et d'hématocrites (Ht) et de plaquettes (Plt) et du volume globulaire moyen (VGM), chez les souris témoins (groupe 1) et les groupes traités	104
Figure 43 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du diclofenac (5 mg/kg pc) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat	105
Figure 44 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kgpc) et du diclofenac (5 mg/kg pc) sur l'œdème 4 heures après l'injection de la carragénine	106
Figure 45 : Effet inhibiteur de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (0.5, 1 et mg/oreille) et de l'indométacine (IND) sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.	108
Figure 46 : Effet analgésique périphérique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (100 mg/kg pc) vis à vis de la douleur induite par l'acide acétique chez les rats	110
Figure 48 : Effet analgésique central de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kg pc) et de la morphine (5mg/kg pc) sur le temps de latence du retrait de la queue chez la souris	113
Figure 49 : Comparaison de l'activité analgésique centrale de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kg pc) et de la morphine (5mg/kg pc) après 45 min de traitement chez la souris	114
Figure 50 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> sur l'évolution des températures rectales des rats après induction de l'hyperthermie	115
Figure 51 : Effet antipyrétique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	116
Figure 52 : Pouvoir thrombolytique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	118
Figure 53 : Effet du temps d'incubation sur la capacité de thrombolyse de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	119
Figure 54 : CMI de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> vis à vis des bactéries testées	122

Liste des tableaux

Tableau 01 : Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats	46
Tableau 02 : Souches bactériennes testées	63
Tableau 03 : Echelle de sensibilité des germes	62
Tableau 04 : Teneurs en cendres de <i>L. guyonianum</i>	65
Tableau 05 : Rendement en extractibles des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	65
Tableau 06 : Résultats des tests phytochimiques	68
Tableau 07 : Proportions et structures chimiques des composés phénoliques identifiés de l'extrait aqueux de <i>L. guyonianum</i>	76
Tableau 08 : Principaux métabolites secondaires isolées de quelques espèces des genres <i>Limoniastrum</i> et <i>Limonium</i>	78
Tableau 09 : Variation des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> aux doses 1000, 2000, 5000 mg/kg pc après 14 jours de traitement.	83
Tableau 10 : Résultats du test DPPH de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L.guyonianum</i> Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3)	94
Tableau 11 : IC50 de quelques espèces du genre <i>Limoniastrum</i>	96
Tableau 12 : Effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (5, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (100 mg/kg pc) sur les contractions abdominales induites chez les rats par l'injection de l'acide acétique	109
Tableau 13 : Action antinociceptive périphérique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (50 mg/kg pc) mesurée par l'algésimètre	112
Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité thrombolytique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i> en présence d'un contrôle négatif (H ₂ O) et un autre positif (streptokinase)	117
Tableau 15 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par l'extrait aqueux des feuilles de <i>L. guyonianum</i>	121

Introduction

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. De nos jours entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée végétale et le quart renferme des extraits de plantes ou des molécules actives provenant directement des plantes (Newman et Cragg, 2016). Or sur ce grand nombre, 2000 à 3000 plantes seulement ont fait l'objet d'études scientifiques, chimiques ou pharmacologiques.

Avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issues de la synthèse chimique, l'intérêt pour les substances naturelles est de plus en plus croissant. En effet, ces dernières années, un intérêt particulier est donné aux halophytes en tant que réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées et qui peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments (Buhmann et Papenbrock, 2013).

Dans les plantes, la synthèse des polyphénols et des flavonoïdes est une forme d'adaptation. L'importance des polyphénols végétaux pour la santé humaine est aujourd'hui bien admise pour leur caractère antioxydant. Ces composés présentent un large éventail de propriétés médicinales. A la fois des données expérimentales et épidémiologiques suggèrent fortement leurs rôles dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardiovasculaire, ostéoporose ou maladies neurodégénératives.

Les halophytes vivaces sont capables de coloniser des régions présentant des caractéristiques climatiques extrêmes et des caractéristiques du sol telles que la salinité, la sécheresse et la contamination des métaux lourds (Kavitha et *al.*, 2010). En général, 2500 à 3000 espèces d'halophytes se trouvent dans le monde, dont près de 700 espèces sont distribuées dans la zone climatique méditerranéenne (Choukr-Allah, 1991).

Le stress salin et les conditions climatiques extrêmes (sécheresse, chaleur, salinité...etc.) provoquent la surproduction d'espèces réactives d'oxygène (ROS) au niveau des chloroplastes causant l'oxydation des lipides, la dégradation des protéines, l'inactivation des enzymes et la perméabilité des membranes (Chinnusamy et *al.*, 2005).

Des travaux très récents ont montré que les halophytes peuvent servir de sources potentielles d'antioxydants naturels, d'où leur utilisation traditionnelle comme plantes à intérêts médicinales et alimentaires. D'autres études se sont consacrées à la recherche et la caractérisation de leurs molécules bioactives qui présentent un intérêt médicinal prometteur.

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une plante halophyte du chott Hodna *Limoniastrum guyonianum* (plumbaginaceae) en tant que nouvelle source de métabolites secondaires bioactifs afin de contribuer à répondre aux demandes en matière d'alternatives thérapeutiques. Rappelons qu'en Algérie cette plante n'a pas fait l'objet d'un travail de recherche tant sur le plan phytochimique que pharmacologique.

Cette thèse est structurée en 3 parties, la 1^{ère} est consacrée à l'étude bibliographique nécessaire pour comprendre, discuter et interpréter les résultats obtenus. La 2^{ème} partie englobe les travaux personnels avec les méthodes appliquées, leurs principes, matériels, produits chimiques et réactifs utilisés. La dernière partie présente l'ensemble des résultats obtenus avec les interprétations nécessaires.

Notre travail expérimental s'articule autour de 3 volets principaux. Une analyse phytochimique des feuilles afin de permettre une identification qualitative des différentes familles de composés présentes ayant un intérêt pharmacologique. Le dosage des différents composés phénoliques a été réalisé sur l'extrait aqueux. Ces derniers ont été identifiés, caractérisés et quantifiés par HPLC-TOF/MS. Parallèlement et afin de garantir l'innocuité de l'extrait aqueux de *L. guyonianum*, l'étude de sa toxicité aiguë par voie orale et sa cytotoxicité sur des hématies humaines ont été réalisées. Enfin, un criblage pharmacologique de l'extrait a été étudié à large spectre et qui a pour but de déterminer et d'évaluer aussi bien *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* les activités antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, thrombolytique et antibactérienne.

Ce travail de thèse est achevé par une conclusion générale qui récapitule les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives de sa continuité.

Revue
Bibliographique

Limoniastrum guyonianum

I.1. Introduction

Notre plante appartient à la famille des Plumbaginaceae, une famille cosmopolite (Kubitzki, 1993) constituée de 775 espèces regroupées en 24 genres. Cette famille est subdivisée en deux sous familles : la Plumbaginoideae et la Staticoideae et comprend des herbacées ou des arbustes et même des lianes (Dolores Liedo et *al.*, 2005). Ces espèces se développent dans différents milieux tel que les milieux salins et dans les régions froides et tropicales (Watson et Dallwitz, 1992) et dans plusieurs régions du monde mais elles sont essentiellement localisées dans la méditerranée et en Asie (Dolores Liedo et *al.*, 2005).

En Algérie, les Plumbaginaceae sont représentées par 33 espèces appartenant à 4 genres. La majorité d'entre-elles appartiennent au genre *Limonium* Tourn représenté par 23 espèces et 3 autres genres à savoir : *Arméria* Willd avec 6 espèces, *Limoniastrum* Moench avec 3 espèces et *Plumbago* Tourn avec 1 espèce (Quezel et Santa, 1963).

Selon Quezel et Santa (1963), les plumbaginacées sont des plantes ligneuses à la base, ou sous arbrisseau glabre ramifié. Feuilles ovales lancéolées plus ou moins amplexicaules, parsemées en dessous de petites concrétions calcaires. Fleurs en épis courts et denses, violettes ou bleu-violacées ; large de 1 cm, de symétrie 5. Calice glanduleux, tubuleux à 5 lobes courts. Corolle infundibuliforme et capsule à graines. La classification botanique classique place les plumbaginacées qui font partie des dicotylédones dans l'ordre des plumbaginales (Cronquist, 1988).

I.2. Description Botanique et nomenclature vernaculaire

Limoniastrum guyonianum est un arbuste élevé de 50-100 cm, grisâtre à tiges très rameuses. Les feuilles sont allongées et étroites, vert-gris, coriaces, à incrustations calcaires ; corolles purpurines ; bractée interne à bords membraneux et dépassant nettement la bractée externe. (Ozenda, 2004). Les fleurs rose pourpre, à base entourée de bractées engainantes non épineuses et vert-glauque comme les feuilles ; en si grand nombre, au point qu'elles couvrent entièrement la plante (figure 01). Cette plante vivace porte de très nombreuses galles.

L. guyonianum est une espèce endémique du Sahara septentrional (Algérie, Tunisie) ; plus rare au sahara occidental et central, atteint le Tademaït et le Fezzan au sud ; manque dans le sud marocain (Ozenda, 2004). Elle se rencontre en grande abondance dans les terrains salés des sebkhas et des chotts et dans le sahara (Chaieb et Boukhris, 1998).



Figure 01 : Aspects morphologiques de *Limoniastrum guyonianum* (www.sahara-nature.com).

En Algérie, le nom vernaculaire de *Limoniastrum guyonianum* varie selon les régions, dans certaines régions elle est dénommée "Zeïta", et dans d'autres "Zita". Ce nom lui est attribué parce qu'elle est capable de dégager à la surface de ses feuilles une légère substance huileuse. Dans d'autres régions elle est appelée "Hanet al-ibel" (Ziani et al., 2015). Dans le Sud-Est du Maroc elle est connue sous le nom de "Tirremt" ou encore "Zeyata" (El Rhaffari et Zaid, 2002). En Libye, elle est appelée "Alzaia" (Mohammed et al., 2013).

I.3. Utilisation de *Limoniastrum guyonianum*

L'utilisation par les populations autochtones en médecine traditionnelle de végétaux a de tout temps apporté des renseignements fondamentaux à la découverte de molécules bioactives. *Limoniastrum guyonianum* n'est pas assez représentée dans la pharmacopée traditionnelle. On peut tout de même citer quelques exemples d'applications aux vertus reconnues.

Chaieb et boukhris (1998) ont rapporté que les feuilles et les galles en infusion sont utilisées en médecine traditionnelle, dans le Sud de Tunisie, comme anti-dysentériques contre les maladies infectieuses bactériennes (bronchites) ou parasitaires qui causent des diarrhées douloureuses et sanglantes. Sous forme de décoction, les feuilles et les galles sont également

utilisées par la population de Tafilalet (Sud-Est du Maroc) pour le traitement des diarrhées (El Rhaffari et Zaid, 2002).

Plus récemment, Adouane (2016) affirment que dans la région méridionale des Aurès la partie aérienne de la plante en décoction est utilisée contre la bronchite et l'inflammation de la gorge. De même, à Marrakech et dans plusieurs de ses régions limitrophes *L. guyonianum* est utilisée pour traiter certaines infections orales (Ouarghidi et al., 2013). Dans la région de Ouargla, l'enquête ethnobotanique menée par Hadjadj et al. (2015) a montré que la plante est utilisée soit seule ou en association avec d'autres plantes en décoction ou en poudre pour traiter diverses pathologies telles que les maladies de la peau, métaboliques et respiratoires. A titre d'exemple, *L. guyonianum* avec *Punica granatum* (reman) est employée pour guérir les maladies de la peau. Les racines en décoction sont utilisées comme dépuratif (Fintelmann et Weiss, 2004 ; Chehma et Djebbar, 2008). Les tanins des galles ont des propriétés toniques associés au Henné (Chaumont et Millet-Clerc, 2011) et ils sont également utilisés pour le tannage des cuirs (Fintelmann et Weiss, 2004).

Sur le plan écologique, *L. guyonianum*, et les espèces du genre *Limoniastrum*, jouent un rôle de stabilisation des dunes côtières. C'est une plante de pâturage en milieu dunaire fortement appréciée par les chameaux (Chehma et al., 2005 ; Laudadio et al., 2009). De plus, les galles constituent une niche écologique d'un grand nombre d'insectes tels que les Lepidoptera et les Hymenoptera (Nieukerken, 2007).

I.4. Activités pharmacologiques

Une revue bibliographique nous a permis de relever les activités pharmacologiques des différentes molécules bioactives de *L. guyonianum*. Certaines de ces activités sont en corrélation avec quelques usages de la plante en médecine traditionnelle. Plusieurs études ont été menées sur les différents organes de la plante (partie aérienne, feuilles, galles et racines) qui représentent une source importante de principes bio-actifs ayant des propriétés thérapeutiques. Ces principes actifs sont dans la plupart des cas des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des acides phénoliques. Ces études ont démontré des activités antioxydante, antimicrobienne, immunomodulatrice, antimutagène, antiproliférative, pro-apoptotique et anticancéreuse. L'extrait aqueux des galles est l'un des extraits les plus étudiés. L'intérêt pour cet extrait est principalement attribuable à ses propriétés immunomodulatrices et antiprolifératives se traduisant par différents effets thérapeutiques.

I.4.1. Propriétés antioxydantes

Le rôle des radicaux libres et des ROS dans la genèse de nombreuses maladies a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (Halliwell et Cross, 1994). Différents travaux ont démontré que le stress oxydatif est impliqué dans la pathogénèse de nombreuses maladies chroniques non transmissibles tels que le diabète (Baynes, 1991), le cancer (Valko et *al.*, 2007), les maladies neuro-dégénératives (Kadenbach et *al.*, 2009) et les maladies cardiovasculaires (Mladenka et *al.*, 2010). Un grand nombre de travaux se sont intéressés aux antioxydants naturels. Dans ce contexte, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des halophytes en tant que sources d'antioxydants, particulièrement les polyphénols (Falleh et *al.*, 2009 ; Ksouri et *al.*, 2009 ; Ksouri et *al.*, 2012).

D'après notre recherche bibliographique, la première étude réalisée sur *L. guyonianum* est celle de Trabelsi et al. (2012) qui a évalué le potentiel antioxydant de plusieurs extraits et fractions de polarité différente. Pour cela le test de DPPH, le FRAP et la méthode de mesure de l'activité antioxydante totale ont été appliquées. Un pouvoir antioxydant remarquable a été révélé et qui pourrait être lié à la présence des 3 flavonoïdes isolés : la gallocatéchine, l'épigallocatéchine et l'épigallocatéchine-3-O-gallate. D'autres composés phénoliques à grand pouvoir antioxydant ont été isolés tels que la catéchine et des dérivés d'acides phénoliques notamment l'épigallocatéchine-3-O-gallate et les amides d'acides phénoliques (N-E-caffeoyl tyramine et Limoniastramide). Ces derniers sont identifiés pour la première fois dans cette espèce halophyte (Trabelsi et *al.*, 2013a).

Dans une autre étude complémentaire à la précédente Trabelsi et al. (2014) ont isolé un nouveau dimère de l'amide d'acide phénolique, avec deux monomères naturels N-E-caffeoyl tyramine et N-E-feruloyl tyramine. En utilisant différents modèles *in vitro*, cette équipe a pu démontrer que ces composés possédaient une forte activité antioxydante qui peut être valorisée en industries pharmaceutique et alimentaire. L'extrait hydrométhanolique s'est montré comme antioxydant sur différents modèles *in vitro* et plus particulièrement avec le test de chélation (Debouba et *al.*, 2013). Une autre étude effectuée par Krifa et al. (2013a) a prouvé le potentiel antioxydant de l'extrait aqueux des galles de *L. guyonianum* par voie enzymatique (xanthine/xanthine oxydase) et par un modèle non enzymatique (DPPH).

I.4.2. Activité antibactérienne

La bibliographie fait ressortir 4 travaux au moins, portant sur l'étude du potentiel antimicrobien de différents organes de *L. guyonianum*. Trabelsi et al. (2013b) ont étudié le potentiel antimicrobien de 10 différentes fractions de *L. guyonianum*, sur des bactéries Gram⁺ *S aureus*, *E feacalis* et bactéries Gram⁻ : *E coli*, *S typhi* et *P aeruginosa*. Toutes les fractions ont montré un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram⁺ et Gram⁻, mais cet effet varie en fonction de la fraction et de la bactérie testée. Plus récemment, Belfar et al. (2016) ont montré que l'extrait par l'acide acétique à partir de *L. guyonianum* inhibait la croissance de *S aureus*, *E coli*, et *P aeruginosa*.

Les huiles essentielles des feuilles, des fleurs, des graines et des racines de *L. guyonianum* ont également été testées pour leur pouvoir antibactérien contre 5 bactéries : *E coli*, *P aeruginosa*, *S epidermidis*, *S aureus* et *M luteus*. Ainsi, ces huiles essentielles ont empêché la croissance de toutes les bactéries testées avec une CMI de 0.02 mg.ml⁻¹ (Hammami et al., 2011). Une autre étude de Bouzidi et al. (2016) a permis de tester différents extraits de la partie aérienne de *L. guyonianum* contre plusieurs bactéries pathogènes humaines. Les extraits méthanoliques, chloroformiques et d'éther de pétrole se sont révélés être les plus puissants contre *P aeruginosa* et *S aureus*.

I.4.3. Activité immunomodulatrice

Un seul travail est rapporté dans la bibliographie sur les effets immunomodulateurs de *L. guyonianum* est celui de Krifa et al. (2013a) qui ont étudié *in vitro*, l'effet de l'extrait aqueux des galles de cette plante. Ils ont essayé d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette action immunomodulatrice. Les résultats obtenus montrent que cette activité pourrait être attribuée, en partie, à son effet cytoprotecteur *via* son pouvoir antioxydant exercé par certains de ses composants tels que les flavonoïdes qui devraient être potentiellement utilisés pour moduler les fonctions des cellules physiologiques (immunitaires) et pathologiques.

Dans un premier temps, il a été démontré que l'extrait pouvait augmenter l'activité enzymatique lysosomale et la production d'oxyde de nitrite dans les macrophages péritonéaux murins, ce qui suggère un rôle potentiel dans l'activation de ces cellules et par conséquent l'induction de l'activité phagocytaire. De plus, l'extrait améliorait de façon significative l'activité de destruction des cellules NK isolées, mais il avait des effets négligeables sur la

prolifération des cellules spléniques T. Par contre, une forte stimulation de la production des lymphocytes B a également été observée.

I.4.4. Activité antiproliférative

L'activité antiproliférative décrite dans cette partie correspond à l'inhibition de la croissance cellulaire de cellules tumorales et/ou cancéreuses. Les effets anticarcinogènes de *L. guyonianum* ont été bien documentés. Poussés par leurs résultats très intéressants obtenus lors de l'étude de l'activité immunodulatrice (Krifa et al., 2013a), Krifa et al. (2013b, 2013c, 2014a, 2014b) se sont penchés sur l'étude des propriétés antimutagènes, antitumorales, et apoptotiques de l'extrait aqueux des galles *L. guyonianum*.

Les tests rapides de mutagénéicité STTs (Short-Term Test) utilisent plus communément des bactéries pour les études de mutagénèse pour leur cout de revient, la simplicité et la rapidité (Cabrera, 2000). Ces tests sont utilisés à la fois pour détecter les mutagènes et leur effet carcinogène et pour déterminer les antimutagènes et leur potentiel anticancérogène. Parmi les tests les plus utilisés, le test Ames qui consiste à utiliser différentes souches mutantes de *Salmonelle* ssp. (McCann et Ames, 1976). Au terme de la 1^{ère} étude menée par Krifa et al. (2013b), il ressort que l'extrait a montré un faible potentiel antimutagène contre l'azide de sodium en présence de *S. typhimurium* TA100 et de *S. typhimurium* TA1538, alors qu'en présence de *S. typhimurium* TA104 un pourcentage d'inhibition significatif (76.39 %) de méthylsulfonate de méthyle a été obtenu. L'antimutagénicité contre l'aflatoxine B1 (70.63 %), la 4-nitro-o-phénylène-diamine (99.3 %) et la 2-aminoanthracène (63.37 %) a été également significative en présence respectivement de *S. typhimurium* TA100, *S. typhimurium* TA1538 et *S. typhimurium* TA104 à une concentration de 250 µg/plaque.

En outre, l'extrait a exprimé une importante activité apoptotique dans les cellules cancéreuses du cerveau HeLa par une down-regulation de l'expression de l'anti-apoptotique UHRF1 et son partenaire principal DNMT1. L'extrait de *L. guyonianum* inhibe la prolifération cellulaire dans le temps et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, de manière dose dépendante. Cette induction de la mort programmée est confirmée par la présence de cellules hypodiploïdes au stade G0/G1. Ces effets sont associés à une up-régulation de l'expression du gène suppresseur de tumeur p16INK4A et une down-régulation de l'expression de l'anti-apoptotique UHRF1 et DNMT1. De plus, la down-régulation UHRF1 et DNMT1 induite par l'extrait est accompagnée d'une hypométhylation globale de l'ADN dans la lignée cellulaire HeLa (Krifa et al., 2013c).

L'activité anticancéreuse (antiproliférative et pro-apoptotique) du même extrait a été également étudiée sur la lignée cellulaire humaine du cancer colorectal (BE). Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux des galles inhibe significativement la prolifération de cellules BE en induisant un effet apoptotique. Cet effet est engendré par un blocage de la progression du cycle cellulaire en phase G2/M, tandis que l'effet apoptotique serait dû à l'induction de facteurs de transcription impliqués dans l'apoptose. Les auteurs ont corrélé l'activité anticancéreuse et apoptotique de l'extrait aqueux des galles à la présence de tanins et de polyphénols condensés tels que l'épicatéchine et l'epigallocatechine gallate (Krifa *et al.*, 2014a).

Dans une autre étude, Krifa *et al.* (2014b) ont évalué le potentiel antitumoral *in vitro* et *in vivo* de l'extrait aqueux des galles tout en élucidant les mécanismes immunologiques impliqués sur la croissance des tumeurs transplantées chez des souris. Les effets de l'extrait sur la croissance tumorale, la prolifération des splénocytes, l'activité des cellules NK et l'activité splénocytes CTL isolées de la souris ont été étudiés. L'extrait a montré une activité antiproliférative intéressante sur la lignée de cellules tumorales de souris B16F10 associée à des changements apoptotiques caractéristiques dans ces cellules, comme la condensation nucléaire. De plus, l'extrait inhibait la synthèse de la mélanine et l'activité tyrosinase des cellules du mélanome d'une manière concentration-dépendante. L'extrait aqueux a non seulement inhibé de manière significative la croissance de la tumeur transplantée, mais il a également augmenté de manière remarquable la prolifération des splénocytes et les activités des cellules NK et CTL chez les souris porteuses de tumeurs. L'extrait a également amplifié l'activité lysosomale des macrophages hôtes et a amélioré l'activité anti-oxydante cellulaire dans plusieurs types cellulaires chez la souris. Cette étude a montré que l'activité antitumorale de l'extrait est fortement corrélée à ses propriétés immunomodulatrices et antioxydantes.

Plus récemment, l'étude de Ziani *et al.* (2015) a montré que la croissance de diverses lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF-7), du poumon (NCI-H460), du cerveau (HeLa) et du foie (HepG 2) a été inhibée par l'infusé des feuilles de *L. guyonianum*. Cet infusé s'est avéré le plus efficace avec celui d'*Asteriscus graveolens* parmi ceux des 12 espèces médicinales utilisées et qui ont été collectées de plusieurs régions arides et semi-arides d'Algérie.

II. Stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) et les systèmes de défense antioxydante de l'organisme en faveur du premier. Il peut avoir diverses origines endogènes (allergie) et exogènes (infection).

II.1. Radicaux libres

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme *via* la formation de radicaux libres et de ROS. Les organismes aérobies sont dotés de systèmes métabolisant l'oxygène, qui par sa nature bi-radicalaire, permet des réarrangements électroniques sur son orbite externe le rendant très réactif et par conséquent toxique. Cet oxygène moléculaire est transformé, essentiellement par voie enzymatique, en ROS (figure 02). Ces ROS peuvent être aussi formés (voies non-enzymatiques) au cours de l'autoxydation des catécholamines, des quinones et des flavines sous l'effet de facteurs environnementaux (Halliwell, 1999).

Les ROS regroupent des dérivés radicalaires qui sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et d'autres non radicalaires mais très toxiques ne possédant pas d'électron célibataire comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxy-nitrite ($ONOO^{\bullet-}$). Lorsque le taux des ROS dépasse ses valeurs normales, ils provoquent l'altération oxydative des protéines, des lipides et des acides nucléiques, ainsi que la modulation de l'expression des gènes et de la réponse inflammatoire (figure 02).

Ces altérations sont liées à de nombreuses pathologies de plus en plus courantes chez l'homme telles que les maladies cardio-vasculaires (Sachidanandame et *al.*, 2005), inflammatoires (Bodamyali et *al.*, 2000), certaines formes de cancers (Kawanishi et *al.*, 2002), diabète et autres. *In vivo*, plusieurs systèmes biochimiques sont à l'origine de la production accrue des ROS, citons :

- i) L'altération de la chaîne de transport des électrons où l'oxygène moléculaire subit une réduction mono-électronique qui conduit à la formation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ qui est le précurseur du radical hydroxyle beaucoup plus réactif.
- ii) Activation de certaines enzymes au cours du métabolisme des purines (xanthine oxydase) et des lipides (lipoxigénases et cyloxygénases).

iii) Stimulation des globules blancs sous l'action d'agents infectieux (virus et bactéries) et activation des enzymes impliquées dans la défense antimicrobienne (NADPH oxydase, chloroxydase... etc.) lors de l'élimination des xénobiotiques.

iv) Libération d'ions de fer à partir de leurs protéines de transport ou de stockage ou encore l'oxydation de l'hémoglobine par l' O_2 .

v) Autoxydation de neuromédiateurs (dopamine) et des thiols.

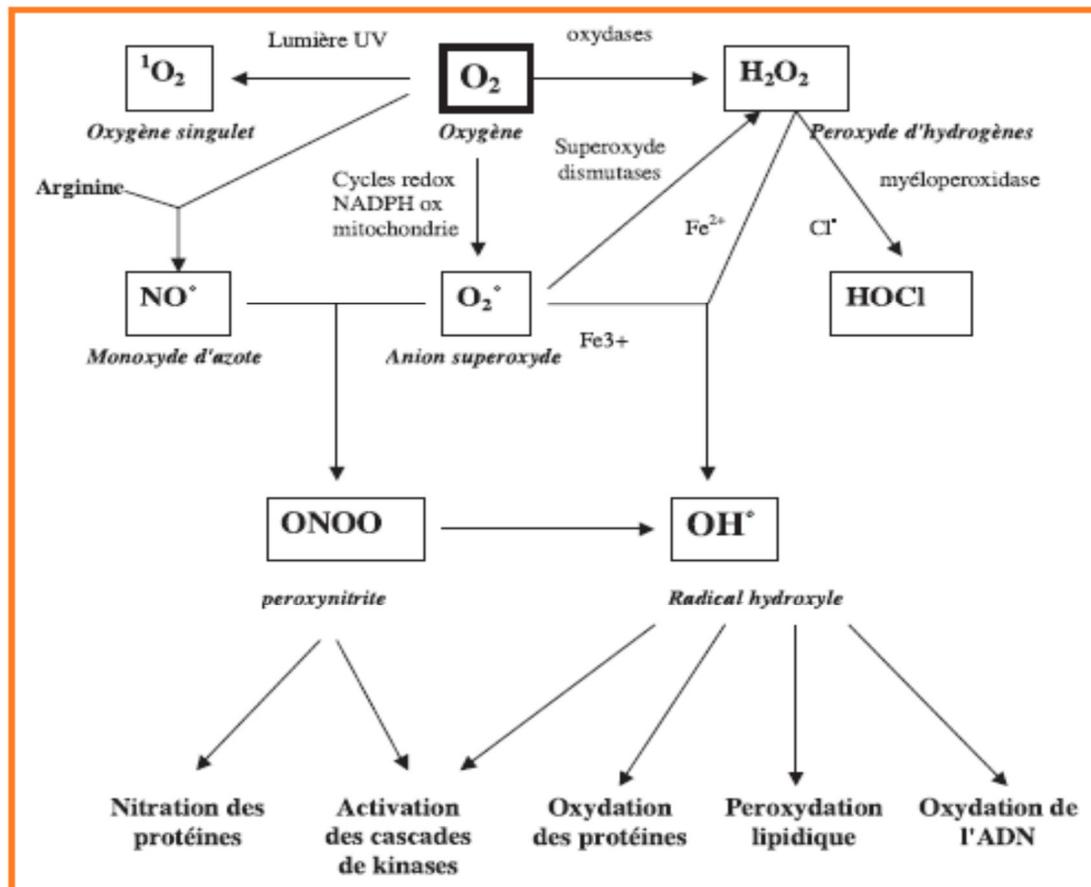


Figure 02 : Origine des différents espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

II.2. Antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables, à faibles concentrations, de retarder ou d'inhiber l'oxydation de substrats (Halliwell, 1999). Pour contrer les effets délétères des radicaux et des oxydants en général, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (figure 03). Parmi eux, les systèmes enzymatiques (figure 04), représentés surtout par les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathions peroxydases, ainsi que les systèmes thiorédoxines, qui sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des ROS.

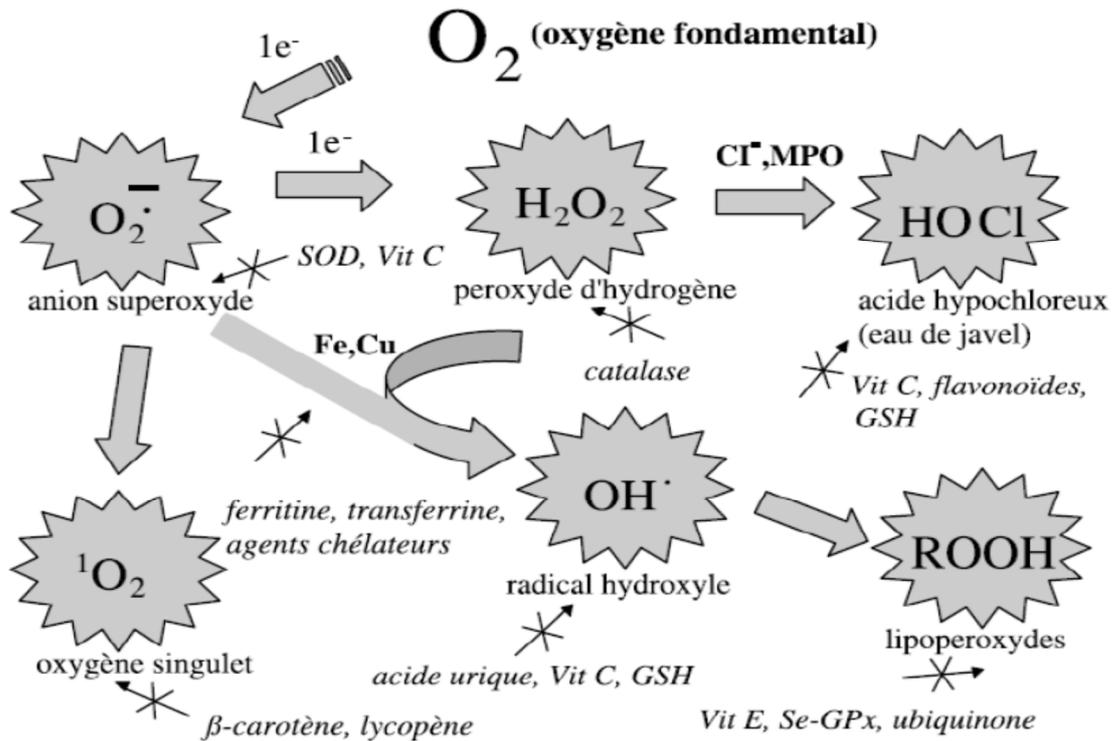


Figure 03 : Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants régulateurs de leur production (Milbury et Richer, 2008).

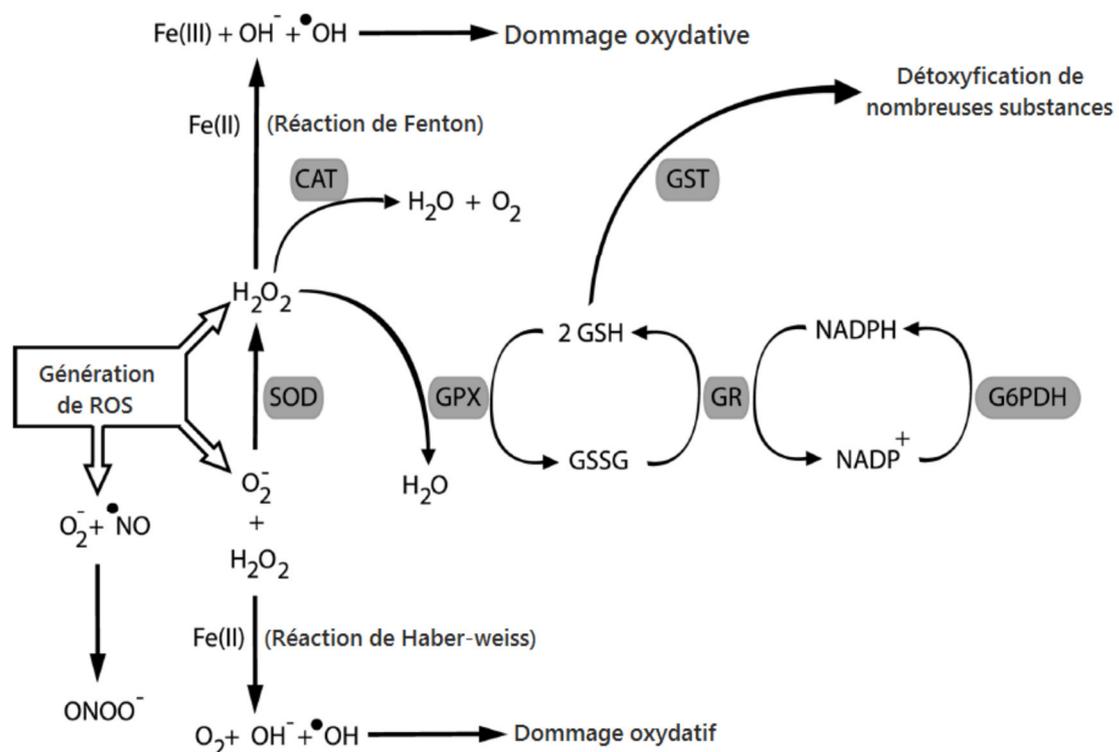


Figure 04 : Principales enzymes antioxydantes. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), la glutathion S-transférase (GST), le glutathion sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG (Hermes-Lima, 2005).

Le système non enzymatique renferme de nombreuses substances endogènes de faible poids moléculaire notamment le glutathion, l'acide urique, la bilirubine (Pincemail et *al.*, 2002), la mélanine, la mélatonine (Reiter, 2003), l'acide lipoïque (Favier, 2003), les hormones sexuelles oestrogéniques et le coenzyme Q10 (Laguerre et *al.*, 2007). On distingue également des antioxydants exogènes d'origine végétale représentés principalement par les composés phénoliques mono- ou poly-hydroxylés, les flavonoïdes, la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocopherol) et les caroténoïdes (β -carotène, lycopène, ...etc.). A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes. L'importance de ces antioxydants exogènes, principalement apportés par l'alimentation, dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant est de plus en plus évidente.

Les antioxydants peuvent désactiver les ROS par 2 réactions principales, transfert d'électron et transfert d'hydrogène. Il faut noter, que ces 2 réactions peuvent se produire en parallèle, et qu'elles sont parfois difficiles à distinguer (Prior et *al.*, 2005).

Certains antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C ou les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation, agissent en piégeant les radicaux et en captant leur électron célibataire et en les transformant en molécules ou ions stables. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (scavenger ou chain breaking antioxidants) (Favier, 2003).

II.3. Antioxydants d'origine végétale

L'organisme utilise de nombreuses stratégies antioxydantes dont les antioxydants apportés par l'alimentation comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols.

II.3.1. Vitamine C

L'homme doit assurer un apport journalier en vit C d'environ 100 mg par une alimentation riche en fruits. L'acide ascorbique (AA) est une vitamine hydrosoluble présente dans tous les compartiments cellulaires et qui joue plusieurs rôles dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes. Un dérivé cyclique des hexoses, il possède (figure 05) une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui unit les carbones C1 et C4. Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique (DHA).

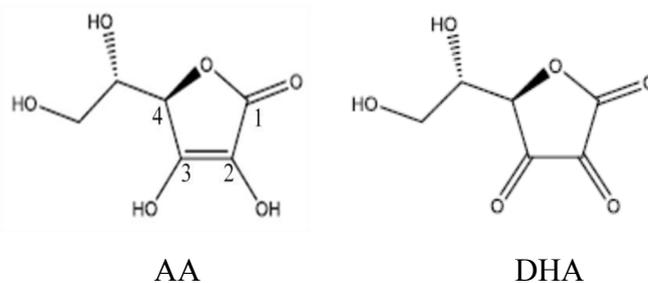


Figure 05 : La vitamine C et l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique est un piègeur très efficace de l'ensemble des ROS. En réagissant directement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, la vit C réduit ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN (Foyer et Noctor, 2005). Il permet de régénérer la vit E (figure 06) et les caroténoïdes permettant ainsi une meilleure efficacité de la peroxydase ascorbate (Nordberg et Amer, 2001). Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons.

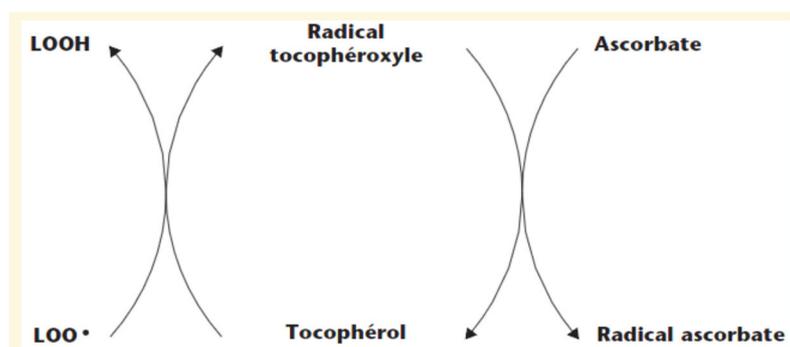


Figure 06 : Régénération de la vit E par l'acide ascorbique (Guilland, 2011).

L'acide ascorbique réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique :



Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxydes et les complexes Oxoferryles:



II.3.2. Vitamine E

La vitamine E, largement répandue dans le règne végétal, est l'antioxydant majeur des milieux lipidiques et du sang. Elle agit directement contre les radicaux libres (Tucker et Townsend, 2005) en piégeant l'oxygène singulet et le radical hydroxyle pour former le radical tocophéryle, mais peut aussi inhiber la peroxydation lipidique en stoppant la propagation

radicalaire (par réaction avec les radicaux peroxy ROO^{\bullet}). On pense que son action majeure est de protéger les structures sensibles à l'oxydation : les lipides (acides gras hautement insaturés essentiellement sous forme condensée dans les membranes et les lipoprotéines), les bases nucléotidiques de l'ADN et les protéines.

II.3.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont parmi les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une vingtaine d'entre eux ont été détectés dans les tissus humains (El-Agamey *et al.*, 2004). Ce sont des molécules liposolubles qui peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (β -carotène, lycopène...etc.) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...etc.) (figure 07)

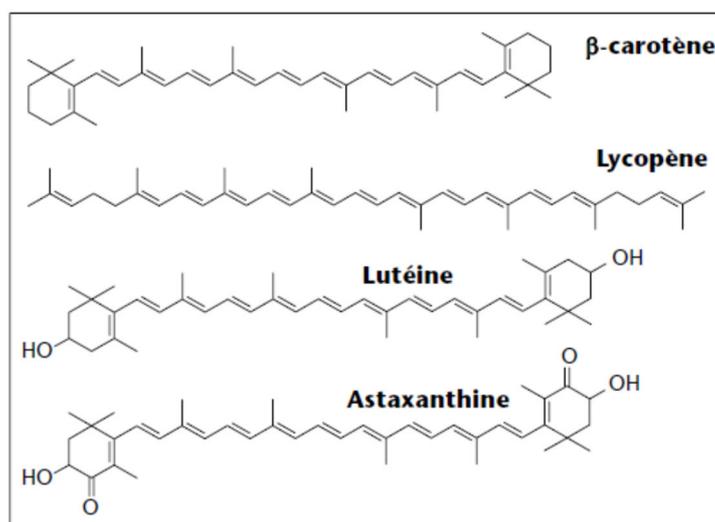


Figure 07 : Principaux caroténoïdes à pouvoir antioxydant (Laguerre *et al.*, 2007).

Les caroténoïdes sont parmi les molécules les plus efficaces pour piéger les radicaux libres et plus particulièrement l'oxygène singulet (El-Agamey *et al.*, 2004) ce qui leur permet de protéger les lipides membranaires. Ils exercent une activité antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, distincts bien que probablement complémentaires, soit par transfert d'électron ou d'hydrogène ou par liaison avec un radical. Ils peuvent régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2005).

II.3.4. Oligoéléments

Les oligoéléments font partie des antioxydants mais ne possèdent pas d'activité antioxydante proprement dite. Ils sont toutefois considérés comme tels puisqu'ils jouent le rôle de cofacteurs métalliques des enzymes antioxydantes (figure 08).

Le sélénium participe à la constitution et à la régulation de la GPx, enzyme qui participe à la destruction des peroxydes lipidiques. Le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD cytosolique, la cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de Fenton.

Le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD cytosolique. Il permet la protection des groupements thiols des protéines, l'induction de protéines antioxydantes, l'inhibition partielle de la formation des ROS les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation des ROS induites par les métaux de transition comme le fer ou le cuivre (Haleng et *al.*, 2007). De plus, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse cependant la catalase a besoin de fer.

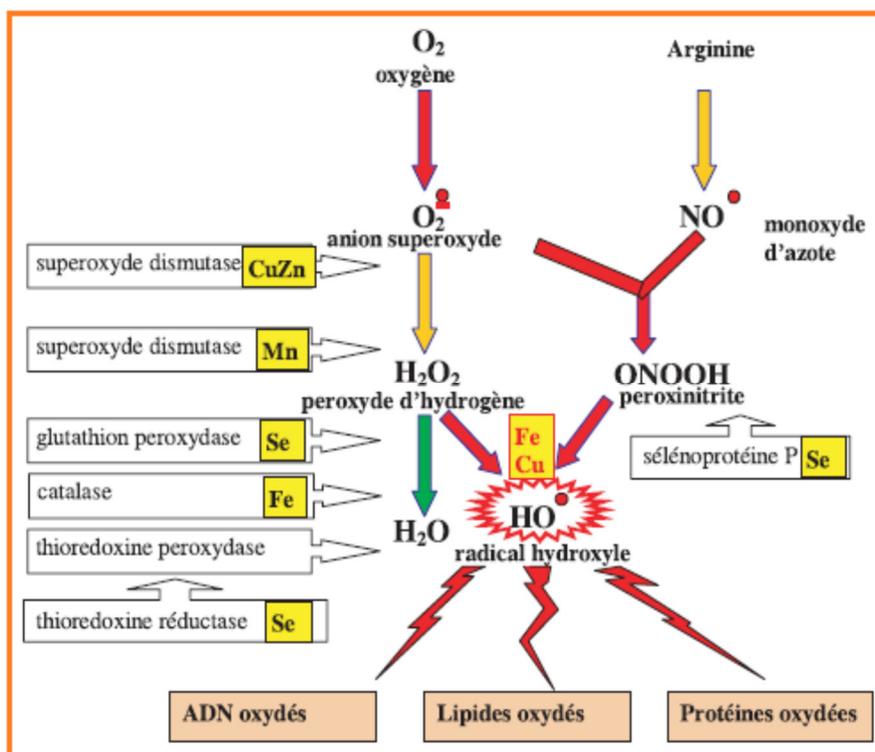


Figure 08 : Principaux systèmes enzymatiques antioxydants et leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

II.3.5. Polyphénols

Les polyphénols sont apportés par une alimentation d'origine végétale et présentent une grande diversité structurale avec plusieurs milliers de composés naturels identifiés (Ferrazzano et *al.*, 2011) réparties en plusieurs familles et classes différentes. Sur le plan structural, les composés phénoliques comportent un ou plusieurs cycles benzéniques, portant un ou plusieurs substituant hydroxyles, et vont de simples molécules phénoliques à des composés hautement polymérisés (Tsao, 2010). On peut citer les acides phénoliques, les esters phénoliques

principalement représentés par les acides chlorogéniques ou hydroxycinnamates, les alcools phénoliques, les secoiridoïdes, les stilbénoides, les diterpènes et les flavonoïdes. Deux groupes importants des polyphénols sont les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les acides phénoliques sont répartis en 2 classes, celles des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (figure 09).

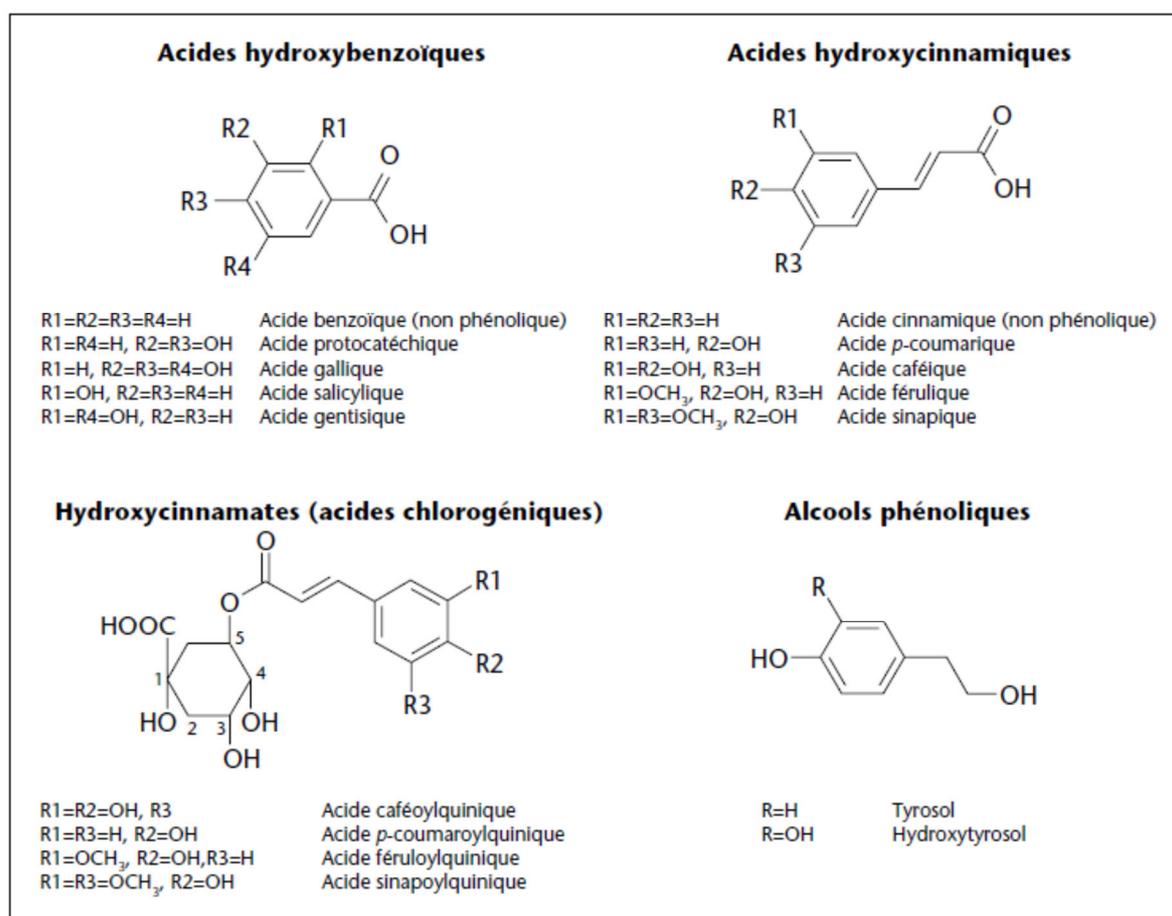


Figure 09 : Principaux acides, esters et alcools phénoliques d'origine végétale (Laguerre et *al.*, 2007).

Les flavonoïdes représentent la famille la plus importante des polyphénols avec plus de 10000 composés appartenant à plus de 10 classes dont les principales sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes (Agati et *al.*, 2012).

Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure de base à 15 atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6. Les classes diffèrent entre elles par la structure et le degré d'oxydation de l'hétérocycle central (cycle C), ainsi que par la nature de ses connexions avec les cycles A et B. A l'intérieur de chaque classe, les variations portent essentiellement sur le degré

d'hydroxylation (nombre et position) des différents cycles et le niveau de méthylation et de glycosylation des OH phénoliques (figure 10).

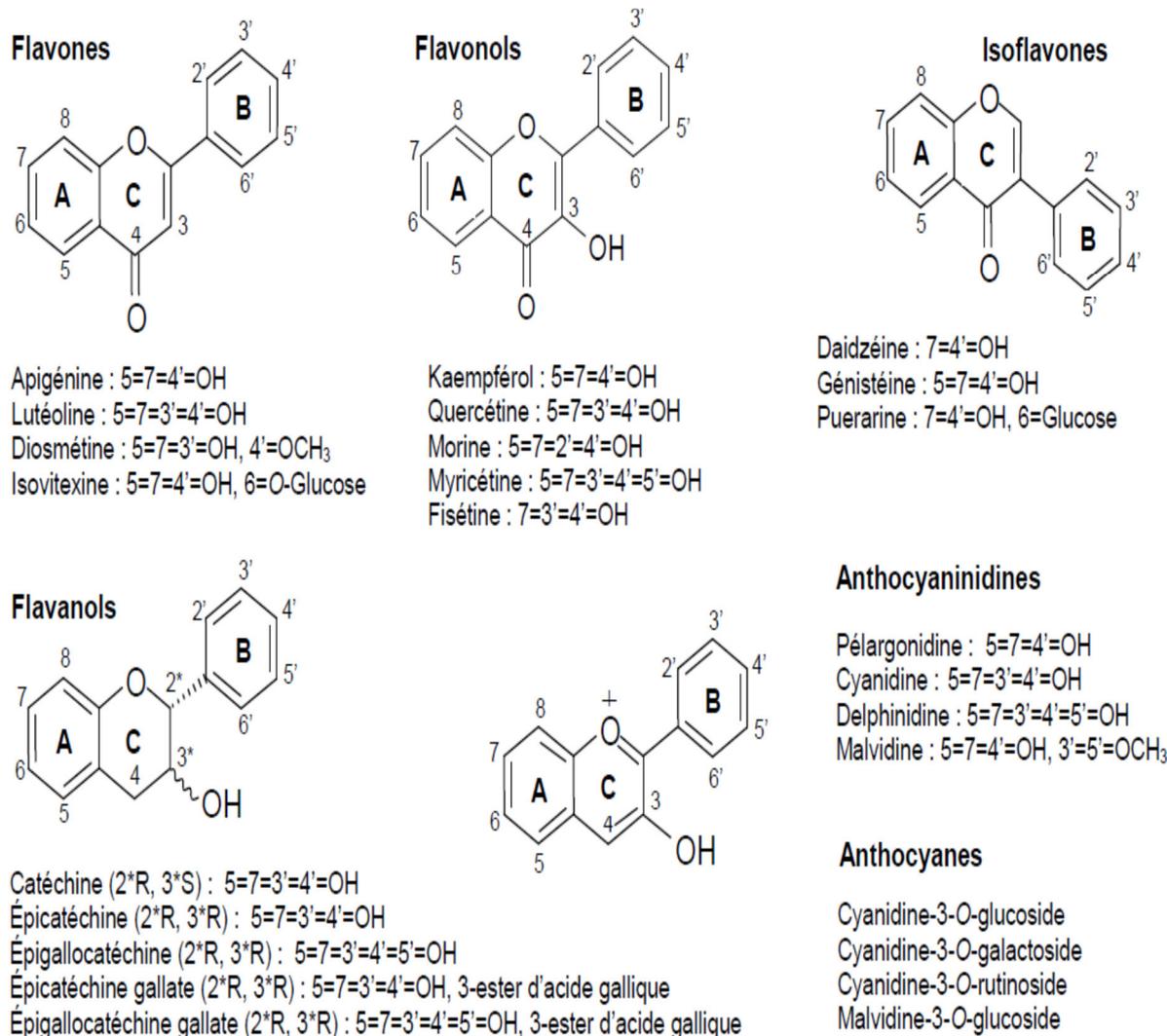


Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes (Laguerre et *al.*, 2007).

II.4. Modes d'action des polyphénols

D'après Halliwell (1994), les polyphénols exercent leur pouvoir antioxydant selon divers mécanismes dont les principaux sont : le piégeage direct des ROS, la chélation des ions métalliques initiateurs de la production des ROS et l'inhibition directe des enzymes impliquées dans le stress oxydant ou sur leur transcription.

II.4.1. Piégeage des radicaux libres

Les propriétés redox (faibles) des polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, leur permettent de réduire rapidement par transfert d'hydrogène les radicaux libres (Jovanovic

et *al.*, 1994) tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical peroxy (ROO^{\bullet}), le radical alkoxy (RO^{\bullet}) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$).

Ce pouvoir réducteur des flavonoïdes (figure 11) est dû à leur structure chimique aromatique qui permet une délocalisation électronique importante, stabilisant les formes radicalaires.



Le radical aryloxy ($Ar-O^{\bullet}$) formé peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.

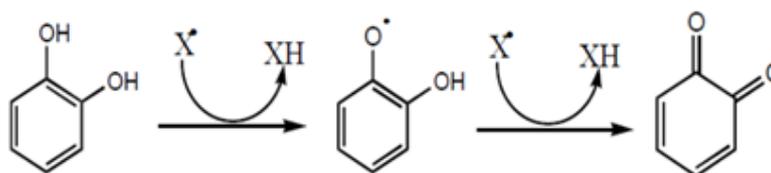


Figure 11 : Piégeage des ROS (X^{\bullet}) par un noyau catéchol.

L'emplacement des doubles liaisons ainsi que le nombre la position de certains groupements hydroxyles et la structure catéchol de l'anneau benzoïque (B) (Yamasaki et *al.*, 1997) déterminent de près leur capacité antioxydante. Les polyphénols (figure 10) avec un groupement diphénol en position ortho ou para comme les catéchines ont un potentiel d'oxydation plus faible, donc sont plus facilement oxydés, que ceux avec des diphénols en position méta ou des phénols seuls comme les flavones qui sont moins réactives (Kilmartin et *al.*, 2001). De plus, la méthylation ou la glycolysation de certains OH critiques atténue considérablement leur activité antioxydante (Fukumoto et Mazza, 2000).

La comparaison de la naringénine avec la naringoside montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue notablement l'activité. Des effets similaires sont observés quand la lutéoline est comparée avec son 3',7-diglucoside (figure 12). Par contre, les groupements en positions 3' et 4' (noyau catéchol) augmente leur pouvoir à réduire les ROS mais les rend plus susceptible à l'autoxydation. Pour ce qui est des acides phénoliques la présence du groupement cathécol (ortho-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) est le déterminant majeur de leur activité redox. De même, la position du groupement COOH en ortho ou para d'un groupement OH facilite la dissociation homolytique de ce dernier et augmente le pouvoir antioxydant intrinsèque. La présence de plusieurs unités de type acide phénolique peut concourir à renforcer l'activité antioxydante (Rice-Evans et *al.*, 1996).

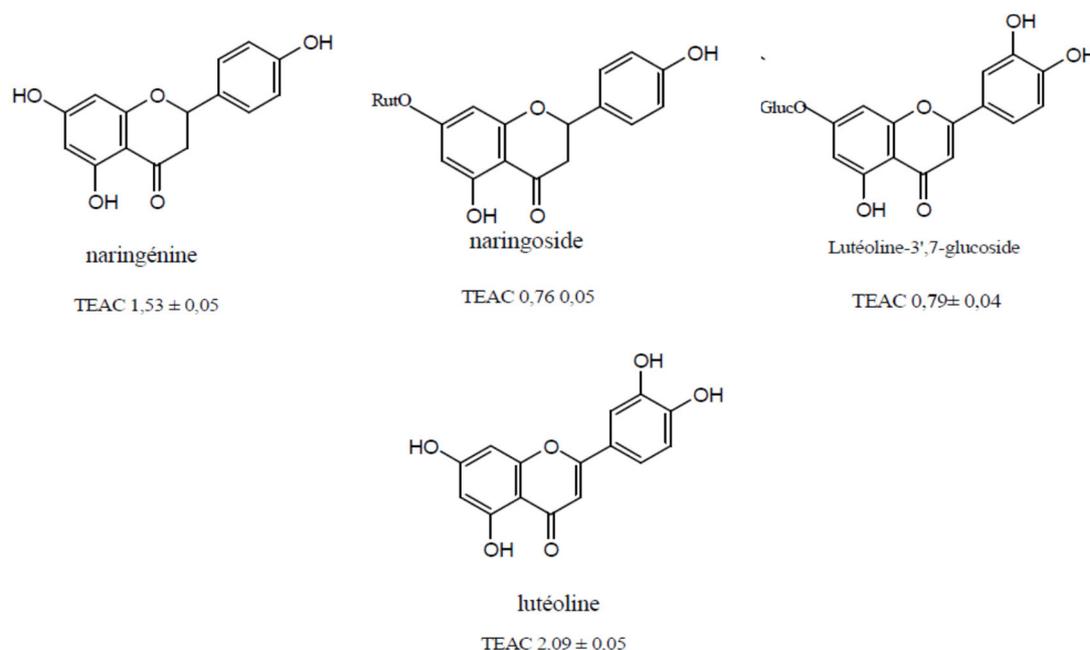
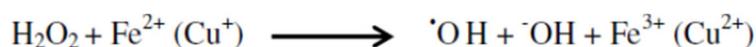


Figure 12 : Piégeage des ROS (X•) par un noyau catéchol.

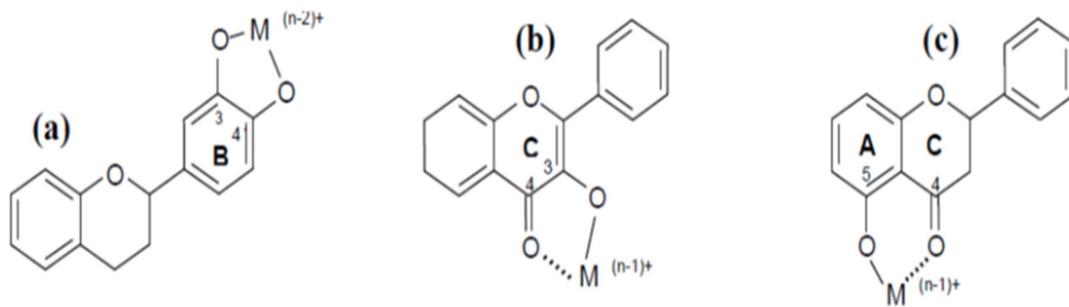
II.4.2. Chélation des ions métalliques

Les chélateurs de métaux de transition comme le fer et le cuivre peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Divers composés polyphénoliques possèdent des propriétés chélatrices qui contribuent à leur activité antioxydante (Brown et *al.*, 1998). Ces ions, essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques, sont responsables de la production du radical hydroxyle OH• par la réduction du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ lors de la réaction de Fenton (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002). De même, l'autoxydation des ions Fe²⁺ et Cu⁺ est une source de O₂^{•-} et de H₂O₂.



Les acides phénoliques et les flavonoïdes sont connus pour leur pouvoir chélateur des métaux de transition. Les flavonoïdes (figure 13) comportant des groupements catéchol (3', 4' di-OH) du cycle B (figure 13a), 3-hydroxy-4-oxo du cycle C (figure 13b) et 5-hydroxy-4-oxo des cycles A et C (figure 13c) sont de puissants inhibiteurs de la réaction de Fenton (Rice-Evans et *al.*, 1997). La glycosylation de ces hydroxyles diminue leur capacité chélatrice. Des études récentes suggèrent que le site privilégié de complexation des ions fer par la quercétine, la lutéoline et le kaempférol est le groupement 3-hydroxy-4-oxo du cycle C.

Selon Van Acker et al. (1998), cette voie antioxydante serait faiblement impliquée dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais très présente dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN (Sestili et *al.*, 1998).



$Mn^+ = Fe^{3+}, Cu^{2+}$

Figure 13 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Rice-Evans et *al.*, 1997).

II.4.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont connus pour leur pouvoir inhibiteur des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques comme la xanthine oxydase, la PKc, la cyclooxygénase, la lipooxygénase, la myéloperoxydase la monooxygénase microsomale, la glutathion S-transferase, la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000).

III. Inflammation

III.1. Généralités

L'inflammation désigne l'ensemble des réactions déclenchées dans des tissus vivants, vascularisés, suite à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression d'origine mécanique, chimique ou immunologique (Henrotin et *al.*, 2001). Elle vise à éliminer les agents agresseurs et de restaurer l'homéostasie du tissu lésé (Barton, 2008). L'inflammation aiguë est bénéfique pour l'organisme mais elle devient néfaste lorsqu'elle persiste et passe à la forme chronique (Weill et Batteux, 2003). Les manifestations de la réponse inflammatoire sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé mais avec des intensités et des durées variables (figure 14).

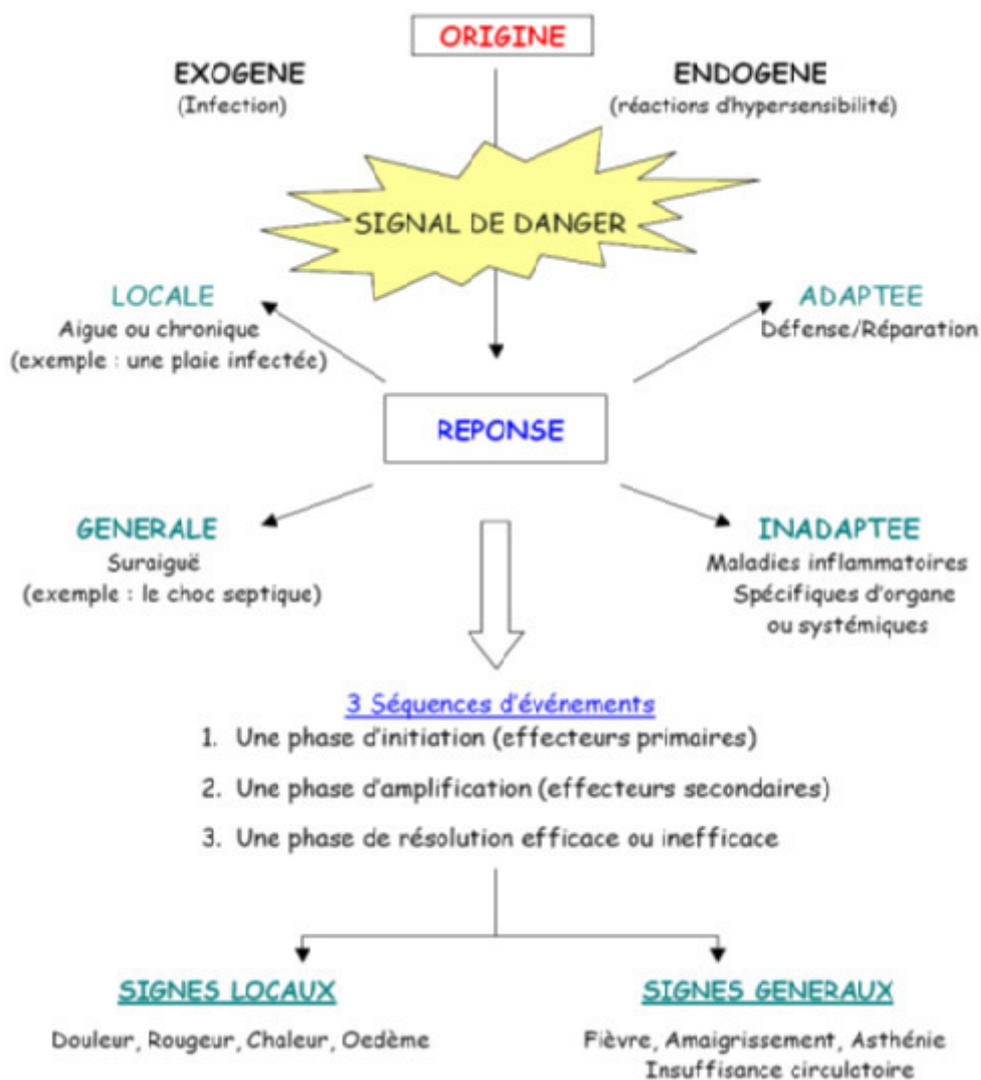


Figure 14 : Réaction inflammatoire (Prin et *al.*, 2009).

III.2. Phases de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est caractérisée par 4 signes cardinaux rougeur et gonflement avec chaleur et douleur. Elle s'effectue en 3 phases (figure 15), une phase d'initiation, ou vasculaire, qui met en jeu des effecteurs primaires, caractérisée par l'augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire au niveau du tissu enflammé, ce qui permet au liquide plasmatique de s'échapper vers le milieu extravasculaire (exsudation plasmatique). La 2^{ème} est la phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires ou de nombreuses cellules immunitaires sont mobilisées vers le site inflammatoire. Ces cellules détruisent et éliminent les stimuli nocifs qui s'y présentent, c'est la phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu endommagé (Rankin, 2004).

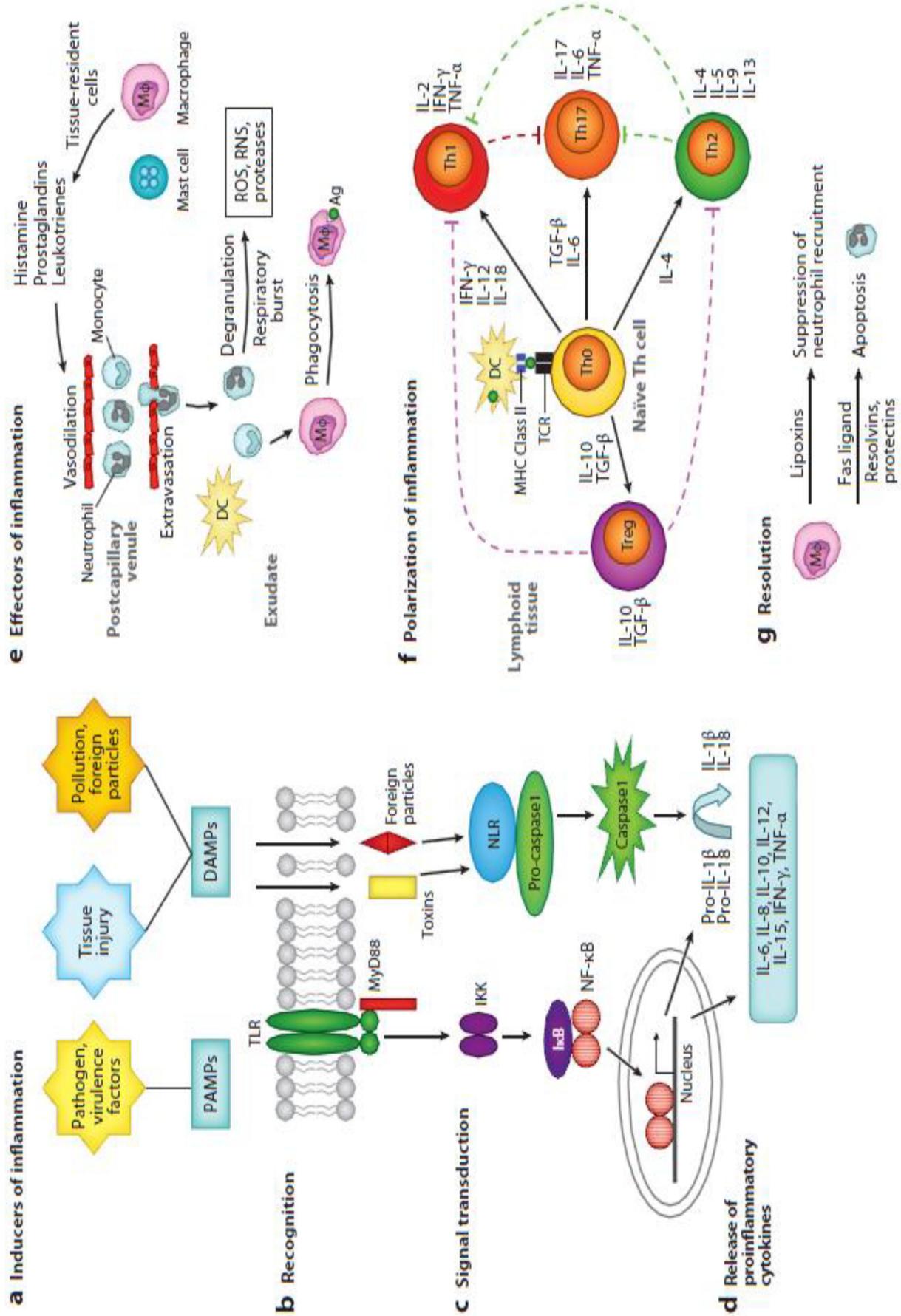


Figure 15 : Etapes de l'inflammation aigue (Ashley et al., 2012).

III.2.1. Phase vasculaire

L'activation des plaquettes et des mastocytes induit la libération de plusieurs médiateurs tels que la sérotonine, l'histamine et de dérivés de l'acide arachidonique. De plus, la libération des divers médiateurs (figure 16) doués d'activités vasodilatatrices et chimio-attractantes comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine les leucotriènes, les prostaglandines et le PAF dépend de l'activation des facteurs de coagulation et du système du complément (Fauve et Hevin, 1998). Cette libération entraîne une vasodilatation avec une modification de la perméabilité vasculaire permettant l'extravasation des protéines plasmatiques et des cellules vers les tissus (Weill et Batteux, 2003). L'augmentation de la perméabilité vasculaire favorise ainsi la formation d'un œdème, troisième signe cardinal de l'inflammation (figure 17). La distension tissulaire et la diminution du seuil de stimulation des nocicepteurs sont responsables de douleur. La bradykinine et certaines prostaglandines participent à l'apparition de la douleur, quatrième signe cardinal de l'inflammation (Kumar et *al.*, 2014).

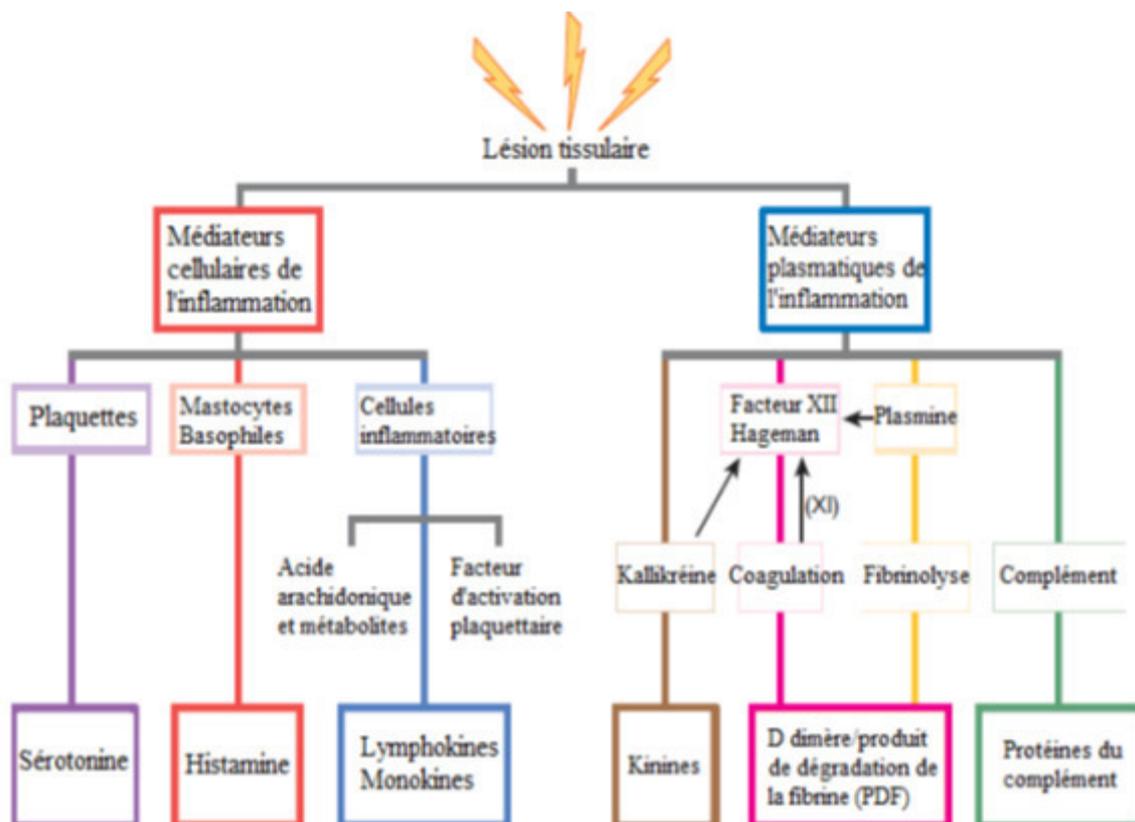


Figure 16 : Médiateurs de l'inflammation (Lakhani et *al.*, 2009).

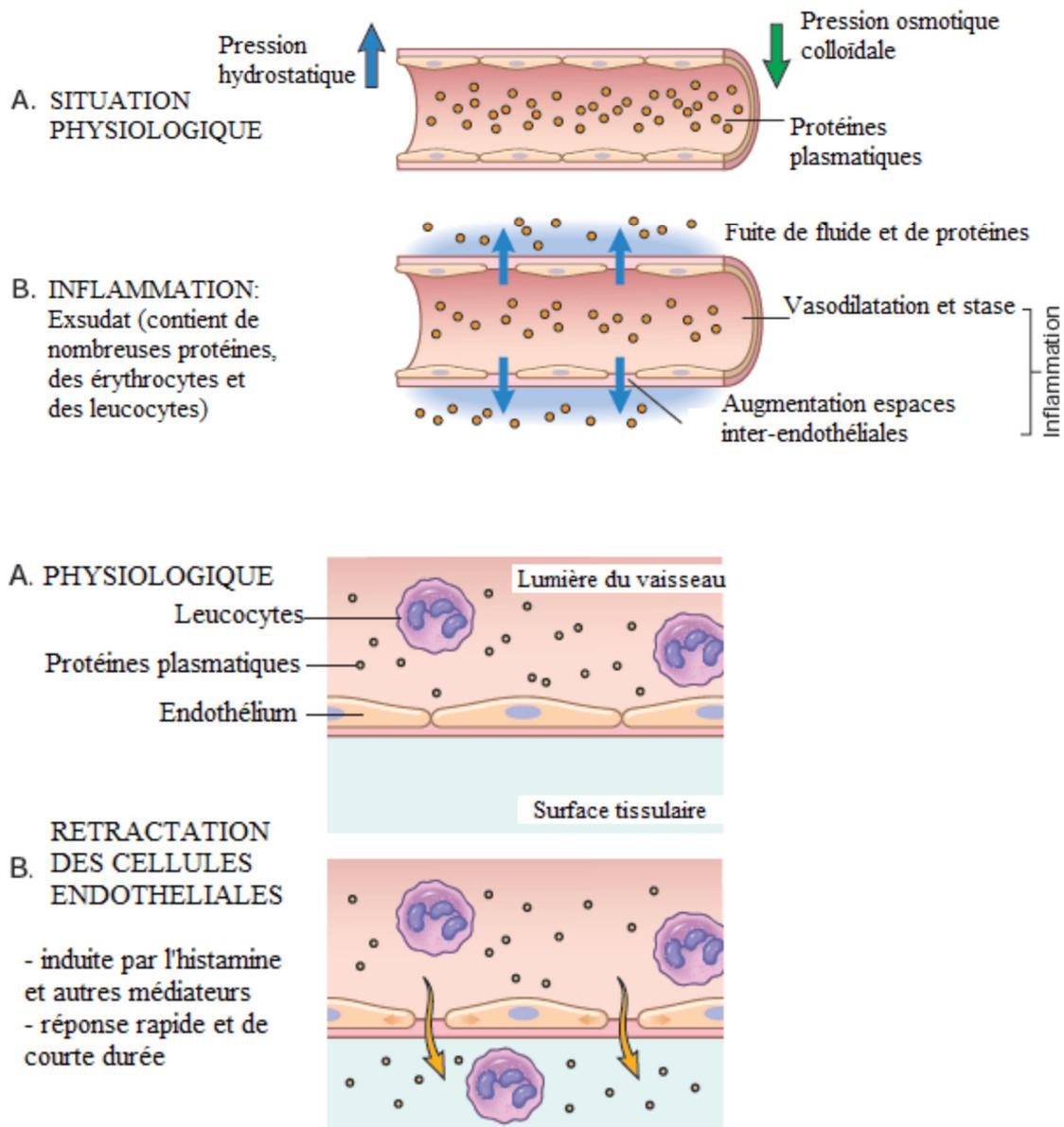


Figure 17 : Formation d'un exsudat (Kumar *et al.*, 2014).

III.2.2. Phase cellulaire

Les réactions cellulaires débutent parallèlement aux réactions vasculaires mais mettent plus de temps à être perceptibles (Kumar *et al.* 2014). La réponse cellulaire implique surtout les cellules endothéliales et les leucocytes circulants. Elle est caractérisée par un afflux extravasculaire interstitiel de leucocytes : les polynucléaires neutrophiles dans un premier temps puis les monocytes.

Les polynucléaires attirés par des facteurs chimiotactiques, au foyer inflammatoire, se marginalisent et adhèrent aux cellules endothéliales. Ils passent ensuite à travers la paroi vasculaire par diapédèse. Les leucocytes du tissu conjonctif migrent au foyer inflammatoire

grâce aux chimiokines sécrétées par les cellules phagocytaires et endothéliales présentes sur le site inflammatoire (figure 18).

Les polynucléaires (neutrophiles et macrophages) phagocytent les substances étrangères et les débris cellulaires qui sont englobées dans des vacuoles de phagocytose. Les lysosomes fusionnent avec la vacuole de phagocytose et y déversent leur contenu enzymatique aboutissant à l'hydrolyse enzymatique du contenu des vacuoles et à l'activation du métabolisme cellulaire oxydatif avec production de radicaux libres oxygénés et nitrés toxiques (Russo-Marie, 1998). Ces radicaux sont produits par 3 systèmes enzymatiques différents mais tous dépendants de l'oxygène.

La deuxième vague cellulaire est constituée de monocytes circulants subissant le même sort que les polynucléaires (chimiotactisme, adhérence). Ils gagnent le foyer inflammatoire attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles où ils se transforment en macrophages. Ceux-ci assurent le nettoyage du foyer inflammatoire en cas d'inflammation aiguë et participe à la poursuite du processus inflammatoire en cas d'inflammation chronique par la production de nombreux médiateurs particulièrement les cytokines, les systèmes du complément et la coagulation (Russo-Marie, 1998).

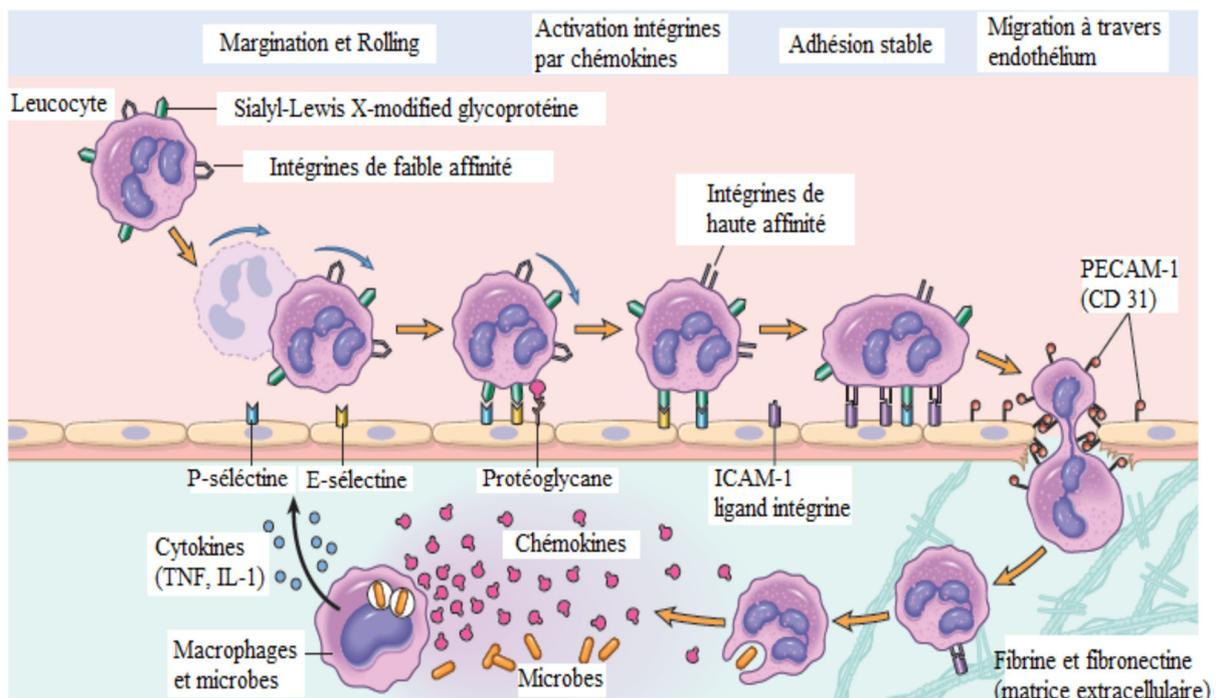


Figure 18 : Diapédèse (Kumar et al., 2014).

III.2.3. Phase de résolution

Une fois l'agent étranger éliminé, les débris cellulaires liés à la réponse inflammatoire sont digérés. La résorption de l'œdème se fait par le système lymphatique. Le processus inflammatoire disparaît sans laisser de trace. L'arrêt de la réponse inflammatoire fait intervenir plusieurs médiateurs tel que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β 1), l'expression des récepteurs solubles comme TNF- α et l'apoptose des cellules inflammatoires (Eming et *al.*, 2007). Au cours de la phase de réparation, les cellules fibroblastiques et endothéliales forment un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la réparation de l'endothélium (Weill et *al.*, 2003). La restitution intégrale se fait en plusieurs étapes (Headland et *al.*, 2015). Si l'atteinte entraîne une lésion tissulaire ne permettant pas sa régénération, le parenchyme lésé est alors remplacé par du tissu conjonctif : c'est la cicatrisation (Gilroy et *al.*, 2015).

III.3. Médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ces facteurs, synthétisés localement ou qui sont présents à l'état de précurseur inactif dans la circulation sanguine, augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium, augmentent l'agrégation des plaquettes...etc. (Kim et *al.*, 2012). On se limite de décrire seulement les médiateurs lipidiques, les cytokines et les radicaux libres.

III.3.1. Médiateurs lipidiques

Le PAF-acether et les eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) sont synthétisés à partir des phospholipides membranaires. Stimulée par l'histamine, la sérotonine et la bradykinine, la phospholipase A₂ (PLA₂) favorise la formation de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires des plaquettes et des cellules endothéliales. La PLA₂ est inhibée par les glucocorticoïdes et l'adrénaline (Weill et Batteux, 2003). Le métabolisme de l'acide arachidonique conduit par la voie de la cyclooxygénase à la synthèse des prostaglandines, et par la voie de la 5-lipoxygénase aux leucotriènes (figure 19).

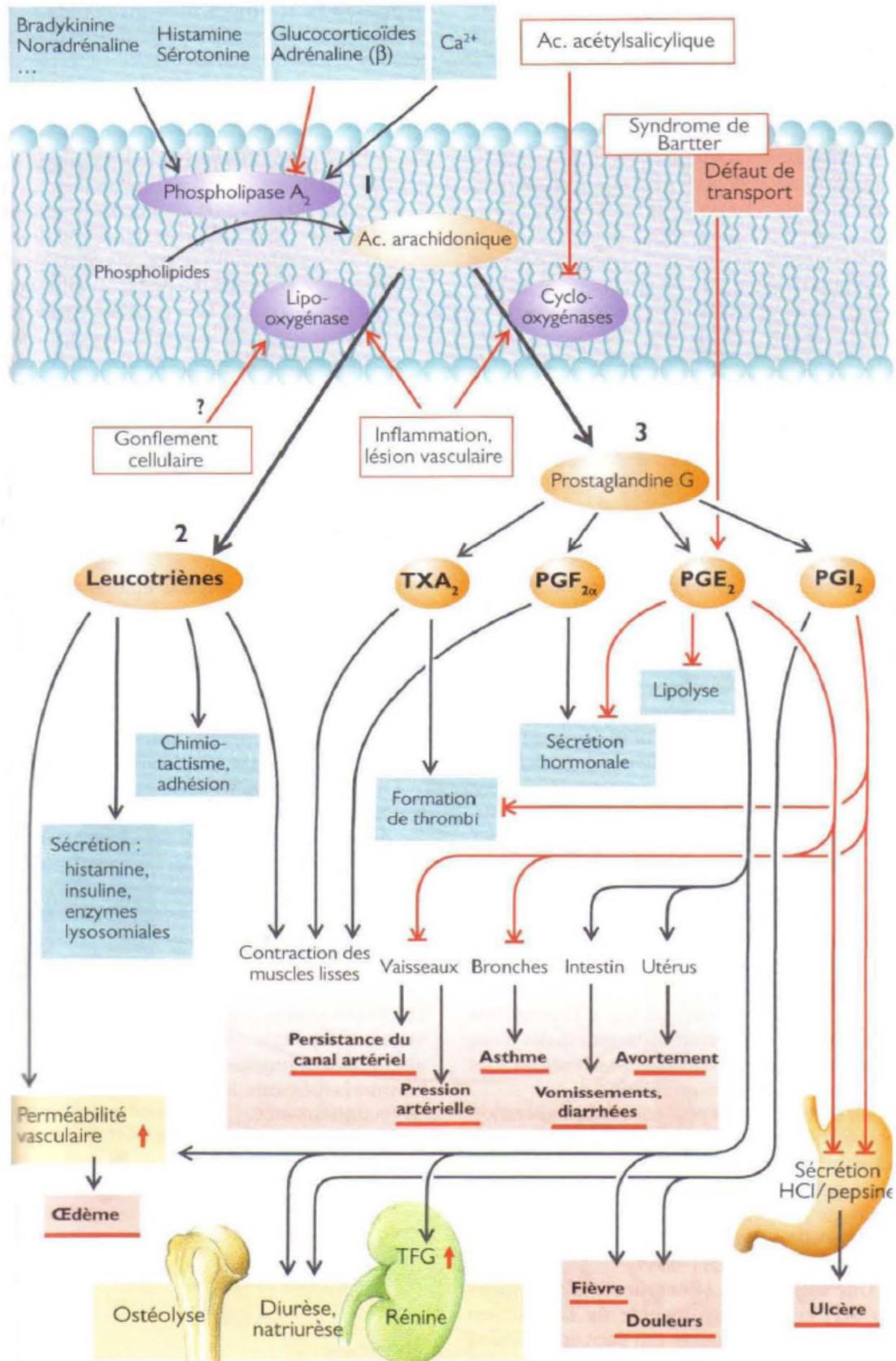


Figure 19 : Production et effets des dérivés de l'acide arachidonique (Silbernagl et al., 2007).

III.3.1.1. Eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont obtenus selon deux voies. La voie des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) conduit à la formation des prostanoïdes (prostaglandines, thromboxanes) qui ont un rôle dans la vasodilatation, par contre la voie des lipoxygénases produit des leucotriènes qui ont un rôle dans le chimiotactisme. L'isoenzyme COX-1, présente de façon durable dans de nombreux tissus, produit des prostaglandines qui ont un effet protecteur dans les conditions physiologiques de production. Par contre, la COX-2 est une enzyme inductible lors des réactions inflammatoires. Elle est présente dans les monocytes/macrophages, synoviocytes, chondrocytes articulaires, fibroblastes dermiques, cellules endothéliales, cellules mésangiales rénales, cellules épithéliales trachéales une fois activées (Mazières, 2000). L'inhibition de ces deux enzymes par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) explique leur action anti-inflammatoire et leurs effets secondaires.

III.3.1.2. Leucotriènes

Les leucotriènes représentent une famille de médiateurs dont l'intérêt physiopathologique, dans de nombreuses pathologies inflammatoires, a conduit au développement de molécules anti-inflammatoires qui constituent la nouvelle classe thérapeutique des antileucotriènes. Ces dérivés de la 5-lipoxygénase ont une forte activité chimiotactique sur les polynucléaires neutrophiles (Weill et Batteux, 2003) et augmentent la perméabilité vasculaire et participent à la formation de l'œdème. La distribution de la 5-lipoxygénase est limitée à certaines cellules d'origine médullaire telles que les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, monocytes/macrophages, mastocytes et lymphocyte B.

III.3.1.3. PAF-acether

Le PAF-acether joue un rôle dans la vasodilatation et dans le chimiotactisme des polynucléaires. Il active également les phagocytes et a une action sur les fibroblastes et les fibres musculaires lisses. Le PAF-acether participe à l'activation de la PLA2 et permet une production amplifiée d'eicosanoïdes (Russo-Marie, 1998).

III.3.2. Cytokines

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans les différentes étapes de l'inflammation. Ces médiateurs peptidiques de la communication intercellulaire sont produits par les cellules inflammatoires qui sont à la fois les émetteurs et des récepteurs de signaux dépendants des chémokines et des cytokines. Les cytokines agissent à faible concentration à proximité du foyer

d'induction (réaction locale et action aocrine) ou à distance (fièvre, réactions systémiques et action paracrine). Ils ont un rôle sur la croissance, la différenciation, la migration et l'activation des cellules inflammatoires (Murphy et *al.*, 2012). Les principales cytokines sont le TNF- α et les interleukines en particulier IL-1 β , IL-6 et IL-8 en plus des IL-4, IL-10 et IL-13.

III.3.3. Radicaux libres

Les radicaux libres font partie des médiateurs de l'inflammation qui augmentent la perméabilité vasculaire et l'adhésion cellulaire des PNN sur les cellules endothéliales (Aggarwal et Sung, 2009). Ils contribuent également à l'entretien de l'inflammation *via* des radicaux libres formés libérés du phagosome.

Au cours d'une réaction inflammatoire, la NADPH oxydase des cellules phagocytaires produit une grande quantité d'anion superoxyde (O₂^{•-}), qui se dismute quasi instantanément en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence du chlore, contenu dans le phagosome, l'H₂O₂ est transformé par la myéloperoxydase en acide hypochloreux, composé toxique a grand pouvoir antibactérien. Les neutrophiles et les macrophages activés par les cytokines tels que l'IFN γ permettent la production du NO qui réagit avec l'ion superoxyde pour donner le peroxyde nitrite. Ce dernier s'attaque aux lipides, les protéines et les acides nucléiques des microbes et des cellules hôtes (Martin et *al.*, 2015). Les ROS produits par certaines cellules non phagocytaires (fibroblastes, cellules endothéliales...) peuvent moduler les cascades de signalisation intracellulaire. Ils permettent également, l'activation de l'expression de facteurs de transcription nucléaire (NF- κ B, AP-1) qui ont un rôle dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Inaba et *al.*, 2010).

III.4. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires ciblent les molécules clés dans la physiopathologie de la réaction : la PLA₂, la lipoxigénase, la cyclooxygénase et les cytokines.

III.4.1. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) agissent sur la phase initiale de l'inflammation, en inhibant les cyclo-oxygénases (COX) 1 et/ou 2, d'où leur action anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique et antiagrégante plaquettaire pour certains. Cette inhibition non sélective engendre une diminution de la synthèse des prostaglandines associée à des effets indésirables (ulcères gastro-duodénaux et augmentation du risque hémorragique) liés à l'inhibition de la COX-1 constitutive et qui joue un rôle important dans l'homéostasie

physiologique. Des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 inducible, activée lors des réactions inflammatoires, sont privilégiés afin de réduire ces effets indésirables.

Sur le plan chimique, les AINS ont des structures très diverses. Selon Flipo et al. (1993), on distingue les dérivés salicylés (aspirine), les pyrazolés (phénylbutazone), les propioniques (ibuprofène, kétoprofène), les oxicam (piroxicam), les indoliques (indométacine) et les fénamates (acide niflumique).

III.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Ces glucocorticoïdes synthétiques sont de puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques. Leur mécanisme d'action est similaire à celui des glucocorticoïdes endogènes.

Les glucocorticoïdes exercent un pouvoir anti-inflammatoire selon plusieurs mécanismes, essentiellement génomiques, qui impliquent tous une interaction avec leur récepteur. Ils induisent la synthèse de la lipocortine qui inhibe directement la PLA2 ce qui réduit la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires et donc la formation des médiateurs de l'inflammation, prostaglandines et leucotriènes (Sebaldt et *al.*, 1993). Ce blocage conjoint de la production des prostaglandines et des leucotriènes pourrait, au moins en partie, expliquer la supériorité des effets anti-inflammatoires des AIS par rapport aux AINS qui ne bloquent que la formation des prostanoïdes. Les corticoïdes sont capables de réduire la synthèse de nombreuses cytokines et chémokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-4, IL-5, IL-12, IL-17, IL-18, GM-CSF...) par des mécanismes essentiellement trans-répressionnels (Mazières, 2003) *via* l'inhibition des principaux facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1). Par contre, ils amplifient la transcription des gènes codants pour d'autres cytokines anti-inflammatoires lymphocytaires, comme l'IL-10 et le TGF β (Visser et *al.*, 1998). Comme les AINS, l'utilisation des AIS n'est pas dénuée d'effets indésirables qui s'accroissent avec le prolongement de la durée du traitement. Ces effets néfastes sont surtout l'hypertension artérielle et les ulcères gastro-duodénaux (Chung, 2014).

III.4.3. Anti-inflammatoires polyphénoliques d'origine végétale

Les plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies inflammatoires. Les principales plantes anti-inflammatoires et antalgiques inscrites à la Pharmacopée sont le saule (*Salix sp.*), la reine-des-prés (*Filipendula ulmaria*), le cassis (*Ribes nigrum*), l'ortie (*Urtica urens*, *U. dioica*), le frêne (*Fraxinus excelsior*), l'harpagophyton (*Harpagophytum procumbens*), la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) et le curcuma (*Curcuma longa*).

Les principes actifs des plantes sont de nature chimique variée. Plusieurs sont les travaux qui ont démontré les propriétés anti-inflammatoires des polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, sur différents modèles inflammatoires animaux. Ces propriétés anti-inflammatoires sont liées à leur capacité à moduler le fonctionnement du système immunitaire. De nombreux mécanismes d'action cellulaire (figure 20) ont été proposés *in vivo* pour expliquer cette activité (Kim et *al.*, 2004).

La quercétine est un puissant inhibiteur de la PLA₂, les flavanones montrent une inhibition moins forte que les flavonols, indiquant l'importance de la double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C. A des concentrations relativement élevées, la myricétine et la quercétine inhibent l'activité des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) et des lipooxygénases et bloquent ainsi la biosynthèse des prostaglandines, thromboxane et des leucotriènes. A faibles concentrations, elles inhibent uniquement les lipooxygénases. De même, l'apigénine (flavones) possède un pouvoir inhibiteur notable sur les cyclooxygénases (Di Carlo et *al.*, 1999).

La curcumine (polyphénol) inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression de l'enzyme NO Synthase (iNOS) inductible (Jurenka, 2009). De leur part, les flavones expriment une plus forte inhibition de la production de NO que les flavonols. Ceci est dû à l'importance de la liaison double en position 2,3 du cycle C et l'influence des substitutions hydroxyyles des cycles A et B (Kim et *al.*, 2004).

Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables d'inhiber et/ou de réduire la production de ROS par les neutrophiles (Limasset et *al.*, 1993). La production excessive de la myéloperoxydase lors de l'activation des neutrophiles est inhibée en présence de flavonoïdes et notamment les aglycones (Serteyn et *al.*, 2003).

Kim et al. (2004) rapportent que de nombreux flavonoïdes peuvent réguler la production des cytokines inflammatoires telles que TNF α (génistéine, quercétine, lutéoline) et les interleukines IL-1 β (génistéine et quercétine), IL-6 (apigénine et quercétine) et IL-8 (apigénine). De surcroît, les flavonoïdes peuvent agir sur les mécanismes de modulation de l'expression de gènes pro inflammatoires de la PKC, la protéine tyrosine kinase (PTK), les MAPKinases (Kim et *al.*, 2004), du NF-Kb (facteur de transcription de l'ADN qui active de nombreux états inflammatoires et pathologiques, incluant le cancer) (Farahpour et *al.*, 2015) et sur le PAF (Roschek et *al.*, 2009).

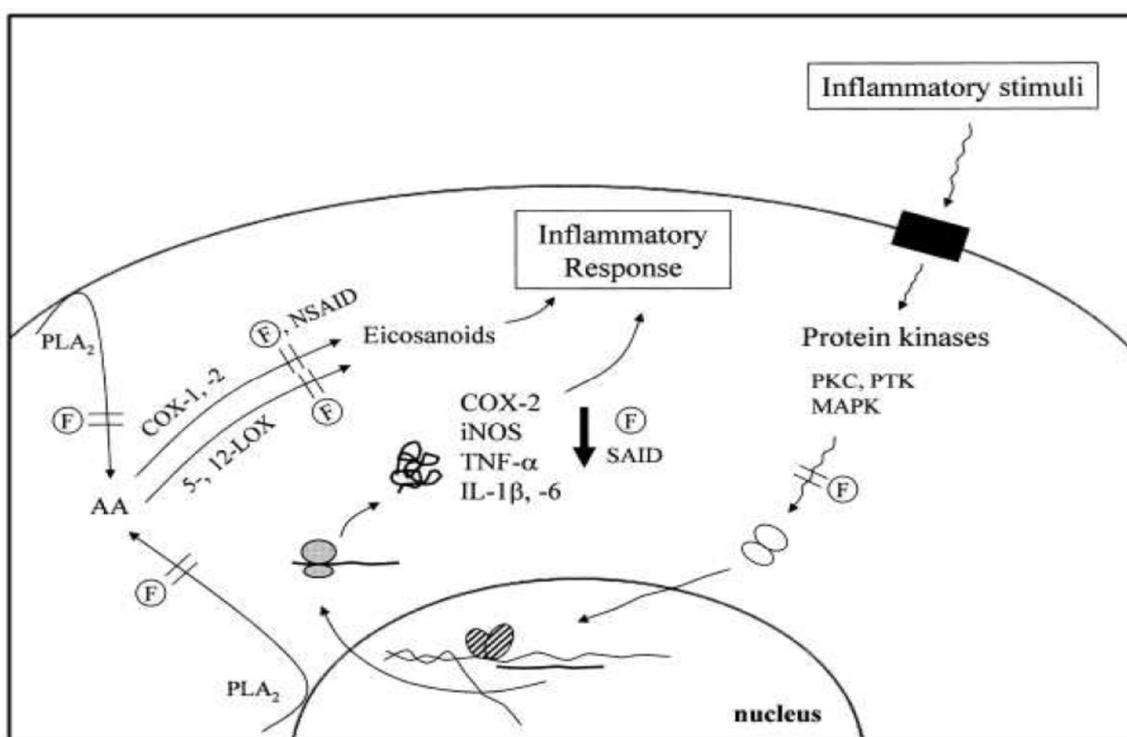


Figure 20 : Mécanismes d'action proposés des flavonoïdes sur la réaction inflammatoire. Flavonoïdes (F), drogue anti-inflammatoire non stéroïdienne (NSAID), drogue anti-inflammatoire stéroïdienne (SAID), « = » et « ↓ » montrent l'inhibition enzymatique et la diminution d'expression des gènes, respectivement (Kim et *al.*, 2004).

Partie
Expérimentale

Matériels

et

Méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Site de récolte de la plante

Notre étude s'est portée sur une plante halophyte de la famille des plumbaginacées *Limonium guyonianum*. La plante a été récoltée de son origine naturelle au sud du chott El Hodna (70 Km de la ville de M'sila) des lieux dits : Bir Henni et Bir Arbi (figure 21) dans des endroits propres et loin de la pollution. La récolte a été faite au début du mois d'avril 2012 après la période de floraison. Le choix des individus des sites est effectué en supervision générale de façon à rendre compte le mieux possible de la micrographie du site. Chaque individu a fait l'objet d'un prélèvement au hasard sur plusieurs arbustes de rameaux de feuilles. L'identification de la plante a été faite par le Dr. Sarri D (département des Sciences de la nature et de la vie, Université M'sila), un spécimen herbier a été déposé au niveau du laboratoire de biologie végétale du même département.

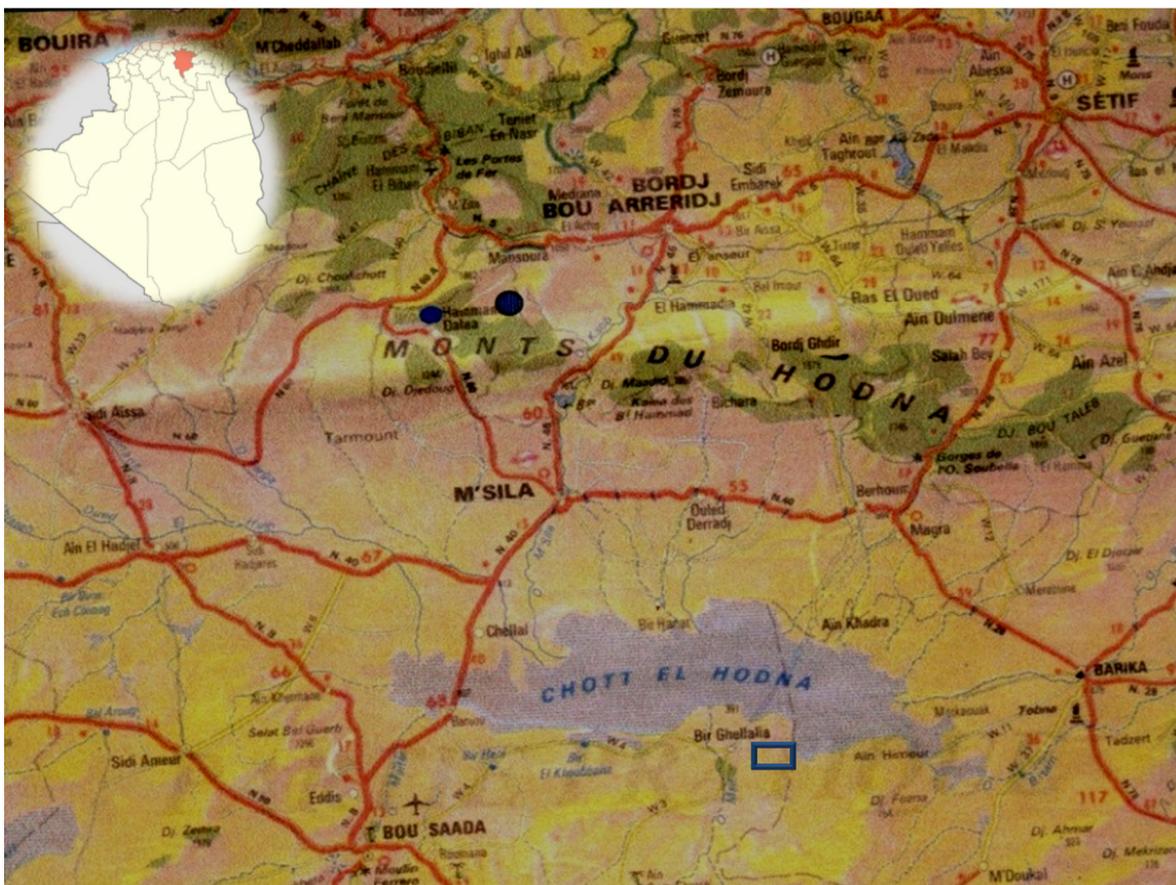


Figure 21 : Sites de récolte de *Limonium guyonianum*.

I.2. Traitement préliminaire de la plante

Les feuilles récupérées sont débarrassées de leur poussière résiduelle et nettoyées pour éliminer toute trace de sable. Pour les sécher, les feuilles sont étalées sur des supports perforés puis incubés dans une étuve ventilée à 55°C. Le séchage n'est arrêté que lorsque le poids devient stable.

Les feuilles totalement séchées sont initialement pilonnées pour être finement broyées dans un broyeur électrique. Ce broyage a permis d'obtenir une poudre fine et homogène ce qui a pour conséquence une augmentation de la surface de contact solvant-échantillon, permettant ainsi d'augmenter le rendement tout en minimisant le temps d'extraction. Le broyat obtenu est mis dans des bocaux ombrés hermétiquement fermés puis conservé dans un endroit sec à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à son utilisation.

II. Méthodes d'analyses phytochimiques

Tous les produits utilisés dans cette étude sont de qualité analytique et proviennent de Sigma, Fluka, Riedel-de Haén, Prolabo, Biochem, Panreac et Sanofi Aventis.

II.1. Taux d'humidité

Les échantillons sont séchés jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids fixe. Des creusets vides sont séchés durant 15 min à 103 ± 2 °C, puis tarés après refroidissement dans un dessiccateur. Trois échantillons de feuilles fraîches de 1g chacun sont placés dans une étuve ventilée à 70°C pendant 6 heures, ensuite les creusets sont retirés de l'étuve et placés dans un dessiccateur pour être pesés une fois refroidis (AOAC, 1990a). La teneur en eau des feuilles est déterminée comme suit :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = [(M_f - M_s) / M_f] \times 100$$

M_f : matière fraîche

M_s : matière sèche

II.2. Teneurs en matière organique et minérale

La détermination du taux de la matière minérale (cendres) est basée sur l'incinération de l'échantillon à une température relativement élevée (400 à 600 °C) jusqu'à l'obtention de cendres blanches. Trois échantillons de 1 g de feuilles (M_e) sont pesés dans des creusets en porcelaine préalablement tarés (M_i). Les creusets sont chauffés progressivement sur une plaque chauffante jusqu'à carbonisation de la matière organique puis introduits dans un four à moufle à 550°C pendant au moins 3 heures jusqu'à l'obtention de cendres grises claires à blanches. Les creusets sont pesés (M_f) après refroidissement dans un dessiccateur (AOAC, 1990b).

Cette méthode nous permet de déterminer à la fois la teneur en matière organique (MO%) et en cendres (C%) qui seront exprimées par rapport à la matière sèche. Ces taux sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{MO (\%)} = [(M_i - M_f) / M_e] \times 100$$

M_e : Masse de la prise d'essai

M_i : Masse initiale (creuset + échantillon) avant calcination

M_f : Masse finale (creuset + échantillon) après calcination

$$\text{C (\%)} = 100 - \text{MO\%}$$

II.3. Détermination de la teneur en substances extractibles

Afin de déterminer la teneur des feuilles de *L. guyonianum* en substances extractibles, plusieurs extractions sont effectuées en utilisant des solvants de polarité différente (eau, méthanol et acétone).

II.3.1. Teneur en substances extractibles par l'eau

La détermination de la teneur en substances extractibles par l'eau est réalisée par décoction et par infusion (figure 22).

- **Décoction**

Une prise de 1 g de poudre de feuilles est portée à ébullition pendant 15 min dans 20 ml d'eau distillée. Après refroidissement et filtration, l'eau est évaporée et le poids sec est déterminé.

- **Infusion**

Une infusion de 1 g de poudre de feuilles dans 20 ml d'eau distillée bouillante est réalisée pendant 15 min. Après refroidissement et filtration, l'eau est évaporée et le poids sec est déterminé.

II.3.2. Teneur en substances extractibles par le méthanol ou l'acétone

Une macération de 1g de poudre de feuilles avec 20 ml est réalisée pendant 24 heures sous agitation continue à température ambiante. Après filtration, le solvant est évaporé et la masse du résidu sec est déterminée (figure 22).

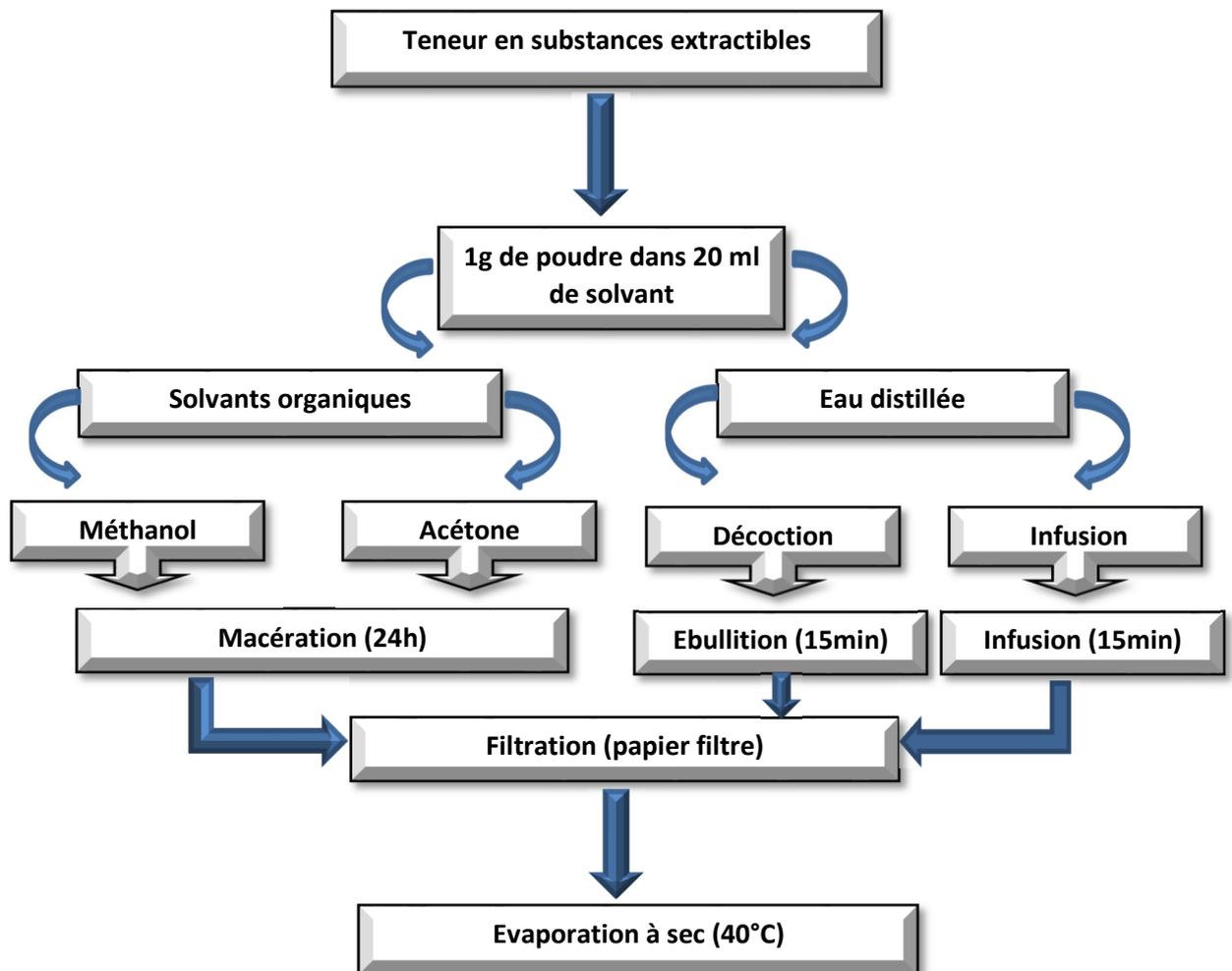


Figure 22 : Détermination de la teneur en substances extractibles des feuilles de *L. guyonianum*.

II.4. Tests phytochimiques

Une analyse phytochimique des feuilles étudiées est réalisée afin de rechercher la présence de métabolites secondaires ayant un intérêt pharmacologique tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les anthocyanes, les coumarines, les quinones, les stérols, les polyterpènes et les alcaloïdes. Les tests sont effectués sur la poudre végétale des feuilles de *L. guyonianum* ou de son infusât.

II.4.1. Préparation de l'infusé

L'infusion est préparée en mélangeant 10 g de poudre de feuilles à 100 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min. L'infusât est filtré et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

II.4.2. Réactions de mise en évidence

II.4.2.1. Polyphénols

Quelques gouttes d'une solution alcoolique de chlorure ferrique (2 %) sont ajoutées à 2 ml d'extrait. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée (Rajeshwar et Lalitha, 2013).

II.4.2.2. Flavonoïdes

La présence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par le traitement de 5 ml de l'extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré puis l'ajout de quelques copeaux de tournures de magnésium. Après réaction, la présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (Karumi et *al.*, 2004).

II.4.2.3. Tanins

La présence des tanins peut être mise en évidence en ajoutant 4 ml de butanol chlorhydrique (40 ml butanol + 10 ml HCl pur) à 0.2 g de poudre des feuilles, le mélange est incubé à 90°C dans un bain marie pendant 10 mn. L'apparition d'une coloration rouge intense, caractéristique du cyanidol après agitation indique la présence des tanins (Bekro et *al.*, 2007).

II.4.2.4. Saponosides

La présence des saponosides est indiquée par la formation d'une mousse persistante. Ainsi, 5 ml de l'infusât sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 mn confirme la présence des saponosides (Karumi *et al.*, 2004).

II.4.2.5. Anthocyanes

La détection des anthocyanes est réalisée en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque dilué au 1/2 à 5 ml d'extrait aqueux. La réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyanes (Rizk, 1982).

II.4.2.6. Coumarines

À 2 g de poudre végétale sont ajoutés 10 ml de chloroforme. Le mélange est chauffé pendant quelques minutes puis filtré. Les filtrats sont soumis à une analyse CCM en utilisant comme éluant un mélange toluène/acétate d'éthyle (93 :10). Après élution, la visualisation du chromatogramme est effectuée à 365 nm en absence et en présence de NH₃. L'apparition de fluorescence indique la présence de coumarines (Risk, 1982).

II.4.2.7. Quinones libres et combinés

Les substances quinoniques libres ou combinées sont mises en évidence en utilisant le réactif de Borntraegen. Pratiquement 2 ml de l'infusât sont évaporés à sec. Le résidu est trituré dans 5 ml d'acide chlorhydrique au 1/5 puis placé dans un bain marie pendant 30 min. Après refroidissement, les quinones sont extraites par 20 ml de chloroforme. Un volume de 0.5 ml d'ammoniaque dilué au demi est ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette est un signe positif de la présence des quinones (Békro *et al.*, 2007).

II.4.2.8. Stérols et polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, le réactif de Liebermann a été utilisé. Pratiquement, 5 ml de l'extrait des feuilles a été évaporé à sec dans une capsule en porcelaine sur bain de sable pour obtenir un résidu sec qui sera dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique. Un volume de 0.5 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté au triturât, l'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive (Békro *et al.*, 2007).

II.4.2.9. Réaction de révélation des alcaloïdes

À 2 ml d'infusât des feuilles de *L. guyonianum* est ajouté un petit volume de réactif de Dragendorff. La formation d'un précipité brun rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes (Rajeshwar et Lalitha, 2013).

II.5. Extraction

Une pesée de 20 g (Pe) de poudre (granulométrie < 250 µm) de feuilles est trempée dans 200 ml d'eau distillée bouillante pendant 4 heures sous agitation continue. Après filtration, la pâte obtenue est pressée à la main pour récupérer le maximum de solvants et de solides solubles. Cette première filtration permet de clarifier la solution d'échantillon et d'éliminer les particules solides issues de déchets de la plante. Une deuxième filtration sur papier Wattman n°3 est appliquée pour éliminer les particules fines persistantes. Le filtrat obtenu est transvasé dans des récipients pour subir une évaporation douce dans une étuve à 55°C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (figure 23). Cette opération est réalisée plusieurs fois afin d'obtenir une quantité maniable d'extrait aqueux sec pour réaliser l'étude phytochimique et biologique.

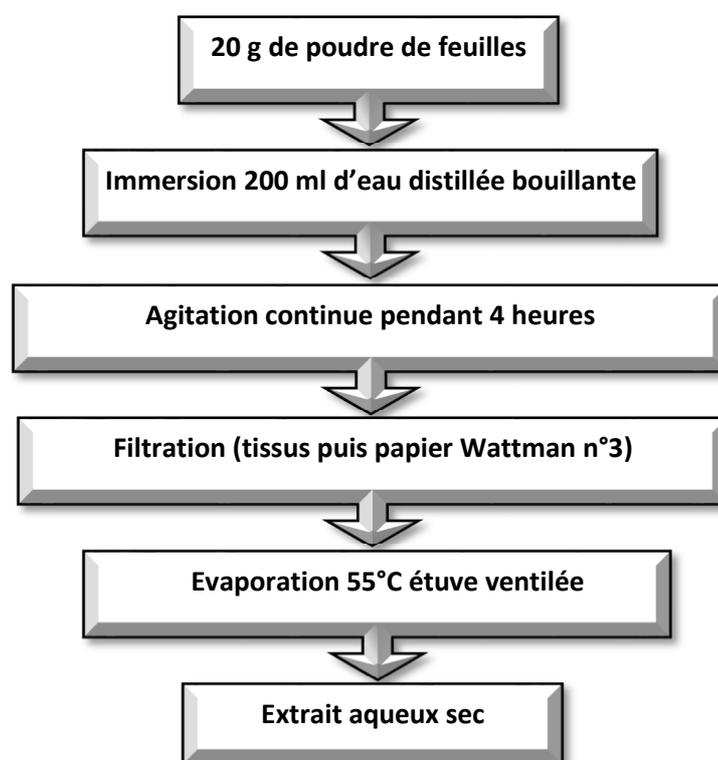


Figure 23 : Procédé d'obtention de l'extrait aqueux à partir des feuilles de *L. guyonianum*.

II.6. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* a été déterminée par la méthode au Folin-Ciocalteu décrite par Li et al. (2007) avec de légères modifications. Un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange bleu d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Ces derniers, présentent un maximum d'absorption à 765 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle au taux des composés phénoliques (Georgé et al., 2005).

Dans des tubes à essai, 100 μ l d'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 500 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 %. Après 4 minutes d'agitation, 400 μ l de la solution de carbonate de sodium (75 g/l) sont additionnés à chaque tube. Par la suite, les tubes sont incubés pendant 2 heures à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 765 nm. La concentration de l'extrait en composés phénoliques extractibles totaux est déterminée à partir d'une gamme d'étalonnage (0-200 μ g/ml) établie avec l'acide gallique (annexe 01). Les résultats sont exprimés en μ g d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μ g EAG/mg Ex).

II.7. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait aqueux des feuilles étudiées a été déterminée par la méthode colorimétrique de Bajorun et al. (1996). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} . L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ribereau-Gayon, 1968).

Un volume de 1 ml de la solution aqueuse de l'échantillon est ajouté à 1 ml de solution de trichlorure d'aluminium à 2 % (préparée dans du méthanol). Après 10 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm, contre un tube témoin où l'échantillon est remplacé par un volume équivalent de méthanol. La quantité des flavonoïdes contenus dans l'extrait est calculée par référence à une gamme d'étalonnage (0-14 μ g/ml) établie avec la quercétine (annexe 02). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait).

II.8. Dosage des tanins totaux

L'estimation de la teneur en tanins totaux contenus dans les extraits a été réalisée par la méthode de Hagerman et Butler (1989) basée sur leur capacité de précipiter l'hémoglobine du sang bovin frais. Un volume de sang hémolysé est mélangé avec un volume de la solution d'échantillon ou d'acide tannique à différentes concentrations. Le mélange est incubé pendant 20 min à température ambiante, puis centrifugé à 4000 rpm à 4°C pendant 10 min. Les absorbances des surnageants sont mesurées à 576 nm contre l'eau distillée. Une gamme étalon (0-550 µg/ml) est établie séparément avec l'acide tannique (annexe 03). Le taux de précipitation de l'hémoglobine sous l'effet de l'extrait est calculé selon la formule suivante :

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

Ac : absorbance du contrôle

At : Absorbance du test

II.9. Analyse de l'extrait par HPLC-MS

Le couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide est une technique sensible et fiable, couramment utilisée dans l'analyse des composés phénoliques. Les molécules de notre extrait peuvent être identifiées grâce à leurs formules brutes, qui peuvent être obtenues à l'aide d'un spectromètre de masse de haute résolution, comme le spectromètre à temps de vol (TOF-MS). Dans cette étude, TOF-MS est la seule méthode d'ionisation utilisée.

II.9.1. Principe de l'analyseur à temps de vol

Après passage en phase gazeuse, la détermination des masses des composés préalablement ionisés se fait en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). L'analyse en spectrométrie de masse nécessite trois étapes distinctes. La première est associée à la génération d'ions positifs ou négatifs en phase gazeuse à partir des composés issus d'un échantillon solide, liquide ou gazeux. La seconde assure la séparation de ces ions en fonction de leur rapport m/z au sein de l'analyseur et la dernière est la détection du signal électrique issu de la conversion du signal des ions. Une analyse structurale plus poussée nécessite une étape supplémentaire dite de fragmentation au niveau de l'analyseur (Cleon et D'Angéli, 2005).

II.9.2. Analyse de l'extrait par HPLC-TOF/MS

L'extrait est analysé par HPLC-TOF/MS, selon le protocole décrit par Abay et al. (2015), sur un appareillage de chromatographie type Agilent série 1260 infinity (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) équipé d'un détecteur LC-MS 6210 TOF et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100 mm, 3.5 µm). Les conditions d'élution suivantes ont été utilisées : débit de 0.6 ml/min, la phase mobile est composée d'un mélange de solvants (solvant A : eau ultra-pure à 0.1 % (v/v) d'acide formique, solvant B : acétonitrile à 0.1% (v/v) d'acide formique avec le gradient décrit comme suit : 0 min 10 % B, 0-1 min 10 % B, 1-20 min 50 % B, 20-23 min 80 % B, 23-25 min 10 % B, 25-30 min 10 % B, le volume d'injection est de 10 µl et la température de la colonne est de 35°C. Pour ce qui est des paramètres d'ionisation, l'HPLC est couplée à un spectromètre de masse dont la source d'ionisation est négative ; pression du gaz pulvérisateur (nébuliseur) : 40 psi ; flux du gaz séchant (N₂) : 8 l.min⁻¹ ; température du gaz séchant (N₂) : 325°C ; différence de potentiel sur le capillaire : 4 kV ; la tension du fragmenteur est de 175 V. Pour la préparation de l'échantillon, l'extrait brut est préalablement séché puis dissout dans du méthanol (200 ppm) pour être filtré à travers un filtre PTFE 0.45 µm (polytétrafluoroéthylène) afin éliminer toute trace de particules solides.

III. Etude Toxicologique

III.1. Toxicité aiguë

La détermination de la toxicité aiguë est la première des études toxicologiques à entreprendre pour une substance supposée avoir des propriétés pharmacologiques. Les principaux effets recherchés dans ce genre d'étude sont les signes cliniques, les modifications pathologiques visibles à l'œil nu et la mortalité. Le protocole expérimental 420 de l'OCDE (2001) mené dans la présente étude a été appliqué sur souris femelles.

III.1.1. Animaux

L'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux est réalisée sur des souris femelles non gravides de race *Swiss (Mus musculus)* âgées de 8 semaines environ pesant entre 26 et 32 g. Ces animaux proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger. Dès réception, les souris sont placées dans des cages en plastique avec accès libre à la nourriture et à l'eau. La litière de copeaux de bois est renouvelée tous les 2 jours. Les souris sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant 15 jours avant expérimentation. Elles sont nourries de croquettes provenant de l'office National de L'Alimentation de Bétail (ONAB) d'El Kseur (Béjaia).

III.1.2. Constitution des lots et traitement des souris

Après acclimatation, 4 lots de 10 souris chacun sont constitués. Les souris sont privées de nourriture 18 heures avant l'administration de l'extrait pour enrayer toute interaction digestive alimentaire. Trois doses de l'extrait aqueux 1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel (pc) sont administrées en dose unique par voie orale à raison de 0.5 ml/100 g de poids corporel aux 3 groupes de souris traités et le 4^{ème} groupe contrôle reçoit de l'eau distillée.

III.1.3. Troubles symptomatiques

Après traitement, les animaux sont remis dans leurs cages où ils ont accès à l'eau et à la nourriture. Elles sont maintenues dans les mêmes conditions de température, d'éclairage et d'alimentation. Les souris traitées sont observées individuellement toutes les 30 minutes pendant 6 heures, durant le premier jour et tous les jours pendant 14 jours selon les directives de l'OCDE (2001) et du CCPA (1993). Durant cette période, toutes les variations comportementales et symptomatiques observées à l'œil nu sont reportées. Les principaux signes cliniques recherchés sont l'apparence physique externe (aspect et chute des poils), les signes cliniques mesurables (changements des rythmes cardiaque et respiratoire, contraction abdominale, diarrhée) et enfin le changement du comportement (posture, grattage, agressivité, sensibilité au bruit et à la lumière, hypersalivation, ...etc.).

III.1.4. Détermination des doses létales et tolérée

Cette étude nous permet de déterminer les doses létales et tolérée de notre extrait. Ces dernières sont la Dose Maximale Tolérée (DMT) qui n'est que la dose maximale sans effet toxique observable, la Dose Minimale Mortelle (DMM) qui tue un animal du lot traité), la Dose Létale pour 50% d'animaux (DL50) qui est la dose qui provoque la mort de la moitié des animaux et la Dose Létale pour 100% d'animaux (DL100) qui est la dose qui entraîne la mort de tous les animaux.

La valeur de la DL50 permet de classer l'extrait sur l'échelle de toxicité (tableau 01). La DL50 peut être déterminée par plusieurs méthodes, telles que la méthode arithmétique de Behrens et Karber (1935), la méthode graphique de Miller et Tainter (1944) et par l'équation de Dragstedt et Lang (1957). D'après la littérature consultée, la DL50 de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* n'est pas encore déterminée.

Tableau 01 : Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats

Indice de toxicité	Classes de toxicité	DL50 par voie orale pour la souris ou le rat (dose unique)
1	Extrêmement toxique	< 1 mg/kg pc
2	Très toxique	1 à 50 mg/kg pc
3	Moyennement toxique	50 à 500 mg/g pc
4	Faiblement toxique	500 à 5000 mg/kg pc
5	Pratiquement non toxique	5000 à 15000 mg/kg pc
6	Relativement sans danger	> 15000 mg/kg pc

III.1.5. Paramètres biochimiques sériques

Afin de déceler d'éventuels effets toxiques de l'extrait étudié, le sang des souris survivantes après 14 jours d'expérimentation a été récupéré pour explorer certains paramètres biochimiques. Les paramètres sériques en relation avec la fonction hépatique (transaminases, phosphatase alcaline, protéines totales sériques et albumine) et la fonction rénale (créatinine, urée et acide urique) ont été déterminés. Ces analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire central du CHU de Sétif à l'aide d'un automate (Technicon, RA 1000).

III.1.6. Examens histologiques

Après sacrifice des souris, les reins et le foie sont récupérés et rincés rapidement avec une solution de NaCl à 0.9 % puis pesés pour être fixés dans du formol à 10 % pour une durée de 20 jours. Les coupes histologiques sont préparées au niveau du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Sétif. Dans un premier temps, les organes préalablement fixés, sont coupés en petits morceaux de 5 à 10 mm puis déshydratés par 3 passages successifs dans des bains d'éthanol (70-75 ; 90-95 et 100°C) pendant 30 min chacun. Les échantillons sont ensuite éclaircis 2 fois dans un bain à toluène pendant 20 min pour être inclus dans la paraffine à 2 reprises pendant 4 heures. Cette opération est automatisée à l'aide d'un automate (TISSUE-TEK® II°). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques contenant de la paraffine fondue par chauffage à 60°C. Après refroidissement, les blocs de paraffines obtenus sont coupés par un microtome (LEICA RM 2145). Les coupes de 5 µm d'épaisseur obtenues sont étalées sur des lames et séchées pendant 1 heure à 37°C pour être réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine.

III.2. Effet hémolytique

Le test de cytotoxicité est réalisé sur des globules rouges (GR) humains provenant de donneurs sains. Le taux d'hémolyse des GR est étudié à la fois par mesure de l'absorbance de l'hémoglobine (Hb) libéré et par comptage des cellules résiduelles après hémolyse.

Pour tester l'effet hémolytique de notre extrait, 7 concentrations (5, 10, 15, 25, 50, 100 et 200 mg /ml) ont été préparées dans du PBS isotonique à pH 7.4. Le sang de volontaires sains (3 ml) a été fraîchement prélevé dans des tubes héparinés. Les GR sont séparés du plasma par centrifugation à 4500 rpm/5 min. Le culot est lavé 3 fois avec 5 volumes du PBS. Pendant le dernier lavage, les érythrocytes sont centrifugés à 4500 rpm/3 min pour obtenir une préparation de cellules empaquetées. Les cellules lavées sont mises en suspension à nouveau dans un volume final de 20 ml de PBS (Muhammad *et al.*, 2013).

L'effet hémolytique de l'extrait aqueux a été évalué selon la méthode décrite par Powell *et al.* (2000) avec de légères modifications (figure 24). Des aliquotes de 540 µl de la suspension érythrocytaire sont mélangés avec 60 µl de solution de PBS contenant l'extrait aux différentes concentrations. Les échantillons sont mélangés délicatement puis incubés à 37°C/35 min dans un bain marie sous une légère agitation. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain de glace durant 5 min, puis centrifugé à 4500 rpm/5 min. Des volumes de 300 µl de surnageant sont dilués dans 2700 µl de PBS. La solution obtenue est utilisée pour suivre la fuite de l'hémoglobine par mesure des absorbances à 576 nm contre un contrôle positif (hémolyse totale avec l'eau distillée). Le PBS est utilisé comme contrôle négatif (0 % de lyse).

L'effet hémolytique peut être évalué également par comptage des GR résiduels après traitement avec l'extrait. Le dénombrement cellulaire est réalisé sur des cellules de Thoma. Après hémolyse, le culot de chaque essai est suspendu de nouveau dans le PBS pour un second dénombrement afin de déterminer le nombre de GR non hémolysés (Muhammad *et al.*, 2013).

Les lectures des essais sont réalisées en *triplicata* pour chaque concentration. Le taux d'hémolyse (H_{Hb}) est calculé selon la formule ci-dessous :

$$H_{Hb} (\%) = [A_t / A_c] \times 100$$

$H_{Hb} (\%)$: Taux d'hémolyse

A_t : Absorbance du test

A_c : Absorbance du contrôle positif

Le taux d'hémolyse cellulaire (H_C) peut être aussi calculé par comptage cellulaire selon la formule suivante :

$$H_C (\%) = [C_i / C_f] \times 100$$

$H_C (\%)$: Taux d'hémolyse cellulaire

C_i : Nombre de cellules avant hémolyse

C_f : Nombre de cellules après hémolyse

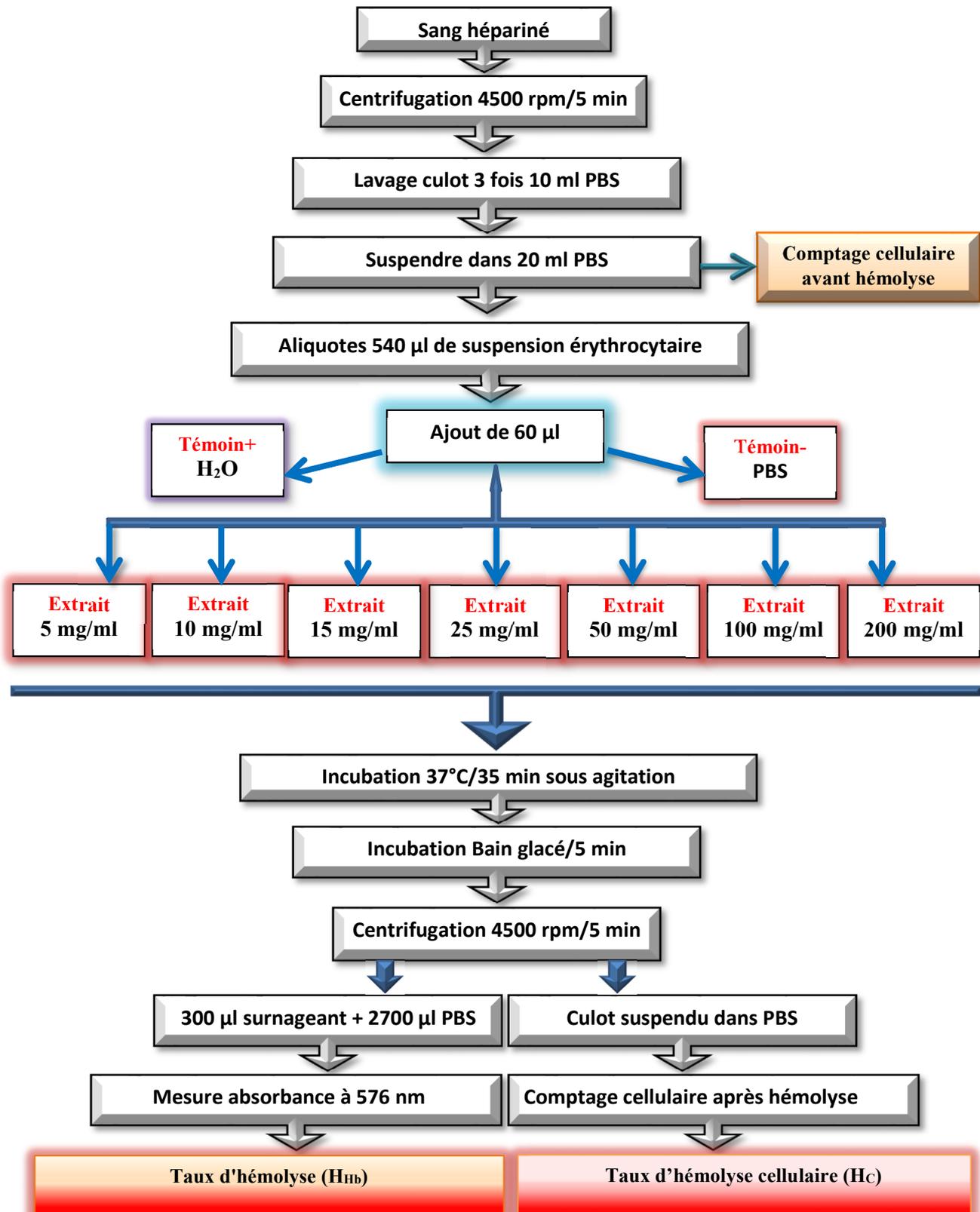


Figure 24 : Protocole expérimental de mesure de l'effet hémolytique.

IV. Etude de l'activité antioxydante

L'oxydation est reconnue pour être impliquée dans diverses pathologies ainsi l'usage d'extraits antioxydant s'avère très bénéfique. Le présent travail a pour but de mettre en évidence les propriétés antioxydantes de l'extrait des feuilles *L. guyonianum*. Les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante constituent une première approche pour déterminer le potentiel antioxydant d'un extrait. A l'heure actuelle, il existe une multitude de tests complémentaires qui contribuent tous dans la caractérisation de cette activité dite antioxydante, dont 5 ont été appliqués pour l'étude de notre extrait. L'étude *in vitro* a été appuyée par une étude *in vivo* en utilisant le nickel comme agent oxydant.

IV.1. Activité antioxydante *in vitro*

IV.1.1. Effet piègeur du radical DPPH•

Le DPPH• (2,2-phényl-1-picryl hydrazyl) est un radical libre de couleur violette qui est réduit en DPPH-H (2,2-phényl-1-picryl hydrazine), de couleur jaune, en présence de donneurs de protons. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire. Ce test est réalisé selon le protocole décrit par Que et al. (2006). Un volume de 500 µl de la solution de DPPH• 0.1 mM est ajouté à 500 µl des solutions de l'extrait ou du standard (BHT) à différentes concentrations, le mélange est vigoureusement agité puis laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Les absorbances sont lues à 517 nm contre un contrôle contenant un volume égal de méthanol et de DPPH•. Les essais sont réalisés en *triplicata* et les résultats sont exprimés en activité antiradicalaire.

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

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance de l'échantillon

La concentration minimale inhibitrice à 50 % (IC₅₀) est déterminée sur le graphe représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et du standard (Molyneux, 2004). Afin de mieux caractériser l'activité antiradicalaire calculée pour chaque concentration, 2 autres paramètres ont été déterminés à savoir la concentration effectrice à 50 % (EC₅₀) et le pouvoir antiradicalaire (ARP) qui n'est que l'inverse de l'EC₅₀.

$$EC_{50} = IC_{50} / \mu\text{g de DPPH}$$

IV.1.2. Test de réduction du radical-cation ABTS^{•+}

Le test de piégeage du radical ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) est basé sur la capacité d'un antioxydant de le réduire. En réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), l'ABTS forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à verte. L'ajout de donneur d'hydrogène permet de réduire ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurable à 734 nm (Marc et *al.*, 2004).

Ce test a été réalisé selon le protocole décrit par Re et *al.* (1999). Un volume de 30 µl d'extrait ou de méthanol sont additionnés à 2970 µl de solution d'ABTS^{•+}. L'absorbance est mesurée à 734 nm après 1 heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le radical ABTS est préalablement généré en mélangeant à volume égal d'une solution méthanolique de persulfate de potassium 3 mM et d'une solution méthanolique d'ABTS 8 mM, le mélange est placé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 16 h avant son utilisation (Awika et *al.*, 2005). La solution obtenue est diluée avec du tampon phosphate (0.2 M, pH 7.4) contenant 150 mmol/l de NaCl pour obtenir une absorbance de 1.5. Un volume de 2.9 ml de cette solution fraîchement préparée est ajouté à 0.1 ml d'extrait et l'absorbance est mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en activité antiradicalaire (IC₅₀) de la même façon que ceux décrits précédemment pour le test DPPH (Re et *al.*, 1999).

IV.1.3. Test de blanchissement du β-carotène

La capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de l'oxydation du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Le test est réalisé selon le protocole décrit par Tepe et *al.* (2005). Une émulsion β-carotène/acide linoléique est préparée par dissolution 0.5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme, auxquels sont additionnés 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement éliminé par évaporation à 40°C. Par la suite, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et l'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Enfin, 350 µl de la solution d'extrait sont ajoutés à 2.5 ml de cette émulsion et le mélange est incubé pendant 2 heures à 50 °C dans un bain-marie. Deux tubes témoins sont préparés : l'un contenant le BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 µl d'eau distillée. La décoloration de l'émulsion est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

Tous les essais sont réalisés avec 3 répétitions et l'activité antioxydante relative de l'extrait (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = [\text{A}_{\text{ech}} / \text{A}_{\text{BHT}}] \times 100$$

A_{ech} : Absorbance de l'échantillon après 48 heures

A_{BHT} : Absorbance du BHT après 48 heures

IV.1.4. Pouvoir réducteur (FRAP)

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) permet de mesurer la capacité antioxydante totale des extraits de plantes en évaluant la réduction du fer ferrique en fer ferreux (Pellegrini *et al.*, 2003). La formation d'une couleur bleue intense permet de réaliser les mesures du pouvoir réducteur à 700 nm.

Le pouvoir réducteur de l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par Li *et al.* (2007) qui consiste à mélanger 1 ml de l'extrait ou de BHT à différentes concentrations avec 2.5 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1 % (m/v). Le mélange est incubé pendant 20 min à 50°C, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % sont alors ajoutés pour stopper la réaction. Après centrifugation à 3000 rpm/10 min, 2.5 ml de surnageant sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer 0.1 % (FeCl_3) fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Les essais sont répétés trois fois et les résultats permettent de calculer graphiquement la concentration effectrice (EC_{50}).

IV.1.5. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice de l'extrait aqueux a été évaluée selon le protocole décrit par Li *et al.* (2007) basé sur le pouvoir inhibiteur de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine une fois que les échantillons sont traités avec les ions Fe^{2+} . Un volume de 700 μl de l'échantillon ou du standard (EDTA) à différentes concentrations sont mélangés avec 50 μl de FeCl_2 (0.6 mM) auxquels sont ajoutés 50 μl de ferrosine (5 mM) après une incubation de 5 min. Le mélange obtenu est bien agité puis incubé à température ambiante pendant 10 min. La complexation du fer résiduel génère un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) avec un maximum d'absorption à 562 nm. L'effet chélateur de l'extrait vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation.

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

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test

L'efficacité antioxydante de l'extrait peut être mieux caractérisée en exprimant l'activité chélatrice en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait, et en calculant la concentration qui produit 50 % d'effet chélateur (EC₅₀).

IV.2. Effet préventif de l'extrait contre l'hématotoxicité causée par le nickel

Récemment, plusieurs recherches scientifiques se sont orientées vers l'utilisation des substances bioactives comme les métabolites secondaires des plantes qui possèdent des propriétés antioxydantes et hématopréventives lors d'une toxicité induite par les métaux lourds, particulièrement le nickel (Das et *al.*, 2007 ; Tikare et *al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons testé l'effet antioxydant et protecteur de notre extrait contre l'hématotoxicité causée par le nickel chez des souris.

Trente souris mâles (*Mus musculus*) ont été utilisées pour l'étude de l'effet hématopréventif de l'extrait aqueux. Les souris (Institut Pasteur d'Alger) âgées de 60 et 75 jours et pesant 26 à 34 grammes, ont été réparties en 6 groupes (figure 25). Les souris du groupe 1 représentent les témoins ; le groupe 2 (contrôle négatif), souris traitées par une dose unique au chlorure de nickel (10 mg Ni/kg pc) par voie IP pour un test de toxicité aiguë de 24 heures (Chen et *al.*, 1998) ; le groupe 3 (contrôle positif), reçoit par gavage une dose quotidienne de 16.7 mg/kg pc de vitamine C (vit C) pendant 7 jours ; les groupes 4, 5 et 6 reçoivent l'extrait par voie orale en une seule dose de 50, 100 et 200 mg/kg pc respectivement pendant 7 jours. Au 8^{ème} jour, les groupes traités à la vit C et à l'extrait reçoivent 10 mg Ni/kg pc en injection IP. Après 24 heures de l'administration du nickel, les souris des différents lots sont décapitées le 9^{ème} jour et le sang est immédiatement recueilli dans des tubes EDTA.

La toxicité hématologique est mise en évidence par la détermination de la formule numérique sanguine (FNS) *via* automate (Coulter Swilab). Les paramètres recherchés sont respectivement les globules rouges (GR) et blancs (GB), l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), le volume globulaire moyen (VGM) et les plaquettes (Plt).

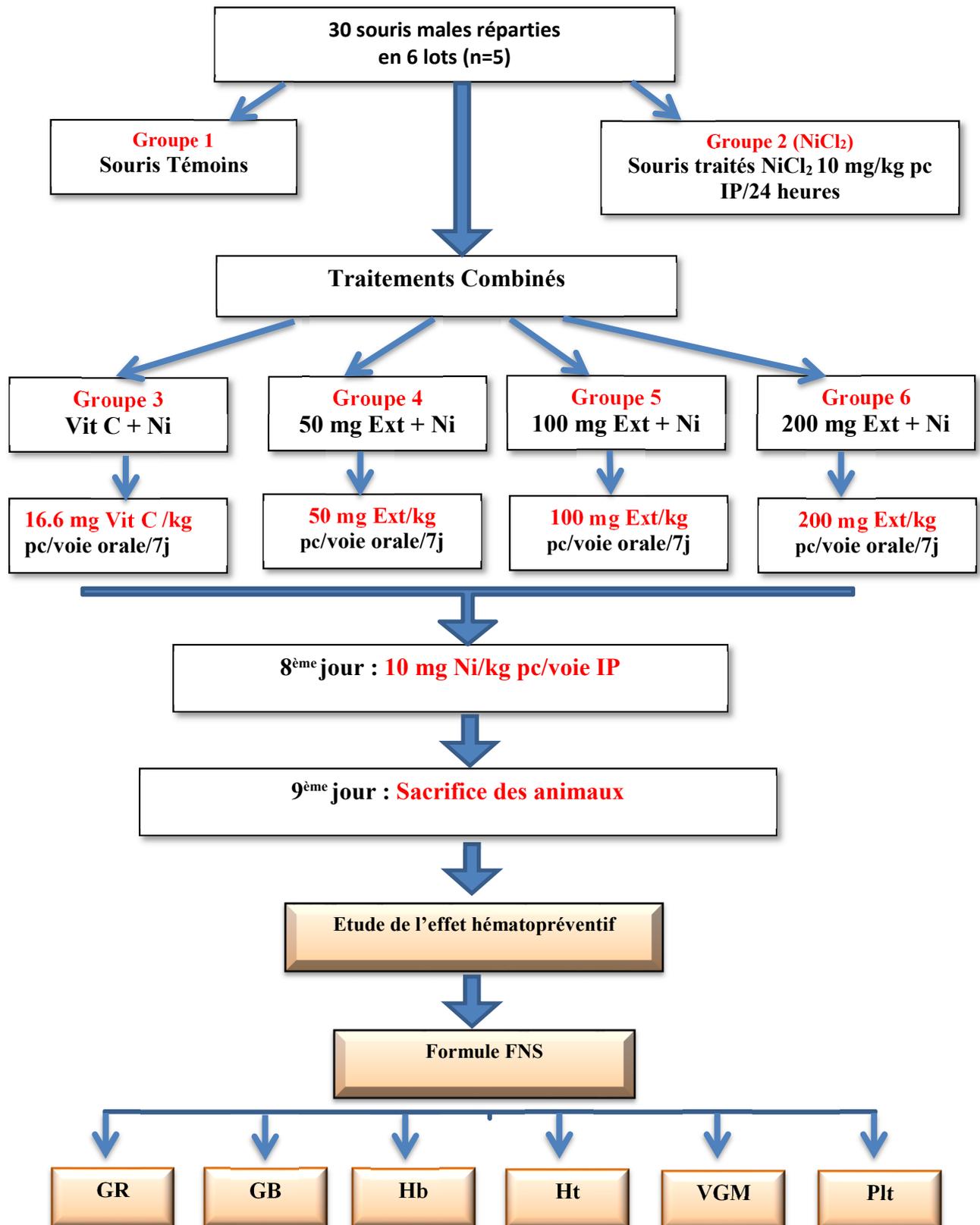


Figure 25 : Protocole expérimental de l'étude de l'effet hématopréventif de l'extrait vis-à-vis le nickel

V. Activité anti-inflammatoire

V.1. Œdème de la patte du rat induit par la carragénine

L'œdème de la patte du rat a été induit selon la méthode décrite par Winter et al. (1962) par l'injection de 0.1 ml de la carragénine 1 %, sous le coussinet plantaire de la patte postérieure droite du rat. L'œdème causé par cet agent phobogène sera traduit en volume et mesuré par un pléthysmomètre (7140 Ugo basile, Italie). Des rats repartis en lots de 5, sont mis à jeun 16 heures avant expérimentation. Les groupes traités ont reçu par voie orale l'extrait aqueux aux doses de 50, 100 et 200 mg/kg pc. Le diclofénac a été utilisé comme anti-inflammatoire de référence à la dose de 5 mg/kg pc, une heure avant l'induction de l'inflammation. Les rats du groupe témoin positif reçoivent de l'eau distillée. L'évolution de la taille de l'œdème est suivie par la mesure du volume de la patte enflammée toutes les heures, jusqu'à la 5^{ème} heure après l'administration de la carragénine. L'effet anti-inflammatoire est déterminé par le calcul du pourcentage d'inhibition de l'inflammation.

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

% INF : pourcentage d'inhibition de l'inflammation

Δ Témoin = (V_T-V_O)_t : volume de l'œdème du témoin

Δ Traité = (V_T-V_O)_{tr} : volume de l'œdème du traité

V_T : volume de la patte à l'instant t

V_O : volume de la patte avant induction de l'inflammation

V.2. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris

Ce test a été réalisée selon la méthode décrite par Manga et al. (2004). L'inflammation est provoquée par application locale de 15 µl d'une solution acétone/eau (1 :1) contenant 80 µg d'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite des souris. Cette étude a été réalisée sur des souris femelles repartis en 5 lots de 8 souris. Le lot témoin non traité a reçu uniquement l'agent phlobogénique, le lot traité par l'anti-inflammatoire de référence indométacine à raison de 0,5 mg/oreille et les 3 derniers lots traités par l'extrait ont reçu localement 0.5, 1 et 2 mg d'extrait/oreille. L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital juste après l'induction de l'inflammation et 6 heures après le traitement. La différence de l'épaisseur est mesurée et le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé par rapport au groupe témoin.

$$\% \text{ Inhibition} = [\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}] \times 100$$

VI. Activité analgésique

L'activité analgésique périphérique et centrale de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* ont été étudiées.

VI.1. Activité analgésique périphérique

L'activité analgésique périphérique de l'extrait aqueux a été réalisée par deux méthodes différentes. La 1^{ère} en appliquant le test de torsion et la 2^{ème} directe par analgésimètre.

VI.1.1. Test de torsion

La recherche d'une action analgésique périphérique a été menée selon le protocole décrit par Koster et al. (1959), qui consiste à induire une action algogène par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique (1%) à des rats. Cette injection provoque un syndrome douloureux qui se traduit par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales. Ce test, communément appelé writhing test, permet de détecter et d'évaluer l'effet protectif de l'extrait vis-à-vis de ces crampes induites. Les rats préalablement mis à jeun pendant 18 h sont répartis en des lots de 5 rats chacun. Le lot témoin a reçu de l'eau distillée, les 3 lots traités ont reçu l'extrait (50, 100 et 200 mg/kg pc) par voie orale et le 5^{ème} lot a reçu du paracétamol (100 mg/kg pc). Une demi-heure après le traitement, les animaux ont reçu par voie IP l'acide acétique 1 % à la dose de 10 ml/kg. Après 5 min de l'injection, chaque rat est observé individuellement et l'effet analgésique est apprécié par le dénombrement de ces crampes pendant 20 min. Le pourcentage d'inhibition des crampes est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{Nb témoin} - \text{Nb traité}) / \text{Nb témoin}] \times 100$$

Nb témoin : nombre de crampes des rats témoins

Nb traité : nombre de crampes des rats traités

VI.1.2. Méthode analgésimétrique directe

Afin de démontrer des propriétés analgésiques de l'extrait aqueux, la méthode de Kissin et al. (2000) a été utilisée. Ce test consiste à induire une douleur par la pression exercée sur la patte postérieure des animaux à l'aide d'un algésimètre (37215, Ugo basile, Italie). Cet appareil induit une douleur dont l'intensité augmente avec le coulissement. L'intensité seuil qui permet à l'animal de retirer sa patte posée sur le socle de l'appareil est notée. Une substance antalgique

devrait augmenter cette intensité ainsi que le temps de réaction de l'animal par rapport au témoin. Des rats mâles et femelles répartis en lots de cinq ont été mis à jeun 18 heures avant l'expérimentation. Le lot témoin a reçu de l'eau distillée, tandis que les autres lots ont reçus par gavage l'extrait (50, 100 et 200 mg/kg pc). Les rats du dernier lot ont été traités avec le paracétamol à la dose de 50 mg/kg pc. Une heure plus tard, la patte postérieure droite des animaux est placée sur le socle de l'algésimètre et le seuil de sensibilité est déterminé.

$$T = F/\alpha$$

T : seuil de sensibilité de l'animal

F : intensité lue sur l'algésimètre

α : vitesse de coulissement de l'aiguille

VI.2. Test du Tail Flick

L'activité analgésique centrale de type morphine a été étudiée en utilisant le test de Tail Flick (Yam et *al.*, 2008), qui consiste à étudier le réflexe de retraitement de la queue de l'animal d'une eau chauffée à 55°C, avant et après l'administration de l'extrait supposée analgésique. Avant la constitution des lots, le temps de réaction normal du réflexe a été déterminé (2 s) et une présélection des animaux a été réalisée où seuls les souris ayant un temps de réflexe inférieur ou égal à 2 s ont été retenues pour le reste de l'expérience. Ce temps représente en réalité le seuil d'inhibition de la douleur, selon Alaoui et al. (1998) un temps supérieur à 2 secondes révèle une action analgésique centrale « morphine-like ». Des souris femelles et non gravides sont réparties en 5 lots homogènes de 8 souris chacun. Les souris des lots traités ont reçu l'extrait aqueux par voie orale (50,100 et 200 mg/kg pc) et la substance de référence morphine 5mg/kg pc en IP 30 min avant le début du test, ces derniers sont préalablement solubilisés dans l'eau physiologique. Le lot témoin a parallèlement reçu de l'eau physiologique par gavage. Le temps de réflexe de retraitement de la queue est mesuré 15, 30, 45, 60, 90 et 120 mn à partir de la première demi- heure après traitement.

VII. Activité Antipyrétique

L'effet antipyrétique de l'extrait a été étudié en mesurant son pouvoir inhibiteur de la fièvre induite chez de le rat par l'administration IP d'une solution de levure de bière à 20 % à la dose de 20 mg/kg pc. Les rats sont mis à jeun 18 heures avant le test et ils reçoivent la levure de bière. Les températures rectales initiales sont enregistrées et les rats ayant montré une augmentation de 0.5°C de la température rectale sont retenus pour la suite de l'étude. Des lots de 5 rats chacun ont reçu *per os* soit l'eau distillée, soit l'extrait aqueux (50, 100 et 200 mg/kg pc) soit le paracétamol (150 mg/kg pc). Après traitement, les prises de température sont effectuées toutes les heures pendant 4 heures (Nidhi et *al.*, 2015).

VIII. Activité thrombolytique

Afin de mettre en évidence le pouvoir thrombolytique de l'extrait en *ex vivo*, un modèle de caillots sanguins est utilisé (Singh et *al.*, 2011). Des volumes de 5 ml de sang de donneurs sains (12 âgés de 20 à 25 ans), ne souffrant pas d'hémopathies et n'ayant pas reçus de contraceptifs oraux ou un traitement anticoagulant ont été prélevés (Kawsar et *al.*, 2011). Le sang recueilli est directement coulé dans des boîtes de Pétri dans lesquelles sont placées verticalement des tiges en verre appropriées au centre des boîtes. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques de coagulation, le sang est laissé coaguler pendant 2 heures. Après, le sérum est discrètement éliminé et les tiges en verre sont doucement retirées du caillot donnant naissance à des puits concentriques. Pour tester l'effet de l'extrait sur la lyse des caillots, 3 concentrations 5, 10 et 15 mg/ml sont utilisées. La dissolution des caillots est observée visuellement chaque heure après dépôt de l'extrait jusqu'à la 7^{ème} heure. Le témoin reçoit de l'eau distillée stérile.

La méthode utilisée pour la mesure de l'activité thrombolytique de l'extrait aqueux est celle décrite par Prasad et *al.* (2006) et qui consiste à provoquer la formation *in vitro* d'un caillot sanguin et d'évaluer l'effet de l'extrait de la plante sur sa lyse (figure 26). À partir d'une solution mère, 3 concentrations de l'extrait 5, 10 et 15 mg/ml sont utilisées. Un volume de 500 µl de sang frais est introduit dans des tubes eppendorf pesés (p₁). Afin de rapprocher le plus possible les conditions expérimentales à l'application visée, la coagulation se fait à 37°C pendant 45 min. Après incubation, le surnageant est éliminé et les tubes sont pesés (p₂) ce qui permettra de déterminer le poids (PC_a) des caillots formés (Sarker et *al.*, 2012). Un volume de 100 µl de chaque concentration d'extrait est ajouté aux tubes qui sont réincubés de nouveau à

37°C pendant 90 min. Le liquide formé est éliminé, les tubes sont pesés (p_3) et le poids de caillot après la lyse est calculé (PC_b). Parallèlement, un témoin négatif contenant l'eau distillée stérile à la place de l'extrait étudié et un témoin positif renfermant la substance de référence la Streptokinase 30,000 UI (Sanofi-Aventis) ont été réalisés dans les mêmes conditions (Chowdhury et *al.*, 2011). Les essais ont été répétés trois fois avec les échantillons de sang des 20 volontaires.

L'efficacité thrombolytique est évaluée par mesure de la perte de poids des caillots, après élimination des surnageants, les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage de thrombolyse (Sarker et *al.*, 2012).

$$\% \text{ de thrombolyse} = [PC_b / PC_a] \times 100$$

PC_a : poids de caillots avant la lyse $PC_a = P_2 - P_1$

PC_b : poids de caillots après la lyse $PC_b = P_3 - P_1$

La mesure du pouvoir lytique des caillots sanguins des différentes concentrations de l'extrait permet de déterminer les concentrations dites efficaces. Une étude cinétique est menée dans le but d'étudier l'activité thrombolytique de ces concentrations (10 et 15 mg/ml) pour différents temps d'action : 24, 48 et 72 heures (Elumalai et *al.*, 2012). Le même protocole expérimental a été appliqué où la seule variante était le temps de réaction (incubation).

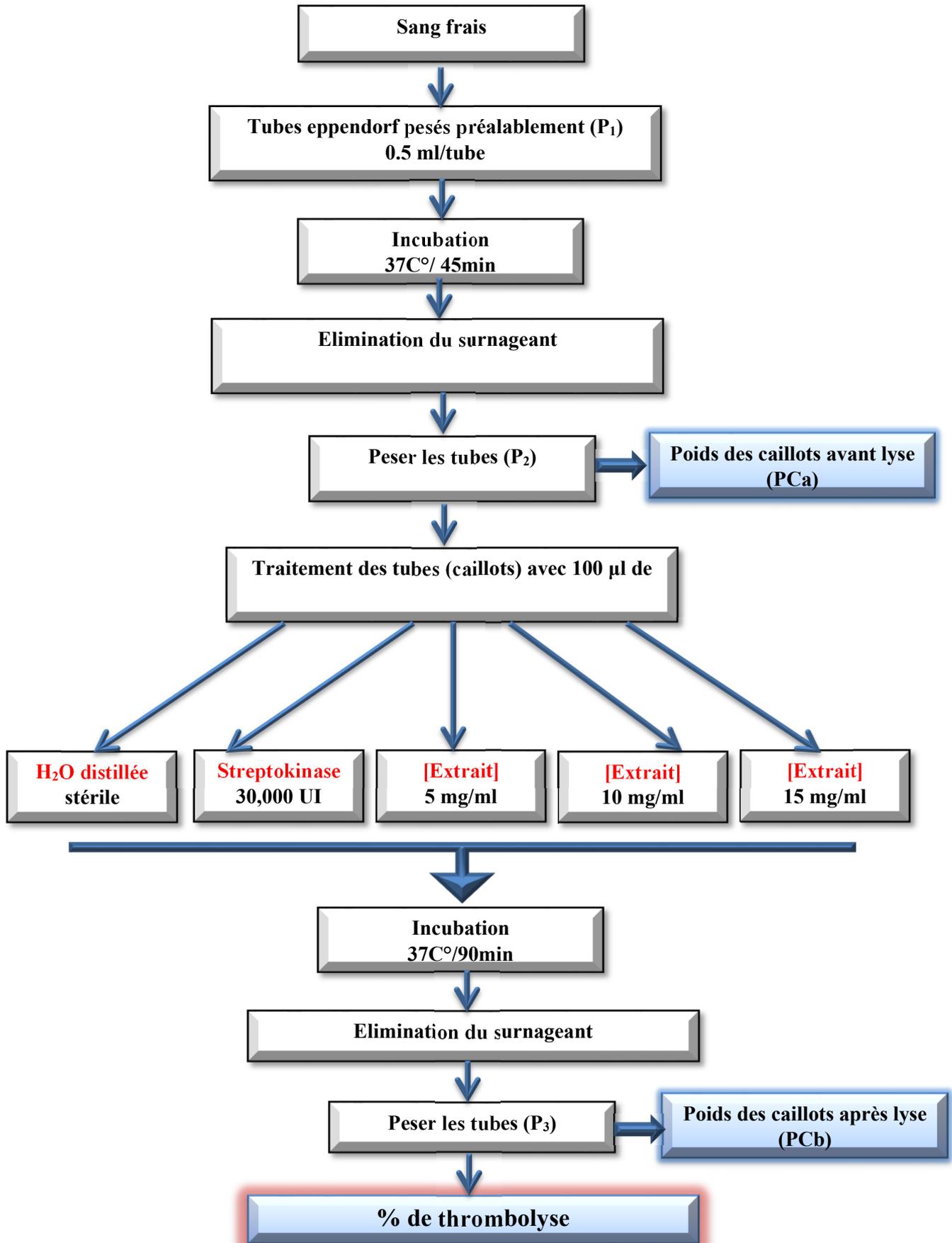


Figure 26 : Protocole expérimental de la mesure de l'activité thrombolytique.

IX. Activité antibactérienne

Le test antimicrobien est réalisé par la méthode des disques. Six souches bactériennes pathogènes référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC) Gram+ et Gram- ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait (tableau 02). Toutes les souches nous ont été aimablement fournies par le Pr. Zerroug M du laboratoire de Microbiologie Appliquée (faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Sétif 1). La gélose nutritive a été utilisée pour l'isolement et la conservation des souches bactériennes et la gélose Muller-Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'extrait aqueux des feuilles de la plante.

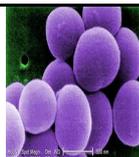
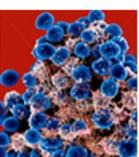
Les souches bactériennes ont été réactivées afin d'obtenir des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle. Elles ont été repiquées sur gélose nutritive et incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure ont été prélevées et suspendues dans 10 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une turbidité équivalente à 0.5 McFarland (Bauer et *al.*, 1966). Ces suspensions serviront aux ensemencements par écouvillonnage.

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux vis-à-vis des bactéries testées, la méthode des disques a été appliquée (Bauer et *al.*, 1966). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode des microdilutions en milieu solide. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact de l'extrait sur les souches bactériennes (tableau 03).

Tableau 03 : Echelle de sensibilité des germes (Ponce et *al.*, 2003)

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
0	0	Résistant
< 8	-	Non sensible
9 < Ø < 14	+	Sensible
15 < Ø < 19	++	Très sensible
> 20	+++	Extrêmement sensible

Tableau 02 : Souches bactériennes testées

Souche	Référence	Type de bactérie	Famille	Pathologies causées	Référence bibliographique
 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352	Gram-	Enterobacteriaceae	Pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %).	Janda et Abbott (2006)
 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram+	Staphylococcaceae	Intoxications alimentaires Infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques).	Becker et al. (2004)
 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 2035	Gram+	Enterococcaceae	Bactéries pathogènes connues comme les plus résistantes aux antibiotiques. Ils causent des infections cliniques importantes comme les infections des voies urinaires, nosocomiales et d'endocardites	Van Tyne et al. (2013)
 <i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 533	Gram+	Micrococcaceae	Bactérie systématiquement non pathogène mais elle peut le devenir chez les personnes immunodéprimées. Elle peut alors se rendre responsable d'abcès intracrâniens, de pneumonie, d'endocardite, d'arthrite septique ou encore de méningite.	Richard et al. (1979)
 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Gram+	Bacillaceae	Toxi-infections alimentaires, infections opportunistes locales ou systémiques.	Drobniewski (1993)
 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Gram+	Staphylococcaceae	Infections cutanées, infections nasales comme des sinusites et des infections urinaires chez la femme et l'homme.	Otto (2009)

IX.1. Méthode des disques

La gélose de Muller-Hinton en surfusion est aseptiquement coulée dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Après solidification, un écouvillon stérile imbibé par la suspension bactérienne est étalé à la surface de la gélose à 3 reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution homogène de l'inoculum. La concentration de l'inoculum est équivalente à 0.5 McFarland (10⁸ colony forming units [UFC] / ml).

Le pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux est recherché en utilisant 4 concentrations différentes (10 %). À 3 points équidistants du centre de la boîte, sont déposés stérilement sur la gélose inoculée des disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Wattman n°1) imprégnés d'extrait. Les disques témoins sont imprégnés de DMSO. Les essais sont réalisés en *triplicata* dans les mêmes conditions expérimentales. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C. L'effet de l'extrait sur les bactéries est évalué par mesure des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse digital. Les concentrations en extrait ayant induit une zone d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque sont considérées comme ayant une activité antibactérienne.

IX.2. Méthode des microdilutions en milieu solide

L'effet bactériostatique de notre extrait est évalué en déterminant la CMI par la méthode des microdilutions (De Billerbeck et *al.*, 2002). La CMI est la plus petite concentration en extrait pour laquelle la croissance bactérienne n'est plus visible *in vitro* (Remmal et *al.*, 1993 ; Skandamis et Nycha, 2001). Une solution mère d'extrait de la plante est préparée à raison de 10 mg/ml (10 %) à partir de laquelle 4 dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) sont réalisées dans du DMSO pour obtenir des concentrations allant de 10 à 0.625 mg/ml. Des disques de papier wattman n°1 de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec 10 μ l de chaque dilution puis déposés stérilement à la surface du milieuensemencé par une suspension bactérienne.

X. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD pour les tests *in vitro* et moyenne \pm SEM pour les tests *in vivo*. Les comparaisons des résultats des contrôles et ceux des différents essais ont été fait par le test de Tukey pour les comparaisons multiples en utilisant le logiciel Graph Pad. Prism (version 5.00). Le test ANOVA univariée a été appliqué sur les résultats de l'étude de l'effet contre l'hématotoxicité du nickel. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ($p \leq 0.05$).

Résultats
et
Discussion

I. Analyses phytochimiques

I.1. Taux d'humidité

L'estimation du taux d'humidité nous a permis dans un premier temps de suivre l'opération de séchage des feuilles de *L. guyonianium*. Cette analyse a été effectuée juste après la récolte de la plante en mois d'Avril et qui a donné un taux d'humidité relativement élevé de 40.34 %. Ce résultat est en concordance avec les données de la littérature concernant les plantes halophiles (Flowers et Colmer, 2015) et qui vivent à proximité du Chott. La teneur élevée en eau montre que sur le plan écologique, la plante est en équilibre avec son milieu environnemental riche en sels.

I.2. Teneurs en matière organique et minérale

L'incinération à 550 °C pendant 4 heures dans un four à moufle permet d'obtenir les cendres, qui représentent la quantité totale en sels minéraux présents dans l'échantillon. Cette teneur est exprimée en pourcent de matière sèche (MS). La teneur des feuilles de *L. guyonianium* en cendre est de 24.71 % et par conséquent, la teneur en matière organique est de 75.29 %. Ce taux de matière minérale relativement élevé, est une caractéristique des halophytes et une forme d'adaptation de la plante à la forte salinité du sol.

La capacité des halophytes à tolérer les sels et par conséquent à vivre sur les sols halomorphes est basée sur une régulation très fine de la concentration et de la distribution des ions. De nombreux mécanismes de régulation du contenu en sels ont été rapportés, leur importance varie d'un halophyte à l'autre (Berthomieu et *al.*, 2003). Ces mécanismes comprennent l'élimination active du sel par des structures spécialisées : les glandes à sel, le dépôt du NaCl dans les grandes cellules des poils, la perte d'organes chargés des ions indésirables. A côté de ces processus, les halophytes peuvent empêcher l'absorption excessive de sels au niveau des racines et de la partie inférieure de la tige.

Les cendres ont des compositions très variées, influencées par la nature de l'espèce végétale sélectionnée, la partie prélevée, la saison et le sol ou les végétaux ont poussé (Brill, 1999) comme le montre le tableau 04.

Tableau 04 : Teneurs en cendres de *L. guyonianum*

Partie utilisée	Saison de récolte	Région de provenance	Taux en cendres	Référence
Plante entière	Mars-Juin 2006	Sud Tunisie	36.8	Laudadio et al. (2009)
Feuilles et bronches tendres	Moyenne annuelle	Sahara septentrional	22.89	Chehma (2005)
		algerien	27.59	
Partie aérienne	mi-Mars	Sud-Est	15.0	Haddi et al. (2003)
	Début Mai	Algérie	22.6	
	mi-Juin	Sols salés	29.1	

La teneur en cendres des feuilles de notre plante (24.71 %) est presque du même ordre de celles obtenues en 2005 par Chehma (tableau 04) qui a utilisé les feuilles et les bronches tendres. De même, Haddidi et al. (2003) en travaillant toujours sur la partie aérienne récoltée en mi-Mars, début Mai et mi-Juin ont trouvé respectivement des taux de 15.0, 22.6 et 29.1 % ce qui montre que la teneur en cendres varie en fonction du stade de croissance et du climat. Selon Spear (1994), la concentration des éléments minéraux dans les plantes varie fortement avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de la récolte. Par contre, nos résultats semblent être relativement inférieurs comparés aux résultats trouvés par Laudadio et al. (2009) au Sud tunisien (tableau 04). La nature et la composition chimique du sol pourraient être à l'origine de cette différence (Khiari et al., 2010).

I.3. Teneur en substances extractibles

Les teneurs en substances extractibles par décoction, par infusion et par macération (dans l'acétone et le méthanol) ont été réalisées afin de retenir le meilleur mode d'extraction à utiliser dans cette étude. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Rendement en extractibles des feuilles de *L. guyonianum*

Paramètres	Type d'extraction	Durée	Teneurs (%)
Substances extractibles par l'eau	Infusion	15 min	16
	Décoction		15.5
Substances extractibles par les solvants organiques	Macération méthanol	24 heures	7.5
	Macération acétone		2.0

D'après ces résultats, l'extraction des composés bioactifs des feuilles de *L. guyonianum* avec l'eau sont meilleurs par rapport aux solvants organiques. Les solvants non-polaires extraient majoritairement les substances apolaires (huiles, graisse, terpènes) alors que les solvants polaires solubilisent les composés polaires tels que les polyphénols. Ainsi, l'eau, la plus polaire, permet l'extraction préférentielle des composés polaires comme les flavonoïdes di-, tri- et tétra-glycosylés (Jones et Kinghorn, 2012). Lors d'une extraction par l'eau chaude, on peut obtenir des tanins et des terpénoïdes (King et Bott, 2012). Le méthanol, qui est un solvant polaire et miscible avec l'eau, permet l'extraction de composés polaires comme les alcaloïdes, les flavones et les polyphénols.

I.4. Tests phytochimiques

Après obtention des extractibles, nous avons réalisé un criblage phytochimique de l'extrait afin d'identifier qualitativement les différentes familles de composés présentes. Selon la famille de molécules recherchée, le test a été réalisé soit directement avec la poudre végétale, soit après infusion. Les résultats de ce screening permettent d'avoir une idée sur les activités biologiques et/ou toxicologiques probables. Ces tests colorimétriques sont basés sur l'interaction de certaines fonctions avec les réactifs utilisés.

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- Une réaction négative est représentée par : –

Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins, de saponines, de substances quinoniques libres ou combinées, de stérols et de polyterpènes et l'absence de coumarines, d'anthocyanes et d'alcaloïdes (tableau 06).

Le test de mise en évidence des polyphénols a donné une coloration bleu noirâtre intense montrant la richesse des feuilles de la plante en polyphénols. De sa part, le test des flavonoïdes s'est révélé positif avec l'apparition de la coloration rouge. L'apparition d'une coloration bleu-noire intense indique la présence abondante des tanins.

La formation de mousse après agitation de l'infusât et l'eau distillée et sa persistance après 15 min de repos avec une hauteur supérieure à 1.2 cm montre la richesse relative des feuilles en saponines. Par ailleurs, le test de révélation des alcaloïdes s'est avéré négatif.

L'extrait contient également des composés quinoniques puisque la phase aqueuse a viré au rouge-violet.

La présence des stérols et des polyterpènes a été aussi démontrée mais ils sont moins abondants que les autres familles chimiques révélées. La réaction de mise en évidence des anthocyanes a donné un résultat négatif. De même, le test phytochimique préliminaire de recherche des coumarines n'a donné aucun résultat positif ceci est en accord avec les résultats de Hamidi (2013) selon lequel cette classe de métabolites secondaires est absente de *L. guyonianum*.

Les résultats de cette caractérisation phytochimique primaire typiquement qualitative montrent que les feuilles de *L. guyonianum* possèdent une quantité appréciable de polyphénols et en particulier de tanins. Ces tanins se retrouvent chez toutes les espèces du genre *Limoniastrum*. Il en est de même pour les flavonoïdes qui semblent être aussi abondants.

Les travaux de Hamidi (2013) sur les feuilles *L. guyonianum* récoltée en mois de Mars de la région de Touggourt de la wilaya de Ouargla (Algérie), ont montré la présence des mêmes familles de composés, exception faite pour les alcaloïdes et les tanins qui étaient moins abondants par rapport au notre. En plus, il a noté l'absence des cardénolides. Nos résultats vont en concordance avec ceux de Hadjadj et al. (2015) qui ont constaté l'absence de tanins galliques et la présence de tanins cathéchiques et des anthracenosides hétérosides.

Tableau 06 : Résultats des tests phytochimiques

Composés recherchés	Réactifs d'identification	Partie utilisée	Indicateur	Résultat
Polyphénols	Chlorure ferrique FeCl ₃ (2%)	Extrait	Coloration bleu noirâtre ou vert plus ou moins foncée	 +++
Flavonoïdes	HCl Copaux de Magnésium	Extrait	Couleur rouge ou orange	 +++
Tanins	Butanol chlorhydrique	Poudre de feuilles	Coloration rouge intense	 +++
Saponosides	Indice de mousse	Infusât	Mousse persistante	 ++
Anthocyanes	Ammoniaque	Extrait	Coloration bleue	 -
Coumarines	Fluorescence	Extrait chloroformique	Fluorescence	 -
Quinones libres et combinés	Réactif de Borntraegen	Infusât	Coloration rouge ou violette	 +++
Stérols et polyterpènes	Réactif de Liebermann	Extrait	Anneau pourpre et violet	 +
Alcaloïdes	Réactif de Dragendorff	Infusât	Précipité brun rougeâtre	 -

I.5. Extraction

L'extraction est l'étape principale dans la récupération et l'isolement des composés phytochimiques bioactifs. Elle est influencée par le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules l'échantillon, ainsi que la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007).

Le rendement d'extraction exprimé en pourcent de matière sèche (% MS) montre clairement que l'eau donne des rendements très appréciables de 22.25 %. Ce rendement relativement grand pourrait être aussi expliqué selon Levizou et al. (2004) et Stalikas (2007) par la grande polarité de l'eau, le rapport échantillon/solvant, le temps d'extraction, la granulométrie de la poudre utilisée, la température et l'agitation durant l'extraction, en plus de l'origine de la plante qui peut avoir un grand effet.

En matière de rendement en extraits aqueux secs à partir de la plante d'étude ou des espèces voisines, très peu de données bibliographiques sont disponibles pour cette espèce. Les extraits phénoliques contiennent généralement des mélanges de classes de composés phénoliques solubles dans le solvant utilisé. La solubilité de ces derniers est gouvernée par la polarité du solvant utilisé et de leur degré de polymérisation (Naczki et Shahidi, 2004). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que des molécules de polarité élevée occupent une place importante au sein des métabolites secondaires des feuilles de *L. guyonianum*.

L'eau permet l'extraction d'une grande variété de composés comme les anthocyanines, l'amidon, les tanins, les saponines, les terpénoïdes, les polypeptides, les lectines (Cowan, 1999) ainsi que les formes hétérosidiques des composés phénoliques (Bruneton, 2005).

I.6. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes et les tanins, sont des métabolites secondaires impliqués dans de nombreux processus physiologiques et doués d'activités biologiques multiples. Dans le présent travail, leur dosage a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, de la disponibilité du réactif de Folin et elle est bien standardisée.

Une moyenne de 64.3 µg de polyphénols totaux par mg d'extrait sec de plante est obtenue, soit 6.4 % du poids sec de l'extrait et 1.4 % de la masse sèche de la poudre de plante.

En Algérie, très peu de travaux se sont intéressés aux polyphénols des feuilles ou des autres organes de *L. guyonianum* malgré sa richesse en composés phénoliques. Selon les résultats de Hamidi (2013) les teneurs en polyphénols des extraits méthanolique et acétonique étaient respectivement 1.78 et 3.07 µg EAG/mg MS. Cependant, Ziani et al. (2015) ont trouvé une valeur largement supérieure à la nôtre (262 µg EAG /mg Ex) dans l'extrait aqueux obtenu par infusion des feuilles de *L. guyonianum*. Plus récemment, Belfar et al. (2015) ont obtenu des valeurs allant de 113.9 pour l'extrait d'acétate d'éthyl à 915.1 µg EAG/g MS pour l'extrait butanolique de la partie aérienne de *L. guyonianum* de la région de Ouargla et d'El-Oued.

D'après Ksouri et al. (2012), la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *L. guyonianum* tunisienne est estimée à 99 µg EAG/mg. Cette teneur pour l'extrait acétonique ne dépasse pas 55.25 µg EAG/mg Ex (Trabelsi et al., 2013a). Les recherches menées sur la plante entière de Tunisie comme ceux de Debouba et al. (2013) rapportent une teneur de 217.8 µg EAG/mg Ex méthanolique. Mohammed et al. (2013) en Libye ont utilisé 3 solvants de polarité différente le chloroforme, l'acétate d'éthyl et l'éthanol et ont montré que l'extrait éthanolique possède une teneur en polyphénols de 361.0 µg EAT/mg Ex, un taux 9 fois plus élevé que celui de l'acétate d'éthyl (40 µg EAT/mg Ex) et 36 plus que celui du chloroforme (5.85 µg EAT/mg Ex).

Les teneurs en composés phénoliques sont influencées par le type de solvant d'extraction. En effet, l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *L. monopetalum* est presque 3 fois plus riche en polyphénols (Ksouri et al., 2012) que l'extrait hydroacétonique de la même plante (Trabelsi et al., 2013b). D'après Medini et al. (2015), l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *L. densiflorum* contient 56.18 µg EAG/mg Ex de polyphénols totaux, soit 4 fois plus que l'extrait aqueux de la même partie de cette plante (Mednini et al., 2014). Selon Shikanga et al. (2010), la quantité des polyphénols varie considérablement en fonction des espèces. La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été aussi rapportée par plusieurs auteurs (Brunet et Hoste, 2006 ; Falleh et al., 2011). L'origine de la plante et les conditions climatiques et plus particulièrement la salinité pour les halophytes stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Ksouri et al., 2007 ; Falleh et al., 2008).

En outre, plusieurs auteurs signalent qu'il y a une différence significative des teneurs phénoliques au sein d'une même espèce en fonction de son origine et son habitat, ceci a été confirmé par Sanchez-Rodriguez et al. (2011). Cette variabilité est probablement liée aux conditions environnementales sévère telles que, le type du sol, la salinité, les faibles

précipitations et le stress hydrique ce qui peut induire la synthèse de composés phénoliques comme une réponse au stress oxydatif générée par la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

I.7. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandue dans le règne végétal. Ils constituent la classe polyphénolique la plus importante qui compte à elle seule plusieurs milliers de molécules réparties entre plus de 10 classes avec plus de 5000 composés (Gomez-Caravaca et al., 2006). Les résultats de ce dosage ont montré que l'extrait des feuilles de cette plante halophyte renferment des quantités intéressantes en flavonoïdes équivalent à 34.1 µg EQ/mg Ex.

Au vu des données de la littérature, nous notons que la teneur en flavonoïdes totaux varie pour la même plante en fonction de la région de provenance, du solvant d'extraction et de l'organe utilisée. Dans ce contexte, Belfar et al. (2015) ont constaté que l'extrait butanolique et d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *L. guyonianum* récoltée de la région de Ouaregla et d'El Oued, renferment des proportions différentes en flavonoïdes et qui sont respectivement 13.44 et 2.85 mg EQ/100 g MS. De même, Krifa et al. (2013a) a montré la richesse remarquable de l'extrait aqueux des galles de *L. guyonianum* en flavonoïdes 460 µg EQ/mg Ex ce qui représente 48.11 % de l'extrait.

Cette variabilité est aussi constatée pour des espèces du même genre et certaines autres très voisines. En effet, Trabelsi et al. (2013a) ont montré la richesse de *L. guyonianum* (8.36 µg CE/mg Ex) en flavonoïdes par rapport à *L. monopetalum* (6.22 µg CE/mg Ex). Par contre, les deux halophytes *Mesembryanthemum crystallinum* (156.12 µg EQ/mg Ex) et *Anabasis articulate* (121.08 µg EQ/mg Ex) se sont avérées plus riches en flavonoïdes par rapport à *L. guyonianum* qui ne contient que 101.32 µg EQ/mg Ex (Mohammed et al., 2013). En revanche, Debouba et al. (2013) affirment que le contenu en flavonoïdes de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne *L. guyonianum* (50.20 µg EQ/mg Ex) dépasse significativement celui de *L. monepetalum* (42.26 µg EQ/mg Ex).

El Haci et al. (2009) ont rapporté des teneurs de 129.33 µg CE/mg Ex pour les feuilles de *L. feei* de la région de Naâma en utilisant le méthanol 70% comme solvant d'extraction, valeur 2 fois plus supérieure à celle obtenue en 2012 (60.35 µg CE/mg Ex) en utilisant le méthanol comme solvant (El Haci et al., 2012). Toujours en travaillant sur les feuilles de *L. feei* mais de la région de Béchar, Keffous et al. (2016) ont trouvé une teneur de 54.77 µg EQ/mg Ex

aqueux, une valeur qui se rapproche de celle obtenue par El Hacı et al. (2012). Dans leurs travaux sur 4 extraits de *L. delicatulum* obtenus par des solvants de polarité croissante, l'hexane, l'acétone 80%, l'éthanol 90%, le méthanol/eau 80% et l'eau, Mednini et al. (2014) ont trouvé des teneurs respectives de 0.07, 15.09, 5.55 et 2.62 µg CE/mg Ex. Ces valeurs diffèrent considérablement de celles obtenues par Khedher et al. (2014) pour les extraits chloroformique (7.06 µg EQ/mg Ex) et éthanolique (48.25 µg EQ/mg Ex) de *L. Monopetalum*.

Cependant, Falleh et al. (2012) dans leurs travaux sur *Mesembryanthemum edule* (halophyte) ont montré que la teneur en flavonoïdes varie très significativement en fonction du lieu de provenance. En effet, *M. edule* de Djerba (stade bioclimatique aride, 66 µg CE/mg Ex) contient presque 2 fois plus de flavonoïdes que celle de Monastir (stade bioclimatique supérieure semi-aride, 35.7 µg CE/mg Ex). Cette différence pourrait être liée aux facteurs environnementaux comme les conditions climatiques sévères caractérisant Djerba, en termes de faible précipitations et l'exposition à la lumière élevée, sont probablement liées à l'augmentation de cette teneur. Néanmoins, plusieurs autres facteurs peuvent affecter les niveaux des principes actifs des plantes. De plus, Falleh et al. (2011) ont déjà constaté que le taux des flavonoïdes varie de manière significative entre les différentes parties de *M. edule*. Les tiges sont les plus riches (48.12 µg CE/mg Ex), suivie par les feuilles (50 % inférieur à celui des tiges) et les racines (8 fois plus faibles).

Dans une autre étude récente qui avait pour but de présenter de nouvelles données sur les métabolites secondaires de 15 halophytes européennes (appartenant à 6 familles de plantes) très peu étudiés des habitats salins des Balkans (Serbie), Stankovic et al. (2015) ont montré que les teneurs en flavonoïdes variaient de 41.21 pour *Hordeum hystrix* (Poaceae) à 146.06 µg de RU/mg Ex pour *Atriplex tatarica* (Chenopodiaceae). Enfin, les flavonoïdes des infusât de 12 plantes médicinales dont *L. guyonianum* recueillies de plusieurs régions arides et semi-arides d'Algérie ont été dosés par Ziani et al. (2015). Les résultats trouvés variaient de 14 µg CE/mg d'infusât lyophilisé pour *Ajuga iva* à 194 µg CE/mg pour *Thymus pallescens*. L'infusât des feuilles de *L. guyonianum* présentait une valeur faible (19 µg CAE/mg d'infusât) nettement inférieure à ce que nous avons obtenu pour la même plante et le même organe. Cette large différence trouverait d'une part, une explication dans l'origine de la plante et la méthode d'extraction utilisée et dans la qualité de l'étalon utilisée (acide caféique) pour le dosage des flavonoïdes d'autre part.

I.8. Dosage des tanins totaux

Afin de mieux caractériser l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*, les tanins hydrolysables et condensés ont été dosés par la méthode de Hagerman et Butler (1989). Cette méthode est basée sur la capacité de l'extrait et de l'acide tannique à faire précipiter l'hémoglobine bovin. Les résultats de cette analyse ont révélé la richesse de cet extrait en tanins (63.25 µg EAT/mg Ex).

D'après Krifa et al. (2013a), l'extrait aqueux des galles de *L. guyonianum* de Tunisie renferme des quantités appréciables de tanins de l'ordre 0.77 µg EAT/ mg Ex. Dans le règne végétal les tanins condensés sont plus répandus que les tanins hydrolysables ce qui explique que dans la plupart des travaux, les tanins sont dosés sous forme de tanins condensés. Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et de dosage réduit la fiabilité de telles comparaisons.

Selon Trabelsi et al. (2013a), l'extrait hydro-acétonique de la partie aérienne de *L. guyonianum* est plus riche en tanins condensés (99.08 µg CE/mg Ex) que *L. monopetalum* (35.97 mg CE/g Ex). D'après Khedher et al. (2014), la teneur en tanins condensés varie de 0.03 à 0.37µg CE/mg Ex parmi les 4 solvants utilisés, teneurs nettement inférieures par rapport aux résultats de la présente étude et ceux cités précédemment. De même, Mednini et al. (2014) affirment que la teneur en tanins condensés des parties aériennes *L. delicatulum* varie significativement de 1.1 à 52.2 µg CE/mg Ex et ceci en fonction du stade physiologique et du solvant d'extraction. Généralement, au cours de la croissance de l'appareil végétatif, une diminution des taux tanins est observée. Cette teneur diminue en général lors du mûrissement des fruits. En plus, une inégale répartition des tanins entre les différents organes de la plante a été rapportée. De manière générale, les plus fortes teneurs sont rencontrées dans les fruits, les fleurs et les feuilles, et dans les tiges (Jean-Blain, 1998).

I.9. Analyse de l'extrait par HPLC-TOF/MS

L'importance biologique des polyphénols et en particulier des flavonoïdes et des tanins ne cessent d'augmenter ce qui justifie le grand intérêt qui leur est consacré. De ce fait, leur caractérisation qualitative et quantitative dans les divers milieux représente un véritable enjeu.

Notre extrait a été analysé par HPLC-TOF/MS afin d'identifier le maximum de molécules phénoliques qui entrent dans sa composition. Toutes les molécules détectées ont été caractérisées par étude de leur fragmentation obtenue en mode négatif. Des témoins ont

également été analysés dans les mêmes conditions chromatographiques afin de comparer leurs caractéristiques à celles des composants de l'extrait d'étude.

La figure 27 représente le profil chromatographique obtenu avec assignation des pics majoritaires. Le chromatogramme de l'extrait aqueux brut de *L. guyonianum* peut être divisé en 3 parties distinctes : la première de 1.5 à 6.0 min, la deuxième s'étale entre 6.0 et 19.0 min et enfin la troisième située de 19.0 à 28.5 min de temps de rétention. Le profil révèle la présence de 11 pics majeurs détectés avec des temps de rétention variant entre 2.372 et 18.915 min.

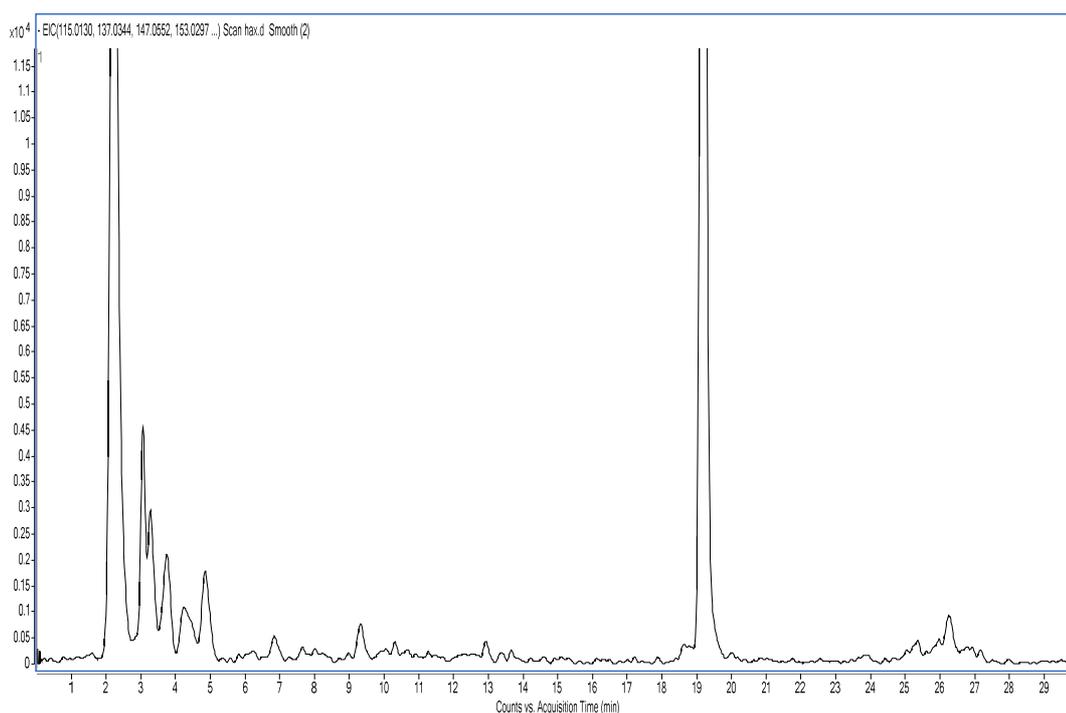


Figure 27 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de de *L. guyonianum* obtenu sur un chromatographe HPLC équipé d'un détecteur LC-MS 6210 TOF et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100 mm, 3.5 μ m).

Dans la 1^{ère} partie 1.5-6.0 min, le profil HPLC a montré un ensemble de pics bien résolus caractérisés par un épaulement de pics plus ou moins marqué. Cette partie est représentée par 6 pics dont un pic majoritaire avec un temps de rétention de 3.19 min. Quatre composés à savoir l'acide fumarique, l'acide gallique, l'acide gentisique et la catéchine (flavanol) ont été détectés. La 2^{ème} partie du chromatogramme est moins étoffée caractérisée par la présence de petits pics dans l'ensemble, plus ou moins résolus dont un pic majoritaire avec un temps de rétention de 18.915 min. En outre, une élévation de la ligne de base du profil d'éluion est bien constatée dans cet intervalle. Ce type de comportement traduit souvent la présence de tanins condensés, sous famille hétérogène de polyphénols très abondante dans le règne végétal. On parle alors de bosse de tanins (Lantto et al., 2009). En tout, 7 composés phénoliques ont été détectés dans

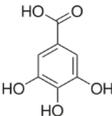
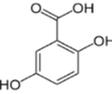
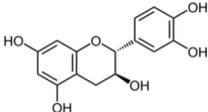
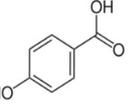
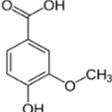
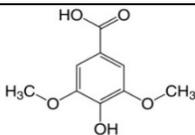
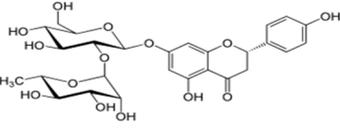
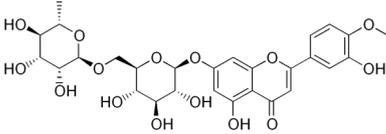
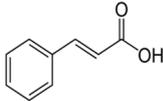
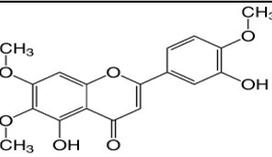
cette partie, 4 acides phénoliques (acide hydroxybenzoïque, acide vanilique, acide syringique et acide cinnamique), 1 flavanone (naringine) et 2 flavones (diosmine et eupatorine). D'autre part, la présence de pics marqués tout au long de cette bosse laisse supposer que d'autres composés polyphénoliques seraient co-élués en même temps. Ceci nous permet de prédire la présence forte possible d'autres composés appartenant aux différentes sous-familles de polyphénols. Enfin, la 3^{ème} partie du chromatogramme est caractérisée par la présence d'une crête de pics de 24 à 28 min et qui n'a permis de détecter aucun composé.

La caractérisation chimique de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* réalisée par analyse détaillée de l'extrait par HPLC-TOF/MS avec une ionisation en mode négatif (mode le plus sensible et le plus informatif) nous a permis de démontrer la richesse particulière de l'extrait en acides phénoliques. En effet, parmi les onze composés identifiés, six sont des acides phénoliques ce qui représente 54.54 % des composés détectés de l'extrait brut et l'acide fumarique. Le reste des composés appartient aux classes des flavones aglycones, des flavanols et des flavanones glycosylés. Les composés phénoliques identifiés ainsi que leurs structures sont consignés dans le tableau 07.

De même, sur le plan quantitatif l'analyse HPLC a révélé que l'extrait aqueux est composé essentiellement d'acide fumarique (35.52 %), d'acides phénoliques (21.80 %) et de flavonoïdes (42.68 %) dont les quasi-totalités sont des flavones (39.25 %). L'extrait, particulièrement riche en acides phénoliques, est caractérisé par sa forte teneur en acide fumarique qui représente 61.97 % des acides quantifiés soit 35.52 % de la composition globale de l'extrait. On note la richesse de l'extrait en flavones (91.96 % des flavonoïdes) avec une prédominance nette de l'eupatorine qui représente 65.01 % des flavonoïdes soit 27.75 % de l'extrait. Cette analyse a révélé aussi que la diosmine est le 3^{ème} composé majeur de l'extrait (11.5 %) contrairement à la naringine qui se trouve à l'état de traces (0.05 %).

Trabelsi et al. (2012) ont démontré la forte présence de 3 dérivés cathéchiques à savoir la gallo catechine, l'epigallo catechine et l'epigallo catechine-3-O-gallate chez *L. guyonianum* et qui sont vraisemblablement les mêmes composés majeurs du thé (Li et al., 2010). De même, l'acide p-coumarique, la catéchine, l'epigallo catechine-3-O-gallate, la gallo-catéchine et l'acide sinapique ont été identifiés dans différentes fractions de *L. guyonianum* (Trabelsi et al., 2013a). En outre, ces mêmes auteurs ont pu isoler le limoniastramide, un dimère formé de deux monomères naturels N-E-caféoyl tyramine et le N-E-féruloyl tyramine.

Tableau 07 : Proportions et structures chimiques des composés phénoliques identifiés de l'extrait aqueux de *L. guyonianum*

Composés identifiés	Teneur (mg/Kg)	Structure	Classe
Acide gallique	0.46		Acides phénoliques
66+Acide gentisique	0.67		Acides phénoliques
Catéchine	0.67		Flavanols
Acide 4-hydroxybenzoïque	0.48		Acides phénoliques
Acide vanilique	0.55		Acides phénoliques
Acide syringique	1.36		Acides phénoliques
Naringine	0.01		Flavanones
Diosmine	2.28		Flavones
Acide cinnamique	0.80		Acides phénoliques
Eupatorine	5.50		Flavones

Il a été rapporté que l'extrait aqueux des galles de *L. guyonianum* est relativement riche en tanins condensés où une forte hétérogénéité structurale a été observée avec une prédominance accrue de l'épigallocatechine gallate. Les résidus de galloyle, les oligosaccharides et l'épicatéchine ont été aussi identifiés (Krifa et al., 2014a). En 2010, Medimagh et al. ont déjà signalé la présence de gallocatechine et de trans-syringine dans les racines de *L. guyonianum*.

Plusieurs travaux portant sur l'étude des composés phénoliques du genre *Limonium* ont été publiés dans la littérature au cours des dernières années. Même s'il n'existe pas beaucoup de travaux concernant l'identification de composés polyphénoliques dans *L. guyonianum* voire même de son genre *Limoniastrum*, il est nécessaire de cibler les études faites sur des espèces voisines. Ceci est surtout important dans l'avenir pour mettre au point un modèle polyphénolique caractéristique qui permet d'établir des relations taxonomiques entre les différentes espèces (Lahtinen, 2003). Il est connu que différents composés secondaires peuvent être spécifiques aux ordres, familles, espèces, et parfois même aux taxa (Laitinen, 2000), parmi lesquels les flavonoïdes qui sont utilisés dans la chimiotaxonomie végétale (Swain, 1963 ; Alston et Turner, 1963 ; Lebreton et Meneret, 1964 ; Idrissi Hassani, 1985).

Malgré qu'au cours de cette étude on n'a pas pu identifier la totalité des composés phénoliques présents dans l'extrait aqueux des feuilles, nos résultats concordent bien avec ceux de plusieurs recherches quant à la richesse des extraits des feuilles de plusieurs espèces *Limoniastrum* en composés phénoliques et plus particulièrement en acides phénols et en flavonoïdes. Le tableau 08 montre certains métabolites secondaires isolées de quelques espèces des genres *Limoniastrum* et *Limonium*.

A l'heure actuelle de nombreuses études s'intéressent à l'identification des polyphénols chez les halophytes d'une manière générale et plus particulièrement chez le genre *Limonium*. Ces études portent surtout sur les variations qualitatives et quantitatives du contenu de composés phénoliques sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques. D'après la revue bibliographique qu'on a fait sur l'identification et la quantification de polyphénols de *L. guyonianum*, notre étude montre pour la première fois la présence de l'acide fumarique, l'eupatorine, la diosmine, l'acide syringique, l'acide cinnamique, l'acide gentisique, l'acide vanilique, l'acide hydroxybenzoïque et la naringine.

Tableau 08 : Principaux métabolites secondaires isolées de quelques espèces des genres *Limoniastrum* et *Limonium*

Espèce	Composés identifiés	Référence
<i>L. feei</i>	Acide gallique, myrciaphenone, myricétine-3-O-β-galactopyranoside, gallate d'épigallocatechine, myricétine 3-O-α-rhamnopyranoside, quercétine et myricétine.	Chaabi et al. (2008)
<i>L. feei</i>	quercétine, kaempférol-3-O-β-D-glucopyranoside (astragaline) et quercétine-7-O-β-D-glucopyranoside	Ziane et al. (2015)
<i>L. monopetalum</i>	7 acides phénoliques : gallique, p-hydroxybenzoïque, chlorogénique, syringique, vanillique, férulique, et l'acide trans-cinnamique. 4 flavonoïdes : quercétine, apigénine, amentoflavone et flavone	Trabelsi et al. (2010)
<i>L. monopetalum</i>	Acide gallique, vanillique, syringique, férulique et quercétine	Trabelsi et al. (2012)
<i>L. densiflorum</i>	Acide gallique, gallate d'épigallocatechine, quercitrine, dihydrokaempferol, pinosésinol, N-trans-ferulolyl et tyramine (myricétine 3-O-α-rhamnopyranoside et myricétine 3-O-L-arabinofuranoside)	Medini et al. (2016)
<i>L. delicatum</i>	Acide p-coumarique, chlorogénique, 1,2-p-hydroxybenzoïque, 4,3,5-diméthoxyhydrobenzoïque, gallique et rutine	Medini et al. (2014)
<i>L. tetragonum</i>	Myricétine-3-O-β-D-galactopyranoside, myricétine-3-O-α-L-rhamnopyranoside, quercétine-3-O-β-D-glucopyranoside et quercétine-3-O-β-D galactopyranoside	Lee et al. (2011)
<i>L. brasiliense</i>	Myricétine-3-O-α-rhamnopyranoside, epigallocatechine 3-O-gallate, epigallocatechine, gallocatéchine et acide gallique	Murray et al. (2004)
<i>L. gmelinii</i>	Acide syringique, gallique et ellagique	Korul'kina et al. (2004)

II. Etude Toxicologique

II.1. Toxicité aiguë

Afin de garantir l'innocuité de l'extrait aqueux de *L. guyonianum*, l'étude de sa toxicité aiguë par voie orale a été menée sur des souris femelles en appliquant le protocole 420 de l'OCDE (2001). Cette toxicité aiguë systémique se définit par des effets secondaires qui apparaissent à la suite d'une exposition unique de plusieurs doses de l'extrait au cours de 24 heures après administration par voie orale, la période d'observation est de 14 jours. L'OCDE recommande d'administrer des doses qui permettent d'obtenir un pourcentage de mortalité allant de 0 à 100 %. Les doses administrées doivent être comprises entre 5 et 5000 mg/kg pc

pour permettre de situer les substances testées sur l'échelle comparative de toxicité des substances chimiques de Hodge et Sterner établit en 1949 (OCDE, 2000). Dans notre étude, 3 groupes de 10 souris femelles ont reçu chacun par gavage une dose d'extrait de 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc.

II.1.1. Signes généraux

Le comportement et l'état général des souris ont été sous surveillance pendant 14 jours. La DL50 peut être déduite à partir du graphique illustrant le pourcentage de mortalité par rapport au logarithme de la concentration de l'extrait. Au cours de cette étude, il n'a pas été constaté de mortalité ni de signes toxiques particuliers après l'administration orale de l'extrait étudié à toutes les doses testées à part un changement de pilosité et une hypoactivité des souris qui ont reçu une dose de 5000 mg/kg pc et qui ont retrouvé leur état normal peu de temps après. De plus, il n'y a pas eu de symptômes de type respiratoires, nerveux, cutanés ou gastro-intestinaux.

En se référant à l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats, l'extrait aqueux de *L. guyonianum* est classé comme substance non toxique, car aucune souris du lot recevant l'extrait à une dose de 5000 mg/kg n'est morte, cela nous laisse suggérer que cette dose est la dose sans effet toxique observable (NOAEL). Cette NOAEL est un critère primordial dans les essais cliniques puisqu'elle sert de base de calcul de la première dose utilisée chez l'homme. Cette dose est calculée en divisant la NOAEL sur le Facteur de Sécurité qui est supérieur ou égale à 10 (Afssaps, 2006). La dose recommandée sera au maximum 500 mg/kg. Considérant le volume sanguin moyen de l'homme qui est de 60 ml/kg, la dose circulant dans l'organisme sera en moyenne de 8.33 mg/ml.

II.1.2. Evolution pondérale

Au cours des 14 jours d'expérimentation, la variation du poids corporel des souris a été notée tous les 2 jours et à la même heure ce qui permet de suivre l'évolution pondérale des animaux traités et témoins. Au J₀, les différents lots de souris femelles ont des poids homogènes de 26 à 32 g. Pendant les 14 jours, la progression du poids semble être normale, témoignant l'insensibilité de l'animal à l'extrait supposé toxique. Cela explique l'appétit observé au cours de l'essai de toxicité aiguë. L'ingestion de l'extrait n'a provoqué aucune variation significative du poids corporel des souris par rapport aux témoins durant toute la période d'essai (figure 28) et jusqu'au dernier jour (figure 29).

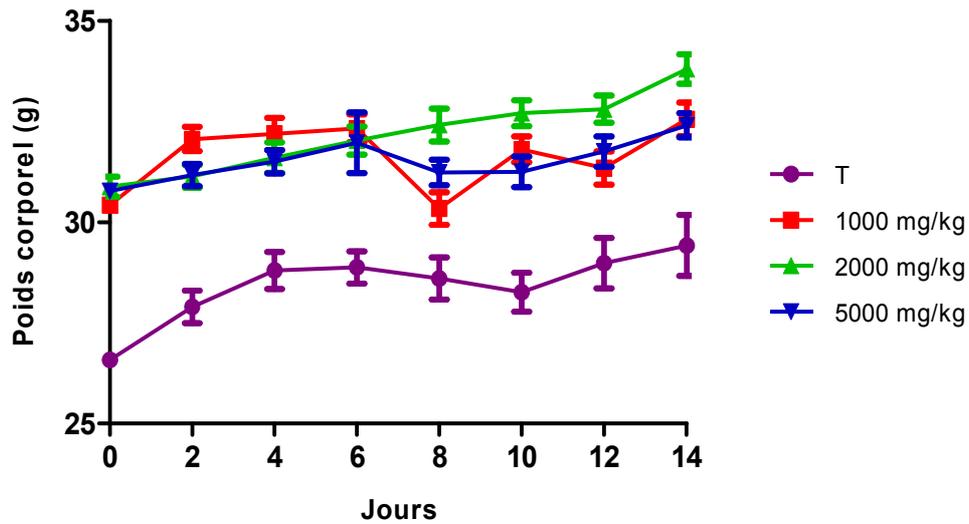


Figure 28 : Evolution du poids corporel des souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* aux doses 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc après 14 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne (n=10) ± SEM.

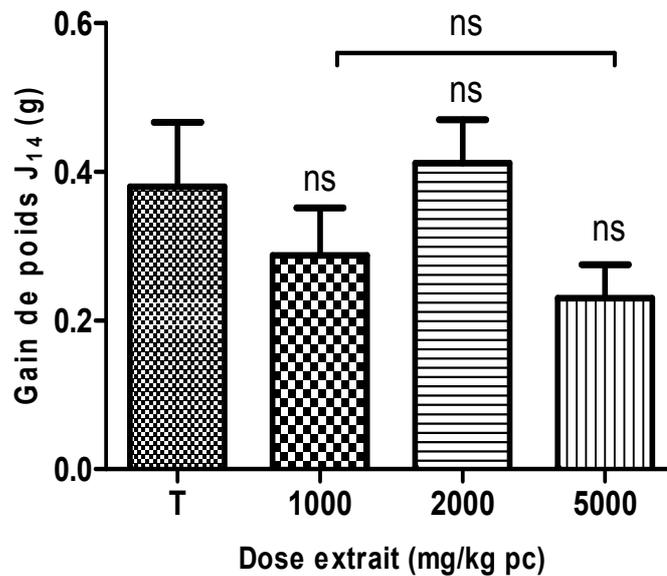


Figure 29 : Comparaison du gain de poids au dernier jour avant sacrifice (J14) entre souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (1000, 2000 et 5000 mg/kg pc). Chaque valeur représente la moyenne (n=10) ± SEM.

II.1.3. Masses relatives des organes

Après sacrifice des animaux le foie, les reins et le cœur ont été récupérés pour examen macroscopique. Il a été constaté que la taille et la forme de ces organes étaient normales et aucun changement morphologique n'a été observé. Le bon fonctionnement d'un organe peut être mesuré par son poids. Une hypertrophie d'un organe signifie un début de dysfonctionnement.

Le poids relatif des organes (poids de l'organe / poids du rat \times 100) indique l'évolution pondérale de l'organe par rapport à l'organisme. En effet, aucune augmentation significative ($p \leq 0.05$) du poids relatif du foie et des reins n'a été observée pour les 03 lots traités avec les trois doses utilisées 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc (figure 30 A et B). Une diminution significative du poids relatif des reins à la dose de 2000 g/kg pc par rapport aux autres lots est enregistrée (figure 30 B). On observe aussi une légère augmentation du poids relatif du cœur à la dose de 1000 mg/kg pc, mais qui reste loin d'être significative (figure 30 C).

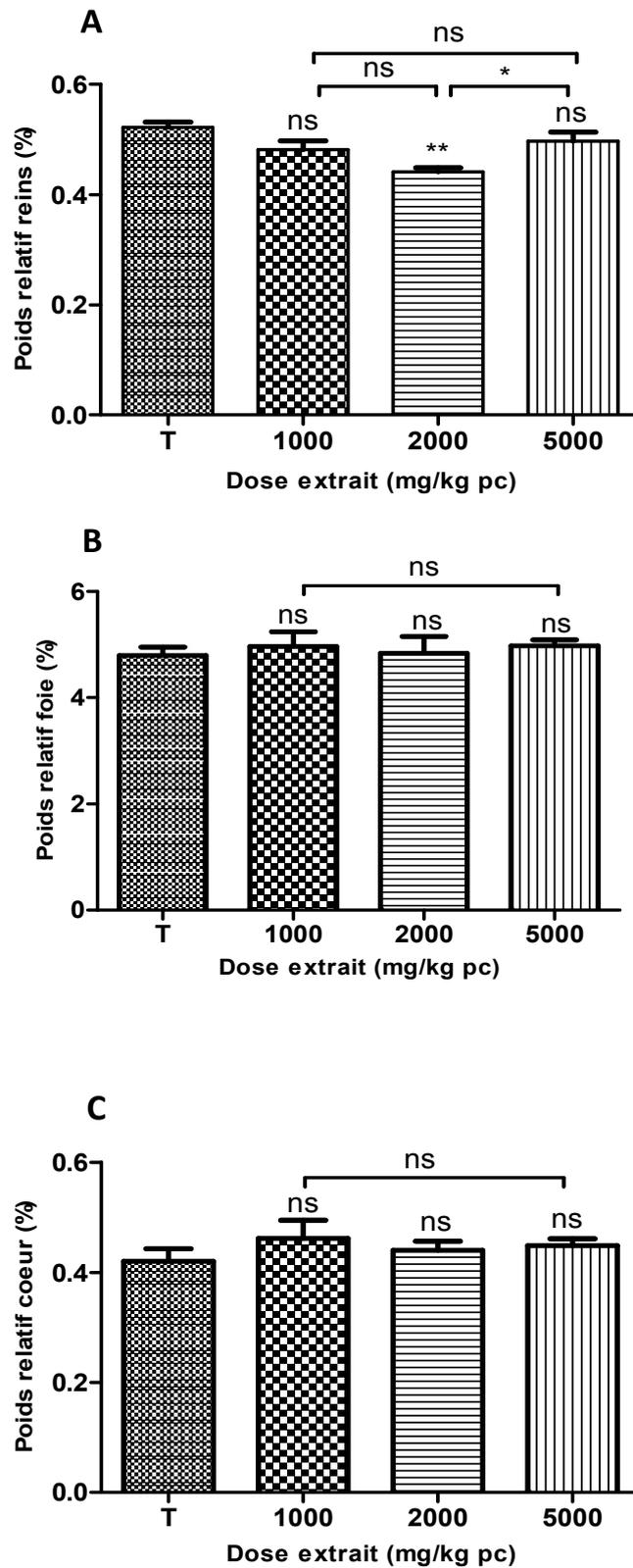


Figure 30 : Variation des poids relatifs du foie (A), des reins (B) et du cœur (C) des souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* aux doses 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc après 14 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne (n=10) \pm SEM.

II.1.4. Paramètres biochimiques

L'utilisation des plantes médicinales n'est pas dénuée de risques de toxicité. L'évaluation de l'ampleur et la sévérité des intoxications par les plantes médicinales ou leurs extraits passe en premier lieu par la prospection des marqueurs de la fonction hépatique et de la fonction rénale. En 1998, le NIH (National Institutes of Health), définit un biomarqueur comme un paramètre biologique dont la mesure objective sert à évaluer un processus physiologique normal, un processus pathologique ou la réponse d'un organisme à une intervention pharmacologique (Fuchs et Hewitt, 2011). Afin de s'assurer de la non toxicité réelle de l'extrait aqueux, différents paramètres biochimiques ont été dosés chez les souris traitées à la fin de l'expérimentation (J₁₄) et sont comparés à ceux des témoins. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Variation des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* aux doses 1000, 2000, 5000 mg/kg pc après 14 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne (n=10) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

Marqueurs biochimiques	Dose extrait (mg/kg pc)			
	Témoins	1000	2000	5000
ALAT (U/l)	65.314 ± 1.94 ^a	51.8 ± 5.42 ^a	46.75 ± 3.63 ^a	48.8 ± 6.17 ^a
ASAT (U/l)	275.35 ± 8.93 ^a	251.8 ± 23 ^a	213.33 ± 13.38 ^a	230.75 ± 12.73 ^a
PAL (U/l)	77.75 ± 8.05 ^a	68.4 ± 6.47 ^a	65.1 ± 9.52 ^a	60.87 ± 2.01 ^a
Protéines Totales (g/l)	63.08 ± 5.55 ^a	53.66 ± 3.48 ^{ab}	44.43 ± 6.49 ^{ab}	44.76 ± 1.07 ^b
Albumine (g/l)	29.6 ± 0.29 ^a	29.2 ± 0.86 ^a	29.00 ± 0.31 ^a	30.8 ± 0.97 ^a
Acide Urique (mg/l)	84.57 ± 4.75 ^a	65.4 ± 3.20 ^{ab}	61.4 ± 7.44 ^b	60.6 ± 2.16 ^b
Urée (g/l)	0.49 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.02 ^a
Créatinine (mg/l)	4.3 ± 0.05 ^a	4.47 ± 8.93 ^a	5.14 ± 0.07 ^b	5.64 ± 0.03 ^c

Sur la même ligne, les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes (p < 0.05, test de Tukey).

II.1.4.1. Marqueurs de la fonction hépatique

Le foie est la première cible de la toxicité, il métabolise les substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxique (Rhiouani *et al.*, 2008). Certaines enzymes hépatiques ont été testées à savoir, l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) et la phosphatase alcaline (PAL).

Les transaminases (ALAT et ASAT) catalysent le transfert d'un groupement amine à l' α -cétooglutarate pour donner respectivement du glutamate, du pyruvate ou de l'oxalo-acétate à partir d'alanine ou d'aspartate. Leur augmentation reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique (Kew, 2000). L'atteinte hépatocytaire provoque la libération des enzymes dans le compartiment extracellulaire. L'ALAT est de localisation cytosolique, tandis que l'ASAT est essentiellement mitochondrial (Amacher, 2002).

Compte-tenu de sa spécificité et de la disponibilité du dosage, l'ALAT est la référence des biomarqueurs de l'atteinte hépatique (Ozer *et al.*, 2008). Les concentrations de transaminases sont maximales au niveau des hépatocytes périportaux et diminuent progressivement à mesure que l'on progresse vers la zone centrolobulaire (Amacher, 2002). L'augmentation de l'activité sérique de l'ALAT est typiquement associée à des lésions de la membrane cellulaire et une fuite des enzymes de l'hépatocyte (Willard et Twedt, 1994). Une augmentation rapide et importante (10 fois) de son activité plasmatique est en faveur d'une hépatite aiguë avec cytolysse. Un accroissement modéré (2 fois) est plus en faveur d'une affection chronique ou d'une cholestase (Médaille et Briend-Marchal, 2008).

Du fait de sa présence à la fois dans le foie et dans les muscles cardiaques et squelettiques, une élévation plasmatique de l'activité ASAT peut être liée à une inflammation musculaire, ce qui peut être confirmé par la mesure de l'activité d'une autre enzyme musculaire, la créatine kinase (CK). Toutefois, de par sa répartition essentiellement mitochondriale dans les hépatocytes et de son temps de demi-vie très court, elle est souvent considérée comme un marqueur fiable de la gravité et de la persistance d'une nécrose hépatique (Médaille et Briend-Marchal, 2008).

L'analyse de l'allure des transaminases des souris expérimentées montre une tendance à la baisse, suggérant que l'extrait n'affecte pas ces paramètres hépatiques. Cet extrait n'a probablement aucun effet hépatotoxique sur les souris.

La phosphatase alcaline (PAL) est une autre enzyme qui permet d'évaluer la fonction hépatique. C'est une enzyme qui se trouve dans la plupart des tissus de l'organisme, en particulier les os, le foie, l'intestin et les reins. Outre une atteinte hépatique (hépatite, abcès, etc.), le dosage de la PAL peut dépister une cholestase (stagnation ou arrêt de l'écoulement de la bile dans les voies biliaires) et des obstructions biliaires. La PAL est une enzyme peu spécifique, compte tenu de l'existence de nombreuses iso-enzymes au sein des tissus osseux, placentaire et rénal (Ozer et *al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent une diminution de son activité pour les 3 doses testées, mais comparativement au groupe contrôle cette diminution n'est pas significative. L'absorption de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* n'entraînerait donc pas de cytolyse, et la plante semble être bien tolérée.

Outre son rôle de détoxification, le foie est également le lieu de la synthèse d'un certain nombre de protéines indispensables au métabolisme général, en particulier l'albumine, les apoprotéines, des protéines de transport, l'érythropoïétine inactive, des hétéroprotéines, des enzymes et de la majorité des globulines sériques exceptées les immunoglobulines (Center et *al.*, 1996). Les protéines totales (dont l'albumine) sont normalement synthétisées à 90 % par les hépatocytes, à l'exception des immunoglobulines qui sont synthétisées par les plasmocytes. Suite à une lésion cellulaire, la capacité de synthèse est réduite et la concentration de ces constituants diminue. Une baisse du taux de protéines pourrait signifier un dysfonctionnement hépatique grave (cirrhoses).

Notre étude a révélé que l'extrait à 1000, 2000 et 5000 mg/kg en doses unique n'a pas montré de différence significative pour les protéines totales, si ce n'est qu'une baisse non significative. De même, l'administration de l'extrait n'entraîne aucune variation significative des teneurs sériques en albumine chez les souris par rapport à leurs témoins. Les fluctuations notées sont minimales voire négligeables. Les résultats du dosage protéique reflètent un métabolisme protéique normal.

En conclusion, les marqueurs biochimiques de la fonction hépatique ont été faiblement modifiés indiquant toute absence de toxicité de l'extrait vis à vis du foie aux doses testées.

II.1.4.2. Marqueurs de la fonction rénale

Au cours du processus de filtration, les reins peuvent être exposés à des concentrations élevées de substances toxiques d'origine endogène et exogène. Certaines cellules rénales sont ainsi exposées à des concentrations 1000 fois plus élevées que les concentrations sanguines. Les conséquences des facteurs nocifs sur la fonction rénale sont dites prérenales lorsque la

vascularisation du rein est compromise, rénales quand le rein lui-même est affecté, ou postrénales lorsqu'il y a lésion des voies excrétrices empruntées par l'urine entre le rein et l'extrémité de l'urètre. L'évaluation de la fonction rénale repose essentiellement sur le dosage de l'urée et de la créatinine sanguines, qui sont considérés comme d'excellents marqueurs de la fonction rénale (Sirwal et *al.*, 2004).

À l'instar des conclusions apportées pour les paramètres biochimiques cités précédemment, l'extrait n'a induit aucun changement significatif de la concentration plasmatique de l'urée chez les souris traitées comparativement au groupe témoin. L'autre paramètre sémiologique de la fonction rénale qui s'ajoute est l'acide urique. Les valeurs moyennes des concentrations sériques de l'acide urique consignées dans le tableau 09 se situent entre 84.57 (mg/l) chez les souris témoins et 65.4, 61.4 et 60.6 (mg/l) chez les souris ayant reçus des doses de 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc d'extrait. Ces variations sont significativement différentes par rapport au témoin.

Parallèlement, il a été constaté à l'issue du traitement statistique des résultats du dosage de la créatinine que l'extrait de la plante d'étude a un effet significatif dans le sens d'augmentation de la créatinémie pour les doses de 2000 et 5000 mg/kg pc.

En somme, les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'interaction nette avec les reins et par conséquent l'extrait de ne semble pas être néphrotoxique.

II.1.5. Examen histopathologique

L'étude histopathologique occupe une place prépondérante et constitue une étape incontournable dans l'étude de la toxicité. Le foie et les reins constituent les cibles privilégiées lors d'une telle étude. L'examen histologique a été réalisé par le Dr Ouhida, médecin spécialiste en anatomopathologie au CHU de Sétif, sous microscopie photonique à un grossissement de 100x.

II.1.5 .1. Histopathologie du foie

La figure 31 présente les coupes histologiques du foie des animaux traités. Le lot témoin présente une architecture hépatique globalement normale marquée par la présence de travées hépatocytaires disposées radialement autour d'une veine centrolobulaire, une veine porte, un canal biliaire et une artère hépatique (figure 31 A).

Par contre chez les souris traitées par 1000 mg/kg pc d'extrait, l'architecture hépatique est plus ou moins altérée avec des hépatocytes irréguliers et ballonnés associés à des

congestions sinusoidales et du système porte (figure 31 B). Les souris traitées par 2000 mg/kg pc d'extrait ont montré en plus de la ballonnisation des hépatocytes, une congestion de la veine porte associée à une dilatation péri-centrolobulaire des capillaires sinusoidaux (figure 31 C).

Il est important de souligner que les altérations du tissu hépatique ont été à la fois plus apparentes et plus marquées chez le lot traité par l'extrait à 5000 mg/kg pc (figure 31 D). Chez ces souris, nous avons observé une dilatation sinusoidale sévère au tour de la veine centrolobulaire associée à des hépatocytes ballonnés et une nécrose hépatocytaire focale (présence d'éosinophiles cytoplasmiques).

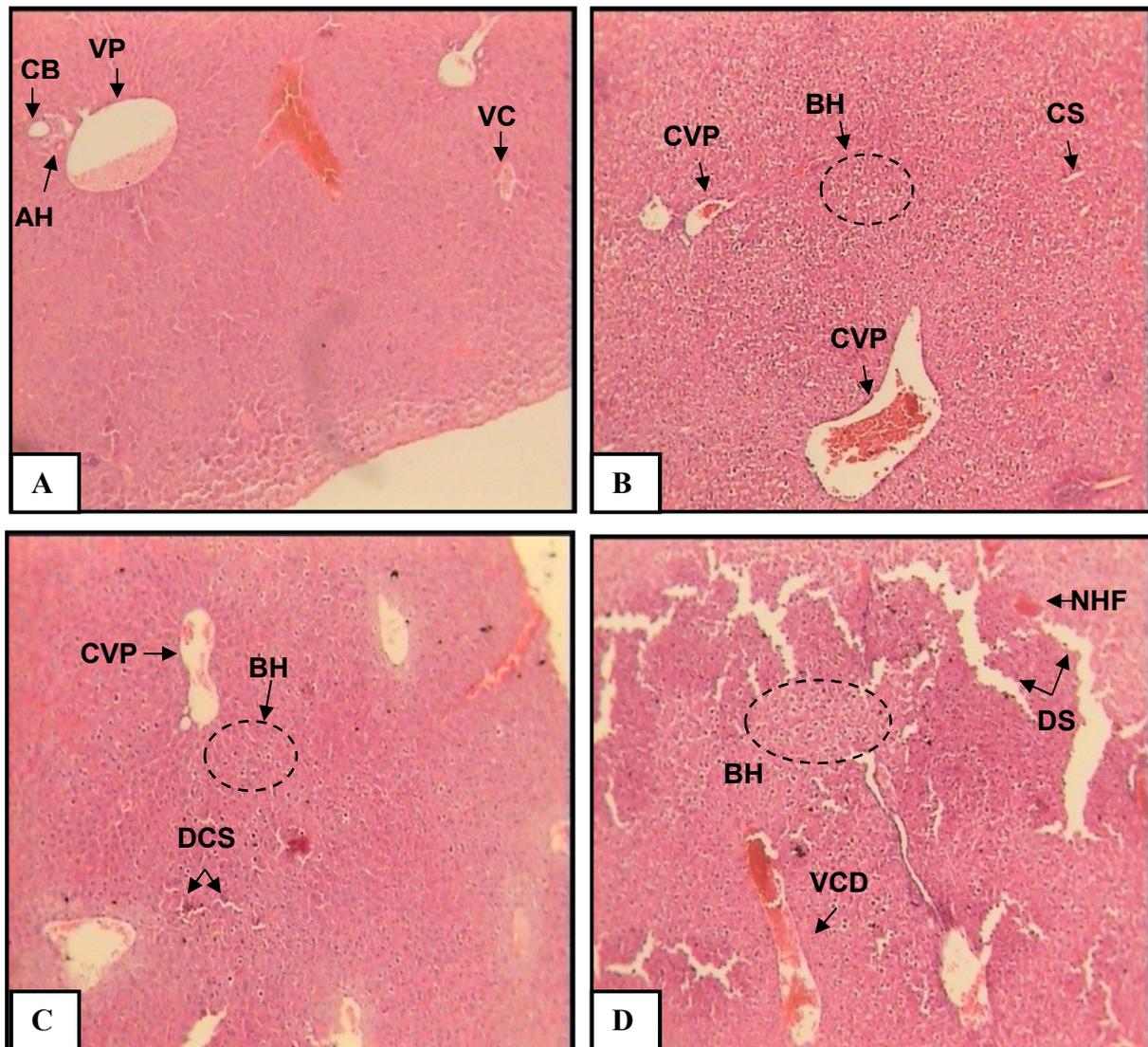


Figure 31 : Photomicrographies de sections de tissus hépatiques (H&E 100x) des souris témoins (A) et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* aux doses 1000 (B), 2000 (C) et 5000 mg/kg pc (D). AH, Artère hépatique ; CB, Canal biliaire ; VC, Veine Centro-lobulaire ; VCD, Veine Centro-lobulaire dilatée ; VP, Veine porte ; CVP, Congestion de la Veine porte ; DCS, Dilatation des capillaires sinusoidaux ; DS, Dilatation sinusoidale ; CS, Congestion sinusoidale ; BH, Ballonnisation des hépatocytes ; NHF, Nécrose hépatocytaire focale.

II.1.5.2. Histopathologie des reins

Les coupes histologiques des reins des souris utilisées sont représentées par la figure 32. L'observation microscopique du tissu rénal des souris du lot témoin (figure 32 A) nous a permis de voir des zones corticales et médullaires normales avec la présence de glomérules uniformes de membrane bien définie associées à des tubules normaux. Les glomérules apparaissent comme des structures denses arrondies, entourées d'un espace étroit clair, espace de Bowman. Un grand nombre de tubes, principalement des tubes contournés proximaux, entourent ces glomérules.

Les souris traitées par 1000 mg/kg pc d'extrait (figure 32 B) ont révélé une architecture rénale altérée où un nombre relativement restreint de glomérules sont dilatés voire nécrosés. De plus, nous avons observé des congestions vasculaires, une nécrose tubulaire en phase d'installation (dégénérescence de cellules épithéliales tubulaires avec la perte de la bordure en brosse des tubes proximaux) ainsi la présence de débris cellulaires dans les tubules lésés.

Comme résultat de l'augmentation de la dose, chez les souris traitées par 2000 mg/kg pc d'extrait (figure 32 C), les glomérules dilatés ont augmenté en nombre et en forme (taille plus grande et non arrondis). De même, les nécroses tubulaires aiguës ont été plus accentuées donnant des lésions caractérisées par l'absence d'épithélium par contre la membrane basale reste intacte et garde son intégrité.

Chez les souris traitées avec 5000 mg/kg pc (figure 33 C), on a constaté une congestion plus une infiltration leucocytaire associées à une dégénérescence et une nécrose tubulaire, en plus de la présence de plusieurs foyers de nécrose glomérulaire.

Les signes cliniques facilitent l'interprétation des résultats de l'étude toxicologique. En effet, nos souris n'ont jamais présenté de signes de toxicité ni de diminution de leurs performances zootechniques. Selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (OCDE, 2001), et du fait que la DL50 a été estimée à plus de 5000 mg/kg pc, l'extrait total aqueux des feuilles de *L. guyonianum* peut être classé dans la catégorie 5 et considéré comme une substance non toxique par voie orale.

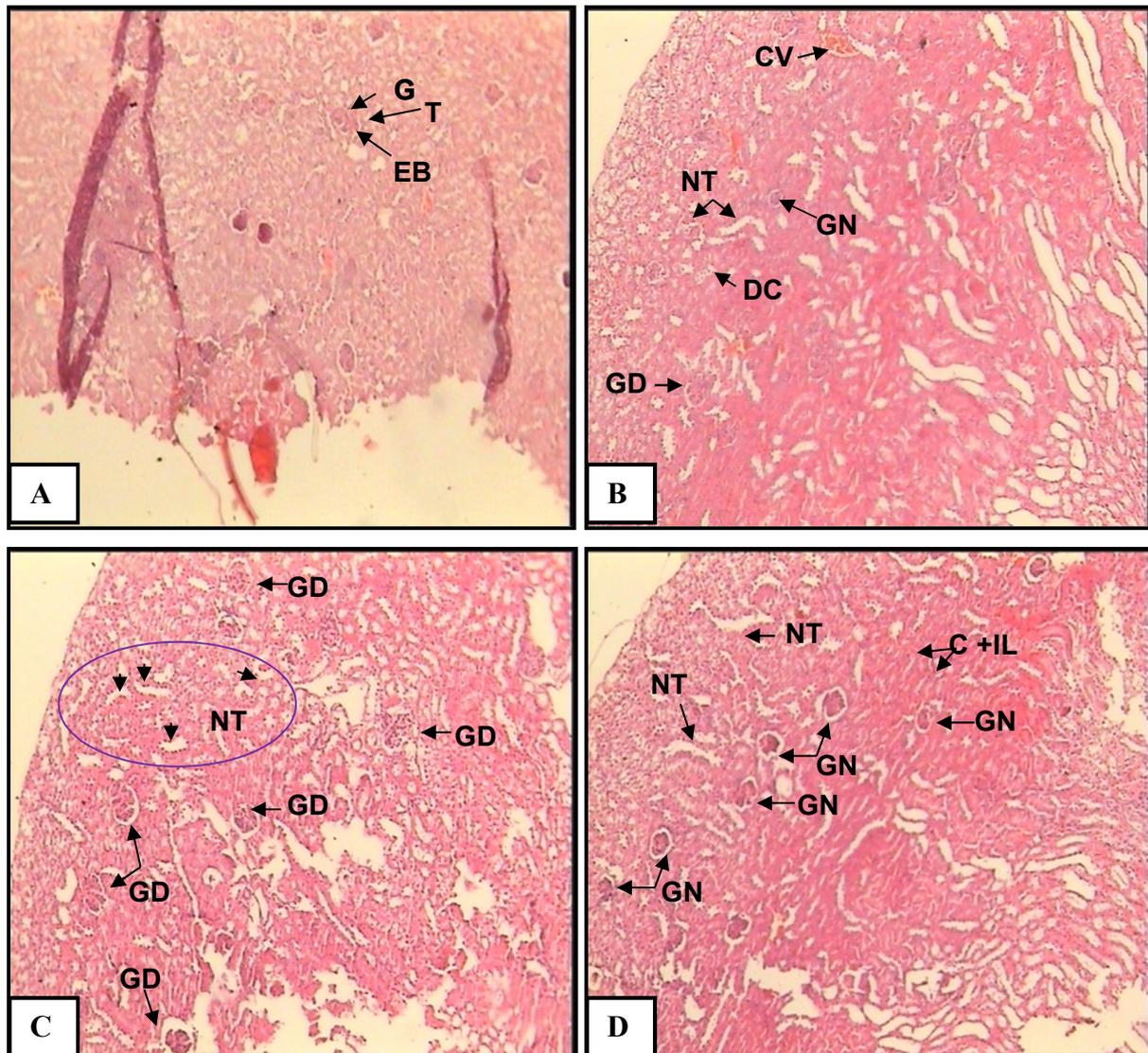


Figure 32 : Photomicrographies de sections de tissus rénales (H&E 100x) des souris témoins (A) et traitées à l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* aux doses 1000 (B), 2000 (C) et 5000 mg/kg pc (D). G, Glomérule ; T, Tubule ; EB, Espace de Bowman ; GD, Glomérule dilaté ; GN, Glomérule nécrosé ; CV, Congestion vasculaire ; NT, Nécrose tubulaire ; DC, Débris cellulaire ; C+IL, Congestion tubulaire + Infiltration leucocytaire.

Dans ce travail la créatinine et l'acide urique ont été retenus comme biomarqueurs sériques au niveau rénal. La teneur de ces derniers a augmenté de façon dose-dépendante dans le sérum à la suite de l'ingestion de l'extrait. Les souris ont été « aptes » à révéler ces disruptions métaboliques, sans pour autant présenter de signes cliniques, tout du moins durant les 14 jours d'étude. Dans certains cas, les disruptions métaboliques affectant l'organe cible peuvent être plus longues à s'installer ou peuvent montrer une amplitude plus forte, ce qui aboutit à la rupture de l'équilibre homéostatique de l'organisme. Ceci peut se traduire alors par des manifestations cliniques, biochimiques ou lésionnelles qui peuvent apparaître plus tardivement. Parfois, ces disruptions métaboliques restent ténues. Elles sont incapables d'engendrer alors des troubles cliniques.

Sur le plan de toxicité tissulaire, les examens histopathologiques ont montré des altérations qui ont touché aussi bien le tissu rénal qu'hépatique. Cependant, les reins ont été plus sensibles à l'extrait. En effet, une nécrose glomérulaire est apparue avec la première dose ingérée (1000 mg/kg pc). Par contre, une nécrose hépatocytaire focale n'a été notable que pour une concentration de 5000 mg/kg pc. Ces atteintes paraissent dose-dépendante et sont le résultat d'une exposition courte à de fortes doses d'extrait.

Dans la bibliographie consultée, aucune étude toxicologique sur *L. guyonianum* n'a été réalisée. En outre, peu sont les travaux qui se sont consacrés à l'étude de la toxicité des espèces voisines. L'extrait hydroacétonique 70% des rhizomes de *L. brasiliense* n'a provoqué aucun changement clinique apparent chez les souris pendant les 14 jours d'observation. En outre, la DL50 calculée est de 4800 mg/kg (Antonelli-Ushirobira et al., 2015). Les extraits de racines de *L. sinense* ont exprimé une activité hépatoprotectrice (Tang et al., 2008).

II.2. Effet hémolytique

Plusieurs méthodes d'étude de la cytotoxicité existent à ce jour ; entre autres les méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité membranaire comme le test hémolytique. Dans cette optique, le test de cytotoxicité de l'extrait aqueux a été réalisé sur un modèle universel de cellules animales, les globules rouges (GR) humains provenant de donneurs sains. La quantité d'hémoglobine libérée et par extension la proportion de GR affectés peuvent être déterminées par spectrophotométrie. Le test a été confirmé par comptage des GR résiduels après traitement à l'extrait.

Le test de potentiel hémolytique est contrôlé par du sang sans agent hémolytique et du sang complètement hémolysé par un agent hémolytique connu. Dans le cas de notre étude, l'eau distillée a été utilisée comme contrôle positif permettant une hémolyse totale. Le PBS est utilisé comme contrôle négatif (0 % de lyse). Le test d'hémolyse a été réalisé pour une large gamme de concentrations allant de 5 à 200 mg/ml.

La figure 33 présente les pourcentages d'hémolyse obtenus pour les 7 concentrations d'extrait utilisées. Ces résultats prouvent que l'extrait aqueux étudié induit l'hémolyse des GR d'une manière dose-dépendante. Aux plus faibles concentrations (5, 10 et 15 mg/ml), l'extrait provoque de légères hémolyses < à 5 % proches même du contrôle négatif (2.4, 2.5 et 4.0 % respectivement). Pour une concentration de 25 mg/ml, l'hémolyse des GR est toujours faible et est de 5.08 %. En doublant la concentration de l'extrait (50 mg/ml), le taux d'hémolyse double mais ne dépasse pas 9.8 %. Avec la plus forte dose utilisée (200 mg/ml), le taux d'hémolyse augmente légèrement mais reste faible et ne dépasse pas 13.52 %.

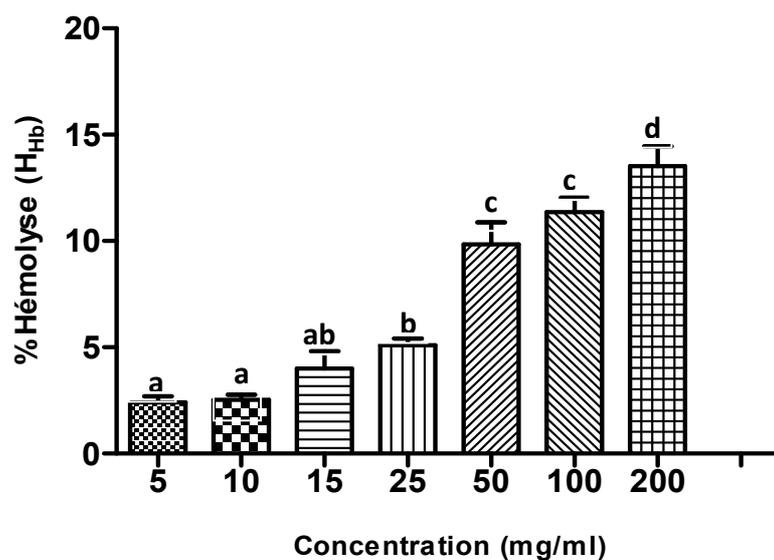


Figure 33 : Effet hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* mesuré par la libération d'Hb (absorbance à 576 nm). Des lettres différentes représentent des différences significatives $p < 0.05$ (Test de Tukey).

Dans le cas des échantillons de notre extrait, on note une légère hémolyse de 13.52 % à la concentration de 200 mg/ml. Généralement, le test de potentiel hémolytique résulte en une concentration hémolytique à 50 %, c'est à dire la concentration nécessaire pour provoquer la libération de 50 % de l'hémoglobine (IC50). Or, dans notre cas on n'a pas pu déterminer cette IC50 pour l'ensemble des concentrations utilisées malgré qu'on ait testé une forte concentration

(200 mg/ml) qu'on peut la qualifier de limite pour laquelle le pourcentage d'hémolyse n'a pas dépassé 13.52 %.

Il importe de noter que, les résultats des taux d'hémolyse mesurés par comptage cellulaire (H_c) concordent bien à ceux obtenus par mesure spectrophotométrique comme le montre les figures 34 et 35. Partant de ces données et compte tenu des résultats obtenus aussi bien par mesure spectrophotométrique que par comptage cellulaire, on peut dire que notre extrait n'est pas cytotoxique vis à vis des GR.

La faible activité hémolytique de l'extrait pourrait être due à sa faible teneur en saponines. En effet, les saponines ont la capacité de rompre les érythrocytes. Le mécanisme exact par lequel les saponines entraînent la rupture de la membrane des érythrocytes n'est pas parfaitement établi (Francis et *al.*, 2002). Certains auteurs ont posé l'hypothèse selon laquelle les saponines interagissent avec la couche lipidique des membranes cellulaires pour former des complexes insolubles avec le cholestérol (Melzig et *al.*, 2001) menant à la perméabilisation des cellules et à la perte subséquente de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (Baumann et *al.*, 2000 ; Sparg et *al.*, 2004).

Les travaux de Tabassi et *al.* (2006) montrent que les saponines isolées d'*Acanthophyllum squarrosum* (Caryophyllaceae) provoquent l'hémolyse complète des GR humains à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$. Katselis et collaborateurs (2007) rapportent que la saponine PS 4 isolée de *Polygala senega* (Polygalaceae) présente une forte activité hémolytique. En revanche, Mebirouk-Boudechiche et *al.* (2015) n'ont pas montré de corrélation significative entre la teneur en saponines et l'activité hémolytique pour les arbustes *Viburnum tinus* et *Ulmus campestris* qui renferment de fortes teneurs en saponines. Par contre, *Smilax aspersa* possède une forte activité hémolytique bien que pauvre en saponines. L'activité hémolytique, et de manière plus générale la perméabilisation membranaire est donc caractéristique des saponines, mais de grandes différences d'activité sont constatées d'une saponine à l'autre.

Les résultats de l'effet hémolytique des différentes concentrations de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*, montrent qu'il a un effet toxique très faible voir négligeable sur les GR humains.

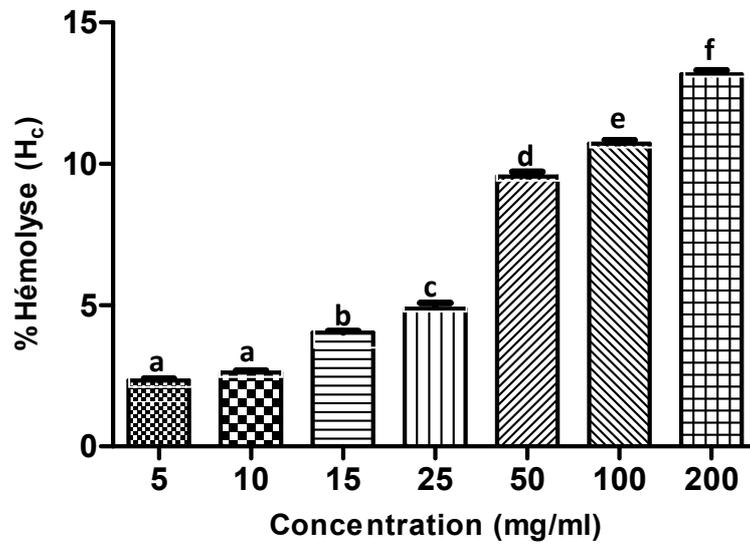


Figure 34 : Effet hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* mesuré par comptage cellulaire (H_c). Des lettres différentes représentent des différences significatives $p < 0.05$ (Test de Tukey).

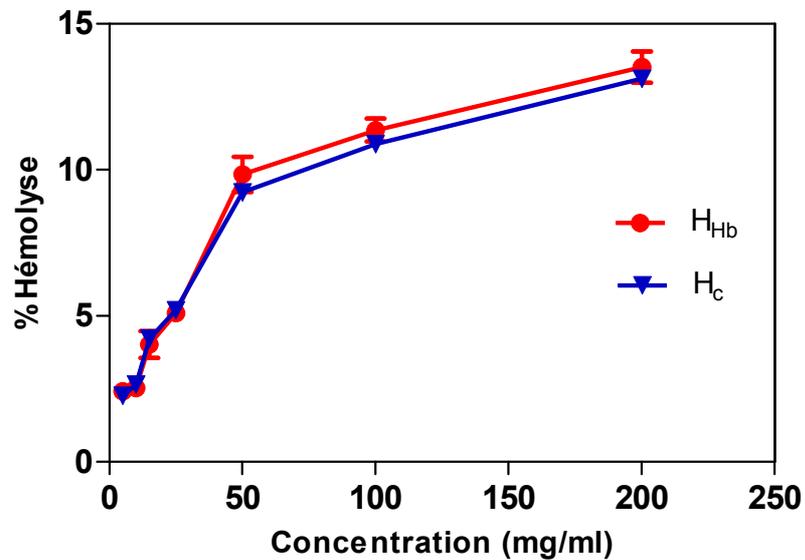


Figure 35 : Evolution des pourcentages d'hémolyse mesurés par spectrophotométrie (H_{Hb}) et par comptage cellulaire (H_c).

III. Etude de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant peut être évalué *in vivo* ou *in vitro* en appliquant des méthodes qui mesurent la capacité antioxydante d'une molécule ou d'un extrait naturel. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Prior et al., 2005).

III.1. Activité antioxydante *in vitro*

III.1.1. Effet piègeur du radical DPPH•

Le test DPPH est l'un des tests les plus utilisés à cause de sa simplicité et sa bonne reproductibilité (Blois, 1958). Les résultats sont reportés dans le tableau 10 et la figure 36. L'IC₅₀ de l'extrait 488.03 ± 5.97 µg/ml est significativement inférieure à celle du BHT. La purification des principes actifs pourrait donner des activités antiradicalaires plus élevées.

Tableau 10 : Résultats du test DPPH de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*.
Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3)

Echantillon	IC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/µg DPPH)	ARP
BHT	57.14 ± 5.29	0.73 ± 0,06	1.37 ± 0.13
Extrait aqueux	488.03 ± 5.96	6.26 ± 0,07	0.1583 ± 0.0003

Le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux est particulièrement dû à la présence d'acides phénoliques composés connus avoir la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. Cependant, de nombreuses études n'ont pas réussi à établir une corrélation significative entre la teneur en polyphénols des extraits de plantes et leur activité antioxydante (Zhang et Hamauzu, 2004 ; Ku et al., 2007). Le pouvoir piègeur des radicaux libres dépend du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C et le degré de polymérisation (Karamac et al., 2005 ; Tabart et al., 2009).

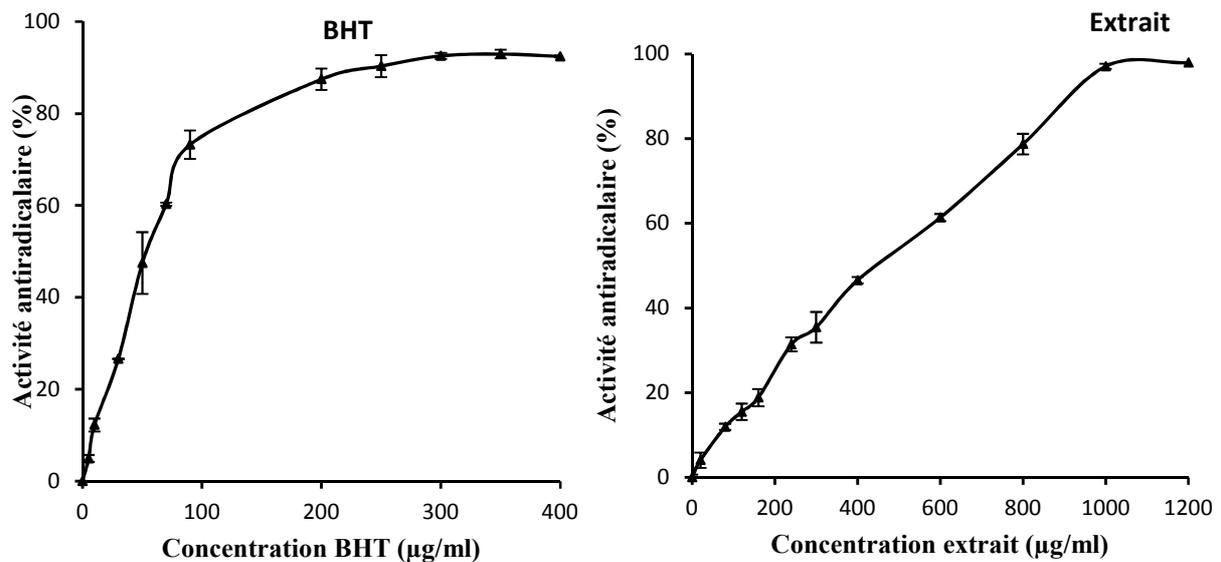


Figure 36 : Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Le test au DPPH• n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques.

Les 5 dernières années ont vu la publication de nombreux travaux sur l'étude de l'activité antioxydante de plusieurs espèces *Limoniastrum* et halophytes par le test DPPH (tableau 11). Ziani et al. (2015) ont étudié l'activité antioxydante de l'infusé des feuilles de 12 plantes de plusieurs régions arides et subarides d'Algérie. L'activité antioxydante de l'halophyte *L. guyonianum* s'est révélée être plus efficace (EC_{50} de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que celles de toutes les plantes étudiées.

Tableau 11 : IC₅₀ de quelques espèces du genre *Limoniastrum*

Espèce végétale	Partie utilisée	Extrait	Région de provenance	IC ₅₀ (µg/ml)	Référence
<i>L. guyonianum</i>	Partie aérienne	méthanolique	Sud Tunisie	1.0	Ksouri et al. (2012)
<i>L. guyonianum</i>	Partie aérienne	hydro-acétonique (60%)	Sud Tunisie	4.7	Trabelsi et al. (2012)
		fraction acétate d'éthyle		2.2	
		fraction aqueuse		16.5	
		acétonique (60%)		18.33	
<i>L. guyonianum</i>	Partie aérienne	acétate d'éthyl	Sud Est, Algérie Ouaregla	110.0	Belfar et al. (2015)
		butanolique		160.0	
<i>L. guyonianum</i>	Plante entière	méthanolique	Sud Tunisie	14.9	Debdouba et al. (2013)
<i>L. guyonianum</i>	Plante entière	acétate d'éthyl	Sud Est, Algérie El-oued	250.0	Belfar et al. (2015)
		butanolique		180.0	
<i>L. guyonianum</i>	Plante entière	ethanolique	Libye	397.51	Mohammed et al. (2005)
		acétate d'éthyl		391.82	
		chloroformique		246.38	
<i>L. monopetalum</i>	Plante entière	méthanolique	Sud Tunisie	2.0	Ksouri et al. (2012)
<i>L. feei</i>	Feuilles	aqueux	Sud Ouest, Algérie Bechar	580.0	Keffous et al. (2016)
<i>L. feei</i>	Feuilles	ethanolique (80%)	Sud Ouest, Algérie Bechar	0.38	Chaabi et al. (2008)
<i>L. feei</i>	Feuilles	méthanolique	Sud Ouest, Algérie Naâma	4.75	El Haci (2009)

III.1.2. Test de réduction du radical-cation ABTS•+

L'activité antiradicalaire de l'extrait est exprimée en pourcentage d'inhibition et en IC₅₀ (figure 37). L'extrait aqueux présente une IC₅₀ de 307.59 ± 4.07 µg/ml, une valeur largement supérieure à celle du BHT (14.47 ± 0.59 µg/ml). L'extrait a présenté une fois encore une capacité antiradicalaire inférieure à celle du BHT. Toutes fois, l'IC₅₀ retrouvée par le test ABTS (IC₅₀ ≈ 307.594 µg/ml) est inférieure à celle du DPPH (IC₅₀ ≈ 474.383 µg/ml) malgré que ces 2 tests reposent sur le même principe du transfert de protons. Cette différence pourrait être due au fait que les sources de radicaux libres sont différentes, et que les antioxydants répondent différemment aux méthodes de mesure puisque les mécanismes impliqués dans les réactions sont différents.

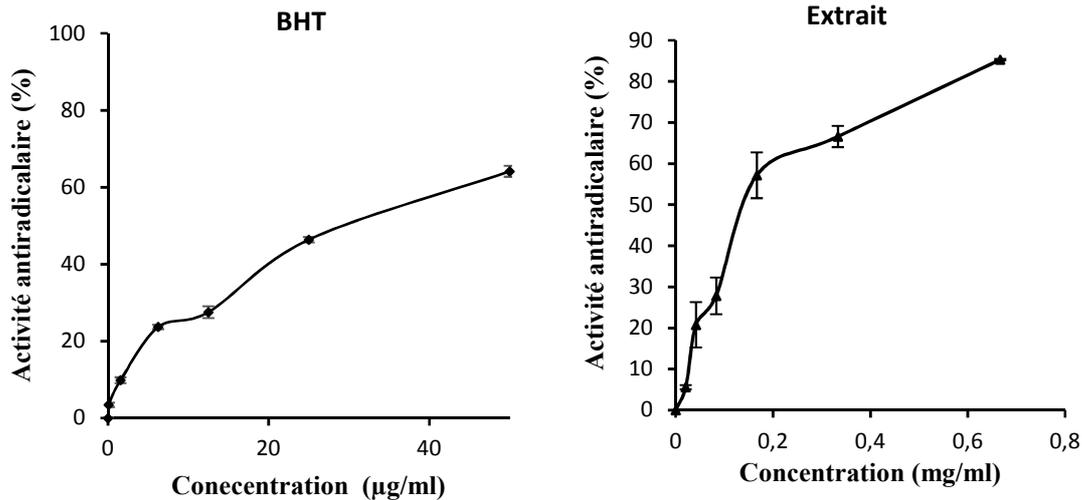


Figure 37 : Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* et du BHT vis à vis du radical ABTS. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Plusieurs études ont appliqué le test ABTS pour mesurer l'activité antioxydante de plusieurs espèces du genre *Limonium* et autres halophytes. L'activité antiradicalaire de notre extrait est 3 fois supérieure des feuilles de *L. algarvense* (IC_{50} de 970 $\mu\text{g/ml}$) par contre, l'activité antiradicalaire de *L. algarvense* varie considérablement en fonction de l'organe de la plante et du solvant d'extraction (Rodrigues et al., 2015). Notre extrait exprime une activité antiradicalaire qui dépasse de loin de celles trouvées par Chaouche et al. (2014) pour *Solenostemma oleifolium* (IC_{50} de 579.66 $\mu\text{g/ml}$) et par Saada et al. (2014) pour *Retama retam* (IC_{50} de 560 $\mu\text{g/ml}$).

III.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence de l'extrait et du BHT a été suivie régulièrement pendant 48 heures (figure 38) et l'activité antioxydante relative de l'extrait (AAR) a été déterminée.

Les résultats obtenus (figure 39) montrent que l'extrait aqueux des feuilles inhibe d'une manière significative ($p < 0.05$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène (AAR $\approx 71.10 \pm 3.43$ %) par rapport au contrôle négatif (AAR $\approx 23.08 \pm 2.68$ %). Toutefois, l'AAR de l'extrait reste significativement inférieure à celle du BHT (AAR $\approx 98.483 \pm 1.17$ %) utilisé comme contrôle positif.

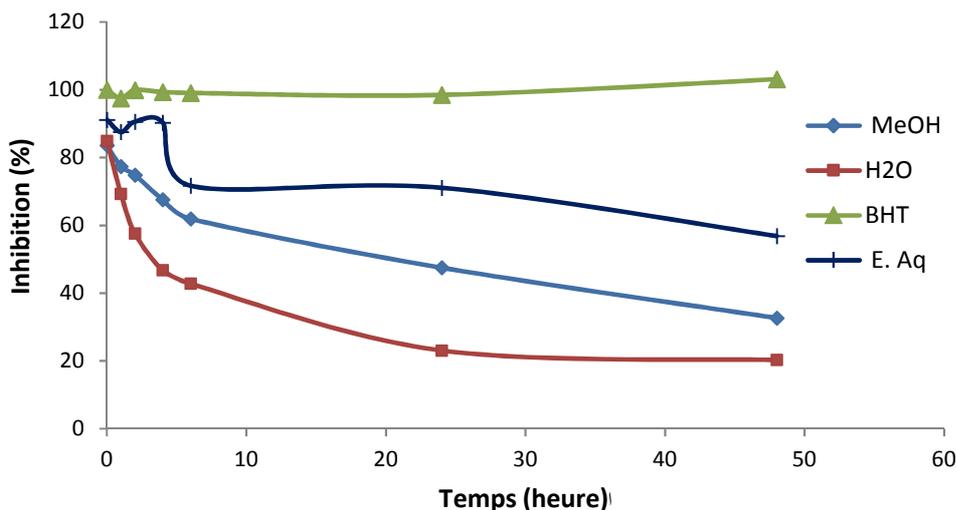


Figure 38 : Cinétique d'inhibition du blanchissement de β -carotène par l'extrait de *L. guyonianum* et de l'antioxydant de référence BHT.

A part celle du BHT, les courbes obtenues ont plus ou moins la même allure. Pour l'extrait on observe 3 étapes distinctes. Une 1^{ère} phase de courte durée dite phase d'initiation, le β -carotène préserve son degré d'insaturation (couleur jaune et une absorbance maximale) et aucun radical libre n'est formé dans le milieu réactionnel. Elle est suivie rapidement par la phase de propagation (0 à 4h) caractérisée par un début de formation des radicaux libres dans le milieu réactionnel générés par l'acide linoléique. La phase de terminaison débute après 4h, durant laquelle une extinction graduelle de l'absorbance est constatée, l'état stationnaire est atteint au bout de 48 heures.

Pour le contrôle négatif, on a noté une absorbance initiale de 0.34 qui a diminué rapidement pour atteindre 0.17 après 6h et une valeur minimale de 0.08 après 48h traduisant une peroxydation totale du β -carotène. L'extrait aqueux a pu maintenir les absorbances stables pendant les 4 premières heures (0.35), ces dernières ont chuté brusquement (22.86 %) pour arriver à 0.27 à la 6^{ème} heure. Après, on a constaté une diminution progressive des absorbances qui se sont stabilisées au fil du temps pour arriver à 0.22 à la 48^{ème} heure. Cependant, les absorbances du BHT ont été stables durant toute la période d'essai.

Cette méthode n'est pas à l'abri des interférences spectrales dues à la capacité de certains composés d'absorber dans la fenêtre spectrale du β -carotène. De plus, l'utilisation d'acides gras libres ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes (Frankel, 1998 ; Decker et al., 2005).

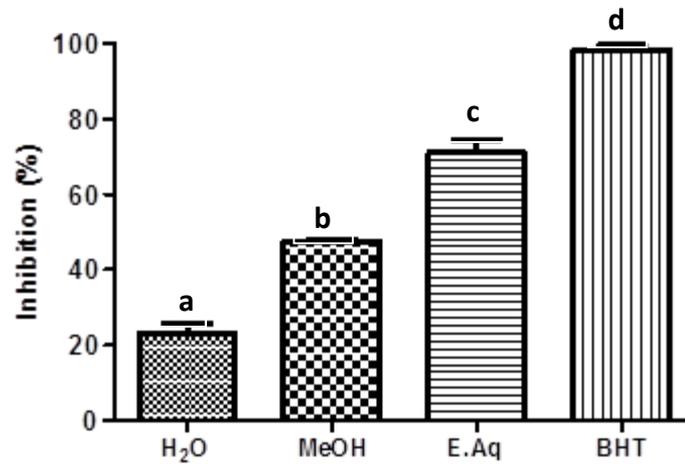


Figure 39 : Activité antioxydante relative de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* et du BHT dans le système acide linoléique/ β -carotène après 24 heures. Les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm SD. Les barres avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$, test de Tukey).

III.1.4. Pouvoir réducteur (FRAP)

L'extrait possède un pouvoir réducteur dose dépendant (figure 40), qui atteint un plateau à la concentration de 700 $\mu\text{g/ml}$. La valeur de l' EC_{50} de l'extrait ($249.55 \pm 1.33 \mu\text{g/ml}$) est nettement inférieure à celle du BHT ($16.56 \pm 1.38 \mu\text{g/ml}$), ce qui signifie que la capacité réductrice de l'extrait est 15 fois plus faible que celle de l'antioxydant de référence. L'extrait ne dispose que d'un faible pouvoir réducteur.

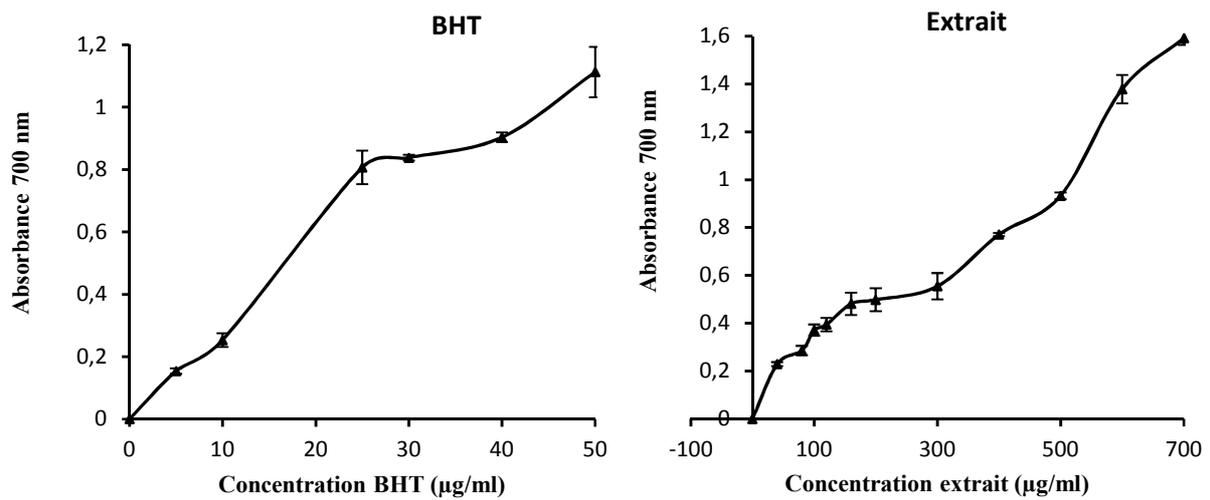


Figure 40 : Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais \pm SD.

Pour les espèces du genre *Limoniastrum*, il est possible de constater que même s'il existe des études qui ont déterminé l'activité antioxydante de quelques espèces tunisiennes, on observe un manque accru de travaux concernant les espèces algériennes. Ziani et al. (2015) ont trouvé que l'infusé des feuilles de *L. guyonianum* ($EC_{50} \approx 61.0 \mu\text{g/ml}$) est plus actif que ceux des 12 infusât de plantes médicinales recueillies de plusieurs régions arides et semi-arides d'Algérie mais son pouvoir réducteur est très inférieur de notre extrait. Belfar et al. (2009) affirment que l'extrait d'acétate d'éthyl ($EC_{50} \approx 0.16 \text{ mM}$) de *L. guyonianum* de la région de Ouaragla est plus actif que l'extrait butanolique ($EC_{50} \approx 1.89 \text{ mM}$).

Trabelsi et al. (2013a) ont montré que l'extrait hydro-acétonique de la partie aérienne de *L. guyonianum* ($EC_{50} \approx 98 \mu\text{g/ml}$) exprime un pouvoir réducteur ($EC_{50} \approx 98 \mu\text{g/ml}$) légèrement supérieur de l'extrait d'acétate d'éthyl ($EC_{50} \approx 120 \mu\text{g/ml}$) et presque 5 fois plus de l'extrait aqueux ($EC_{50} \approx 470 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats montrent que notre extrait aqueux possède un pouvoir réducteur presque 2 fois supérieur que celui de l'espèce tunisienne. De plus, dans une autre étude plus récente Trabelsi et al. (2013a) ont rapporté que l'extrait hydroacétonique de la partie aérienne de *L. guyonianum* ($EC_{50} \approx 142.67 \mu\text{g/ml}$) possède une capacité réductrice fortement supérieure (3.48 fois) à celle de *L. monopetalum* ($EC_{50} \approx 496.67 \mu\text{g/ml}$).

Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Ksouri et al. (2012) qui ont trouvé que les extraits obtenus avec le méthanol 80 % de *L. guyonianum* et de *L. monopetalum* sont pratiquement similaires avec des EC_{50} de 142 et 137 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'ensemble de ces résultats s'opposent à ceux de Debouba et al. (2013) qui affirment que l'extrait méthanolique de *L. monopetalum* ($EC_{50} \approx 42.33 \mu\text{g/ml}$) est 2 fois plus actif que celui de *L. guyonianum* ($EC_{50} \approx 109.5 \mu\text{g/ml}$). De leur part, Medini et al. (2012) ont démontré que l'extrait éthanolique de *L. delicatulum* est le plus efficace dans le test du pouvoir réducteur que tous les 4 autres extraits testés.

Bien qu'elle soit une méthode simple, rapide, peu coûteuse et robuste, la méthode FRAP n'implique aucun substrat oxydable et ne renseigne en rien sur la capacité du produit testé à protéger quelconque substrat biologique contre l'oxydation. De plus, ses résultats dépendent en grande partie du temps des analyses (Frankel et Meyer, 2000).

III.1.5. Chélation du fer ferreux

Le profil du pouvoir chélateur de l'extrait montre une cinétique non linéaire concentration dépendante (figure 41).

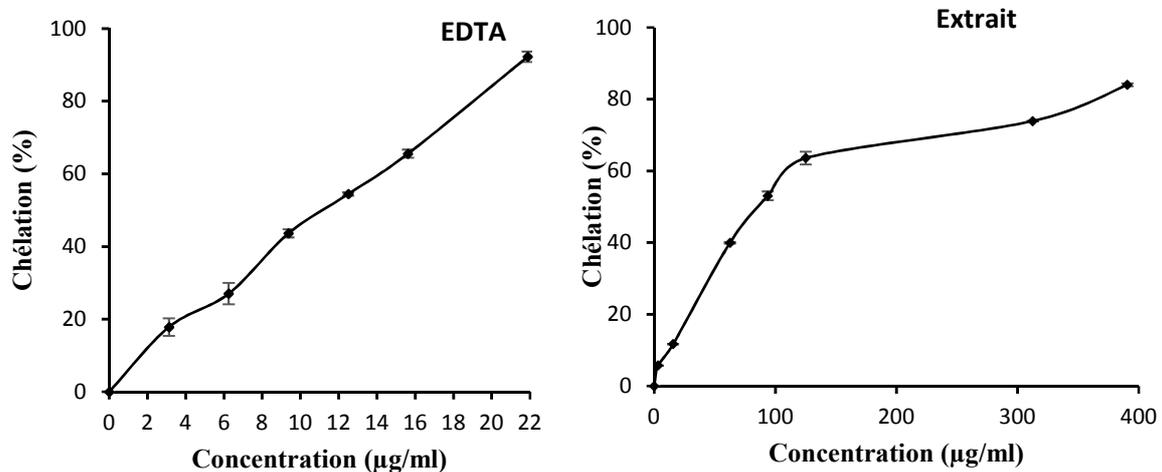


Figure 41 : Pouvoir chélateur de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* et de l'EDTA vis-à-vis du Fer ferreux. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais \pm SD.

L' EC_{50} de l'extrait 89.71 ± 8.59 $\mu\text{g/ml}$ est 7 fois plus grande que celle de l'EDTA 11.89 ± 0.34 $\mu\text{g/ml}$ mais elle dénote une certaine activité chélatrice (134.33 ± 12.86 mg Eq-EDTA/g d'extrait). Par sa nature brute, l'extrait pourrait contenir un certain nombre de chélateurs de fer qui diffèrent aussi bien par leurs structures et par leurs affinités et par conséquent leur compétition avec la ferrosine. La complexation des ions du fer par l'extrait est relativement notable, ce qui démontre une affinité de l'extrait brut pour ces ions.

L'EDTA possède deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, peut chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation du complexe Fe^{2+} -ferrosine (Luo et al., 2011). La structure biochimique des polyphénols est à l'origine d'une grande diversité de leurs propriétés dont leur aptitude à chélater les métaux. Debouba et al. (2013) ont démontré une forte activité chélatrice des extraits des espèces *Limoniastrum* tel est le cas des extraits méthanoliques de *L. guyonianum* ($EC_{50} \approx 191.63$ $\mu\text{g/ml}$) et de *L. monepetalum* ($EC_{50} \approx 90.15$ $\mu\text{g/ml}$). A l'opposé, des capacités chélatrices largement inférieures ont été enregistrées par Chaouche et al., 2014 pour d'autres espèces sahariennes (*Haloxylon articulatum* et *Solenostemma oleifolium*).

Plusieurs travaux ont mis en évidence les propriétés chélatrices des polyphénols, des acides phénoliques (Capecka et al., 2005) et plus particulièrement des flavonoïdes (Van Acker et al., 1996 ; Fernandez et al., 2002 ; Heim et al., 2002 ; Guo et al., 2007). Cette capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, notamment le fer et le cuivre est souvent proposée comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels (Genestra, 2007 ; Laguerre et al., 2007). En surcroît, les résultats de Sahreen et al. (2010) montrent que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants. Il a été également observé que les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère un pouvoir chélateur (Ozen et al., 2011).

Enfin, faut-il signaler que dans cette méthode, la chélation du fer ferreux est affectée à la fois par les constantes de formation des deux complexes antioxydant-Fe²⁺ et ferrosine-Fe²⁺ ce qui crée une vraie compétition entre les deux chélateurs. Il s'ensuit qu'un faible chélateur sera sérieusement sous-estimé lors d'une détermination quantitative. Néanmoins, elle permet d'établir un ordre du potentiel chélateur (Li et al., 2007).

III.2. Effet préventif de l'extrait contre l'hématotoxicité causée par le nickel

Les propriétés hémato-préventives et antioxydantes des métabolites secondaires et de la vit C contre la toxicité par le nickel ont été largement étudiées (Brucka-Jastrz et al., 2005; Das et al., 2007; Tikare et al., 2012 ; Boulila et al., 2014). Dans ce contexte, on a voulu déterminer l'effet protecteur du prétraitement par l'extrait aqueux contre la toxicité hématologique du nickel chez des souris.

Comme le montre la figure 42, le traitement au nickel seul a entraîné une diminution significative ($p < 0.01$) du nombre de GR et de GB, de la concentration Hb, du Ht, du nombre de Plt, et du VGM par rapport au groupe témoin. De même, le prétraitement à l'extrait aqueux et de la vit C a montré une diminution significative ($p < 0.05$) de ces mêmes paramètres. L'extrait de *L. guyonianum* s'est montré plus efficace par rapport à l'antioxydant de référence la vit C.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de Das et al. (2007), qui selon cet auteur la diminution du nombre de GR, du pourcentage de Ht et de la concentration d'Hb peut être due à une anémie non régénérative découlant de la lésion directe induite par le nickel des cellules souches hématopoïétiques, ce qui a entraîné une diminution des GR, des GB et des Plt. Bien avant, Merchant et Modi (2004) ont déjà affirmé que le nickel perturbe l'activité de la moelle osseuse à produire les différents types des cellules sanguines. D'autres études subséquentes ont

montré que le nickel et ses dérivés sont capables d'induire des altérations morphologiques au niveau des cellules sanguines surtout les GR et GB (Das et *al.*, 2007 ; Tikare et *al.*, 2012). De plus, le nickel est capable de provoquer une lésion oxydante dans les GR à la suite de la génération d'espèces réactif à l'oxygène (Das et *al.*, 2007; Novelli et *al.*, 1990).

La faible concentration d'Hb observée peut être liée à la perturbation de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème (Hosokawa et *al.*, 1987). Notre extrait et la vit C ont ramené les paramètres hématologiques précédents approximativement à leurs valeurs normales. Cependant, il est à noter que l'extrait s'est avéré plus efficace que la vit C dans la réduction de l'effet hématotoxique du nickel et ceci de manière dose-dépendante. Une étude de l'effet combiné de l'extrait de la plante et de la vit C serait nécessaire pour déduire la nature de cette action (antagoniste ou synergique).

Plusieurs travaux ont déjà mentionné les effets protecteurs des polyphénols, des flavonoïdes (Hfaiedh et *al.*, 2008 ; Adeyemi et Elebiyo, 2014) et de la vit C (Das et *al.*, 2007) contre la toxicité du Nickel. Nous suggérons que l'effet préventif de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* serait dû à la présence d'acides phénoliques et des flavonols capables de stimuler le processus de l'hématopoïèse.

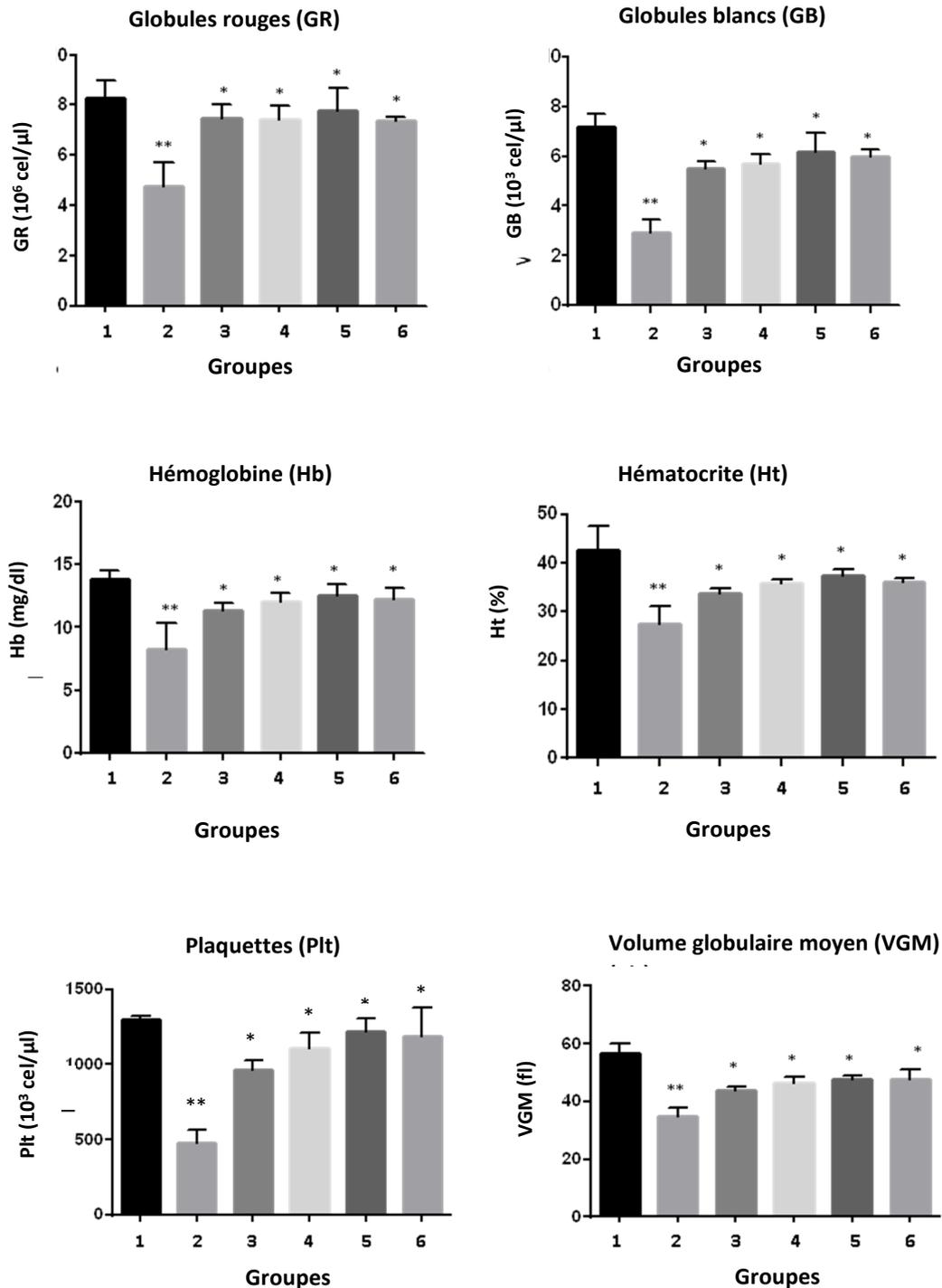


Figure 42 : Variation des taux des globules rouges et blancs (GB), d'hémoglobine (Hb) et d'hématocrites (Ht) et de plaquettes (Plt) et du volume globulaire moyen (VGM), chez les souris témoins (groupe 1) et les groupes traités : (2) Nickel (10 mg/kg) ; 3- Nickel + 50 mg/kg d'extrait ; 4- Nickel + 100 mg/kg d'extrait aqueux ; 5- Sulfate de Nickel + 200 mg/kg d'extrait aqueux ; 6- Nickel + 16,6 mg/kg de Vit C. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n =5), *: p<0.05, **: p<0.01, * : p<0.05 (ANOVA).

IV. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-œdémateuse de l'extrait aqueux a été étudiée par voie générale et par voie topique.

IV.1. Œdème de la patte du rat induit par la carragénine

Ce test permet de déterminer à la fois l'action préventive et curative des composés pharmacologiques (Whiteside et *al.*, 2005). Les volumes moyens des œdèmes des pattes des rats témoins et traités mettant en valeur l'évolution de l'œdème en fonction du temps sont illustrés dans la figure 43.

L'injection sous plantaire de la carragénine au groupe témoin négatif provoque une inflammation visible dans l'heure qui suit cette injection. L'œdème augmente progressivement et atteint une valeur maximale (2.5 ± 0.09 ml) au bout de 4 heures. Le prétraitement oral des rats par l'extrait aux doses (50, 100 et 200 mg/kg pc) et par 5 mg/kg pc de diclofénac prévient de façon significative la formation de l'œdème. L'effet inhibiteur du diclofénac se manifeste dès la 2^{ème} heure qui suit l'injection de la carragénine (50.0 %) et évolue au fur et à mesure pour atteindre 68.63 % à la 3^{ème} heure et 74 % à la 4^{ème} heure.

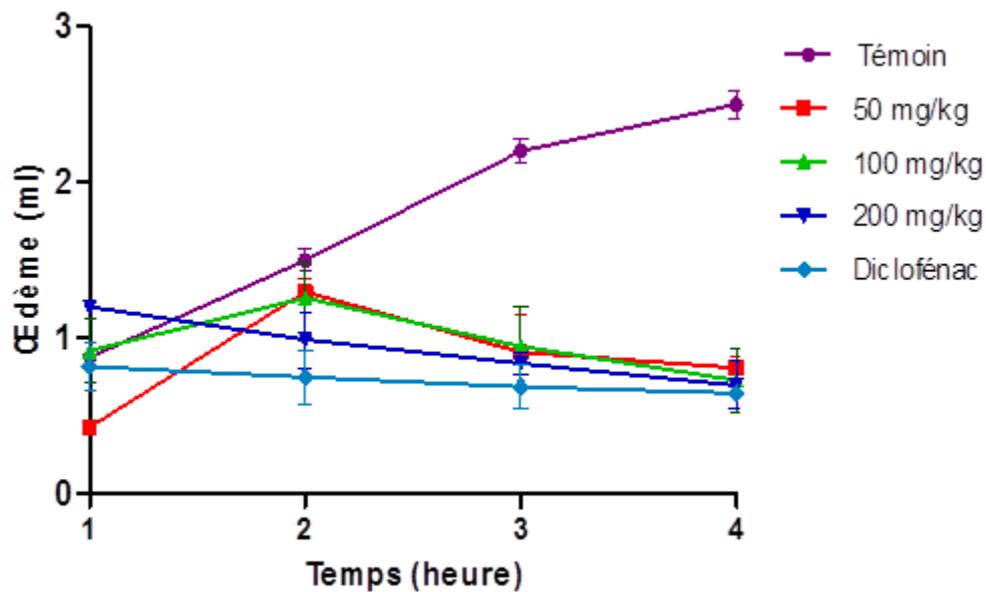


Figure 43 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du diclofénac (5 mg/kg pc) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. Chaque valeur représente la moyenne ($n=5$) \pm SEM.

Le prétraitement des rats, par l'extrait à la dose de 50 mg/kg pc entraîne un changement de l'évolution du volume de l'œdème qu'à partir de la 3^{ème} heure mais avec un pourcentage d'inhibition élevé de l'ordre de 58.63 % et qui atteint une heure après 67.6 %. De même, l'effet inhibiteur de l'extrait à la dose de 100 mg/kg pc ne se manifeste significativement qu'au bout de 3 heures (56.81 %) pour se situer à 72.0 % à la 4^{ème} heure. Par contre, l'administration de l'extrait à la dose de 200 réduit de façon significative (34.0 %) l'œdème plantaire chez le rat dès la 2^{ème} heure du traitement et atteint 68.63 et 74.0 % respectivement à la 3^{ème} et la 4^{ème} heure.

Les pourcentages d'inhibition de l'œdème 4 heures après l'injection de la carragénine sont présentés par la figure 44. Le traitement statistique des résultats montre aucune différence significative entre les différents traitements à l'extrait et l'anti-inflammatoire le diclofenac. L'extrait exerce un effet anti-inflammatoire remarquable à faible dose et de même grandeur que celui du diclofénac mais qui se manifeste plus tardivement.

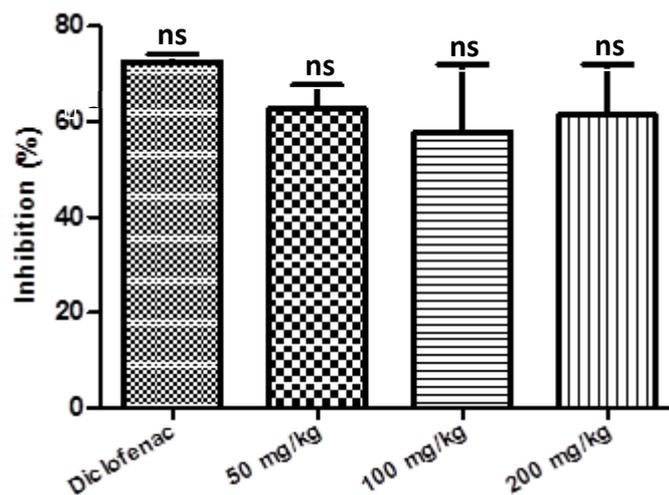


Figure 44 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du diclofenac (5 mg/kg pc) sur l'œdème 4 heures après l'injection de la carragénine. Chaque valeur représente la moyenne (n=5) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

La capacité de l'extrait brut à diminuer la réponse inflammatoire induite par la carragénine à faible dose (50 mg/kg pc) évoque de la présence de substances à potentiel anti-inflammatoire élevé. Cette activité anti-inflammatoire est liée au profil chimique de cet extrait qui est particulièrement riche en composés bioactifs polaires, principalement des acides phénoliques, des flavones, des flavanols, des tanins, des saponosides et des terpènes. En fait, plusieurs auteurs ont rapporté le rôle anti-inflammatoire des flavonoïdes en tant que molécules capables d'inhiber les oxydants libérés par les leucocytes et d'autres phagocytes dans la zone

inflammatoire entretenant ainsi l'inflammation (Pathak et *al.*, 1991 ; Da Silva et *al.*, 1994 ; Galati et *al.*, 1994 ; Pelzer et *al.*, 1998 ; Amezouar et *al.*, 2013).

Tapas et al. (2008) affirment que les flavones et les flavonols tels que la quercétine, le kaempférol et la myricétine ont une activité inhibitrice des cyclo-oxygénases. L'analyse de notre extrait par HPLC-TOF/MS a révélé sa richesse particulière en eupatorine et en diosmine (flavones). D'autres études précisent que certaines flavones (apigénine, lutéoline et hydroxyflavone) et d'autres flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T, tandis que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B mais l'explication reste inconnue (Namgoong et *al.*, 1994).

Au cours de cette étude, il a été constaté que l'extrait inhibe l'évolution de l'œdème à toutes les phases à des degrés divers. Toutefois, un maximum d'inhibition est noté à partir de la 3^{ème} heure après administration de la carragénine. Cela nous laisse penser que l'extrait exercerait son action inhibitrice sur la libération des médiateurs impliqués dans la 2^{ème} phase de l'inflammation aiguë, notamment les cyclo-oxygénases (Ouédraogo et *al.*, 2012), responsables de la synthèse des prostaglandines. Ce mode d'action est celui du diclophénac, qui exerce son pouvoir anti-inflammatoire par inhibition de la cyclo-oxygénase et/ou la lipoxigénase empêchant ainsi la production des prostaglandines et des cytokines.

IV.2. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris

La figure 45 représente les résultats de ce test. Dans ce modèle d'inflammation aiguë, les souris du groupe témoin ayant reçu l'huile de croton par application locale sur la face interne de l'oreille droite ont développé au bout de 6 heures un œdème de $85.0 \pm 5.7 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

Le traitement local des souris avec l'indométacine à la dose de 0.5 mg/oreille a provoqué un effet inhibiteur de l'inflammation important ($71.59 \pm 6.19 \%$) et significativement différent du contrôle. De sa part, l'extrait a montré un effet anti-inflammatoire dose dépendant. Appliqué préventivement à raison de 2 mg/oreille, l'effet de l'extrait se traduit par une inhibition significative de l'œdème de $86.15 \pm 2.39 \%$. L'effet anti-œdémateux de l'extrait aqueux à des doses de 0.5 et 1 mg/oreille est faible et les pourcentages d'inhibition enregistrés sont de l'ordre de 18.71 ± 2.39 et $28.50 \pm 5.01 \%$ respectivement.

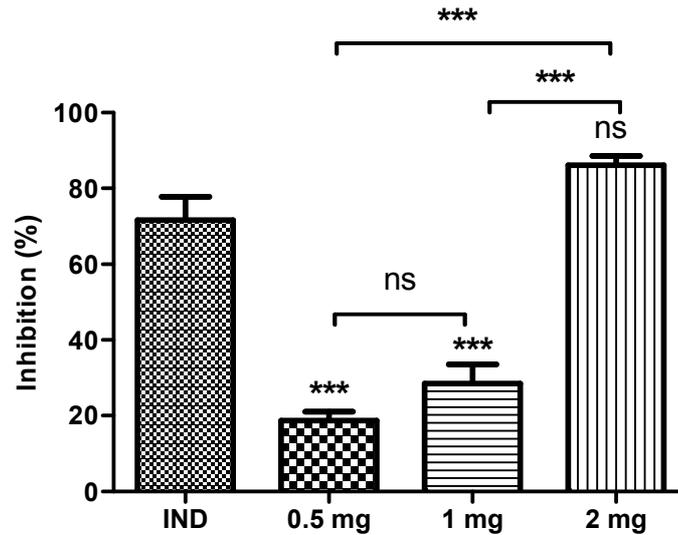


Figure 45 : Effet inhibiteur de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (0.5, 1 et 2 mg/oreille) et de l'indométacine (IND) sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. Chaque valeur représente la moyenne ($n=8$) \pm SEM ($p < 0.05$, test de Tukey).

L'installation de l'œdème débute par une réponse inflammatoire marquée par une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une infiltration de neutrophiles (Garg et *al.*, 2008). Cette phase précoce appelée phase vasculaire ou cellulaire est aussi caractérisée par l'afflux des cellules épidermiques ce qui entraîne une hyperplasie inflammatoire (Malaviya et *al.*, 2006). L'œdème augmente de volume progressivement et son épaisseur atteint son maximum 6 heures après l'application de l'huile de croton (Tubaro et *al.*, 1985).

L'effet anti-inflammatoire relativement faible de l'extrait aqueux observé dans ce modèle par rapport à son pouvoir accru dans la modèle à la carragénine est probablement dû au caractère hautement polaire de ses composés. Ces molécules anti-inflammatoires hydrosolubles ne peuvent traverser la barrière cutanée ce qui expliquerait ce résultat qui est en concordance avec ceux de Seidel (2005). En effet, la barrière épidermique est essentiellement constituée par la couche cornée qui est surtout une barrière limitante de caractère lipophile (Wepierre, 1977). Les composés lipophiles pourraient s'y dissoudre et diffuser dans la matrice lipidique située entre les mailles de kératine et au sein des lipides intercellulaires. Les petites molécules hydrophiles beaucoup moins diffusibles migreraient lentement au sein des régions riches en eau. Le résultat est que les extraits moins polaires expriment une activité anti-inflammatoire plus marquée que celle des extraits plus polaires. Les acides phénoliques et en particulier les flavonoïdes révélés et quantifiés lors de l'étude photochimique peuvent expliquer cet effet anti-

inflammatoire. En effet, l'application topique de la quercétine et la myricétine exerce une forte inhibition sur la cyclo-oxygénase (COX) et la lipo-oxygénase mais ne réduit pas l'œdème et que l'effet anti-inflammatoire serait dû à la présence de composés doués d'activité antioxydante (Kim et al.,1998). Ce résultat a été appuyé ultérieurement par d'autres études comme celles de Conforti et al. (2008) et

V. Activité analgésique

L'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP, 1979) a défini la douleur comme une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes (Emamuzo, et al., 2010). Le criblage de l'effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* a été étudié selon ses deux composantes périphérique et centrale. Les modèles animaux sont communément utilisés pour évaluer l'activité analgésique des extraits de plantes (Le Bar, 2001). De nombreux tests de nociception sont disponibles et fournissent de bons outils pour l'étude de l'activité analgésique.

V.1. Activité analgésique périphérique

V.1.1. Test de torsion

Les tests d'acide acétique sont fréquemment utilisés pour évaluer les composés à activité analgésique périphérique (Le Bars, 2001). Les résultats du test de Koster sont consignés dans le tableau 12 et illustrés par la figure 46.

Tableau 12 : Effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (100 mg/kg pc) sur les contractions abdominales induites chez les rats par l'injection de l'acide acétique. Chaque valeur représente la moyenne (n=5) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

Groupes	Nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	210 ± 9.30 ^a	---
Extrait 50 mg/kg pc	143.0 ± 2.32 ^b	31.6 ± 2.32 ^a
Extrait 100 mg/kg pc	114 ± 2.53 ^b	45.4 ± 2.38 ^a
Extrait 200 mg/kg pc	78 ± 9.59 ^c	63.0 ± 4.30 ^b
Paracétamol 100 mg/kg pc	50 ± 9.92 ^c	75.6 ± 5.20 ^b

Dans une colonne les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes.

L'injection de l'acide acétique à la dose de 10 ml/kg par voie IP provoque une moyenne de 210.0 ± 9.30 crampes comptabilisées au bout de 20 minutes chez le lot témoin. L'administration *per os* du paracétamol à la dose de 100 mg/kg pc, prévient de façon significative l'apparition de contorsions (50 ± 9.92) ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de 75.6 ± 5.20 %. Pour une dose d'extrait de 50 et 100 mg/kg pc, le pourcentage d'inhibition est de 31.6 ± 2.32 % et 45.4 ± 2.38 % respectivement. À la dose de 100 mg/kg pc, l'extrait montre une activité analgésique périphérique marquée avec un pourcentage de protection de 45.4 ± 2.38 %. À une dose de 200 mg/kg pc l'extrait montre une activité analgésique périphérique notable avec un pourcentage d'inhibition de 63.0 ± 4.30 % des crampes abdominales induites, valeur largement comparable à l'action du paracétamol à 100 mg/kg pc. L'extrait présente donc une action analgésique périphérique de type paracétamol 200 mg/kg pc par voie orale (figure 46).

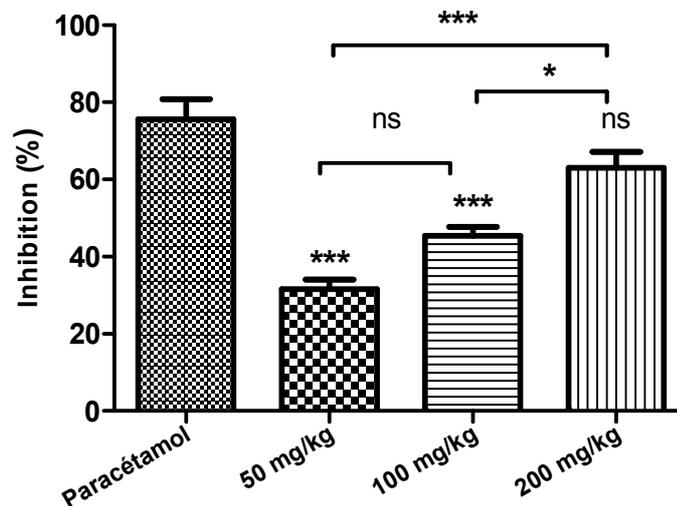


Figure 46 : Effet analgésique périphérique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (100 mg/kg pc) vis à vis de la douleur induite par l'acide acétique chez les rats (test de Koster). Chaque valeur représente la moyenne (n=5) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

L'injection de l'acide acétique (algogène) provoque une lésion tissulaire et stimule la libération de nombreux médiateurs chimiques impliqués dans la douleur tels que la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et les prostaglandines (Amresh, 2006). Ces dernières sensibilisent les nocicepteurs aux stimuli douloureux et en résulte une douleur plus tardive et diffuse (Collier et al., 1968 ; Le Bars et al., 2001). Ces médiateurs ont été mis en évidence en proportions élevées dans les exsudats péritonéaux de rongeurs après injection d'acide acétique (Deraedt, 1980). Cette douleur se manifeste chez les rats et les souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

Le paracétamol ou para-acétyl-amino-phénol (classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés) agirait sur les mécanismes de la douleur en intervenant dans la biosynthèse de prostaglandines (Vane et Ferreira, 1979). Au vu de nos résultats, l'extrait présente donc une action analgésique périphérique de type paracétamol 200 mg/kg pc par voie orale. Cet effet analgésique se rapproche de celui de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Notre étude sur *L. guyonianum* est la première qui met en évidence un effet analgésique périphérique. La capacité de l'extrait à réduire le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique suggère que l'extrait possède une action antinociceptive périphérique par inhibition de l'activité des lipo-oxygénases ou des cyclo-oxygénases et la production des prostanoïdes (PGE2 et PGE2 α) et des médiateurs inflammatoires (Ballou et al., 2000 ; Dou et al., 2004 ; Malairajan et al., 2006 ; de Queiroz et al., 2010).

Comme il a été démontré dans l'étude phytochimique, les feuilles de *L. guyonianum* contiennent des composés phénoliques, des flavonoïdes, des stérols, des saponines et des tanins. Ces composés sont connus, d'être doués de propriétés analgésiques dans d'autres plantes médicinales telles que *Argania spinosa* (Alaoui et al., 1998), *Capparisovata* (Arslan et al., 2010), *Phyllanthus carolinienses* (Cechinel-Filho et al., 1996), *Aloe vera* (Jia et al., 2008), *Jatropha curcas* (Uche et Aprioku, 2008), *Jatropha gossypifolia* (Panda et al., 2009), *Elephantopus tomentosus* (Yam et al., 2009), *Citrullus colocynthis* (Marzouk et al., 2010) et *Myracrodruo nurundeuva* (Viana et al., 1998).

Le test à l'acide acétique permet la mise en évidence des effets analgésiques non spécifiques et de faibles intensités (Vogel, 1997). De ce fait, il n'est utile que pour effectuer un premier tri des substances possédant une action analgésique (Le Bars et al., 2001).

V.1.2. Test à l'algésimètre

L'activité analgésique périphérique de l'extrait a été étudiée cette fois-ci sur des rats par le test à l'algésimètre qui permet l'induction d'une douleur mécanique. Le tableau 12 et la figure 47 ci-après, résument les résultats obtenus. L'extrait dosé à 50, 100 et 200 mg/kg pc *per os* a significativement augmenté le seuil de sensibilité à la douleur (temps de réaction) de façon dose dépendante.

Le groupe contrôle négatif a présenté un temps de réaction moyen de 51.66 ± 0.23 s qui est largement inférieur à celui de la plus faible dose de l'extrait administré (116.66 ± 0.31 s). Cet effet analgésique a été plus notable aux doses 100 et 200 mg/kg pc (tableau 13). Le paracétamol (50 mg/kg pc) a augmenté significativement le seuil de perception de la douleur

(220.66 ± 0.55 s), soit un taux de variation de 327.62 ± 0.53 %. Néanmoins, ce pourcentage n'est pas loin de celui obtenu avec 200 mg/kg pc d'extrait. Ces résultats appuient ceux obtenus précédemment avec le writhing test ce qui démontre encore une fois l'action antinociceptive périphérique de l'extrait.

Tableau 13 : Action antinociceptive périphérique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (50 mg/kg pc) mesuré par l'algésimètre. Chaque valeur représente la moyenne (n=5) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey)

Groupes	Seuil de perception de la douleur (s)	Pourcentage d'augmentation du seuil de sensibilité (%)
Témoin	51.66 ± 0.1 ^a	---
Extrait 50 mg/kg pc	116.68 ± 0.18 ^b	125.81 ± 0.19 ^a
Extrait 100 mg/kg pc	171,66 ± 0.24 ^c	232.28 ± 0.33 ^b
Extrait 200 mg/kg pc	200.0 ± 0.13 ^d	287.48 ± 0.21 ^c
Paracétamol 50 mg/kg pc	220.66 ± 0.32 ^e	327.62 ± 0.53 ^d

Dans une colonne les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes.

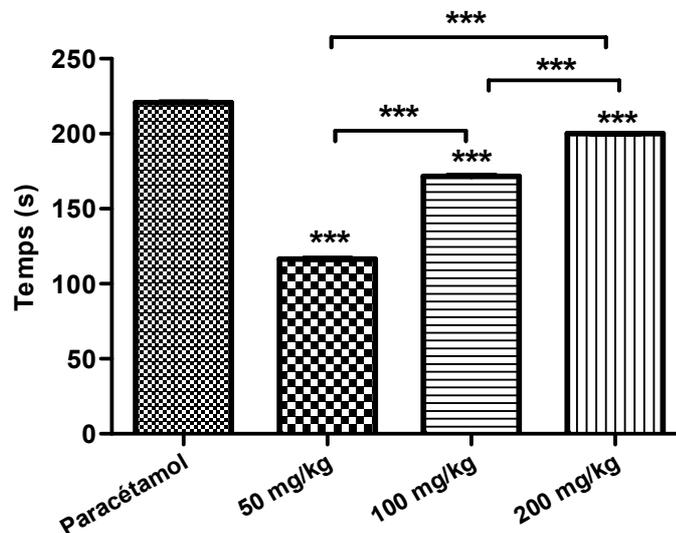


Figure 47 : Effets analgésique périphérique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et du paracétamol (50 mg/kg pc) sur le seuil de sensibilité à la douleur induite par l'algésimètre. Chaque valeur représente la moyenne (n=5) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

L'effet de l'extrait de la plante a été évalué sur la douleur de type périphérique avec l'algésimètre. Le traumatisme tissulaire provoqué par stimulation mécanique engendre le gonflement local des tissus traumatisés responsables de la libération de la bradykinine, la sérotonine, les ions potassium et l'hydrogène (Guirimand, 2003). Ces substances sont

classiquement des substances algogènes qui activent les nocicepteurs (Dray, 1994). La production de l'acide lactique, l'histamine, de la substance P, et les prostaglandines sont également à l'origine des douleurs rencontrées au cours de l'ischémie ou d'exercices musculaires (Guirimand, 2003). Les prostaglandines et les leucotriènes sont algogènes et jouent un rôle essentiel par sensibilisation d'autres récepteurs (Marnett et al., 1999). Le fait que l'extrait aqueux de la plante s'oppose à la douleur par algésimètre suggère qu'il inhibe la libération de toutes ces substances algogènes.

V.2. Activité analgésique centrale par le test du Tail Flick

Le réflexe de retrait de la queue des souris est mesuré avant et après l'administration des extraits et ou de la morphine. Ce temps sera plus ou moins amplifié en cas d'un effet analgésique. Les résultats du test de Tail Flick illustré par des courbes sont regroupés dans la figure 48.

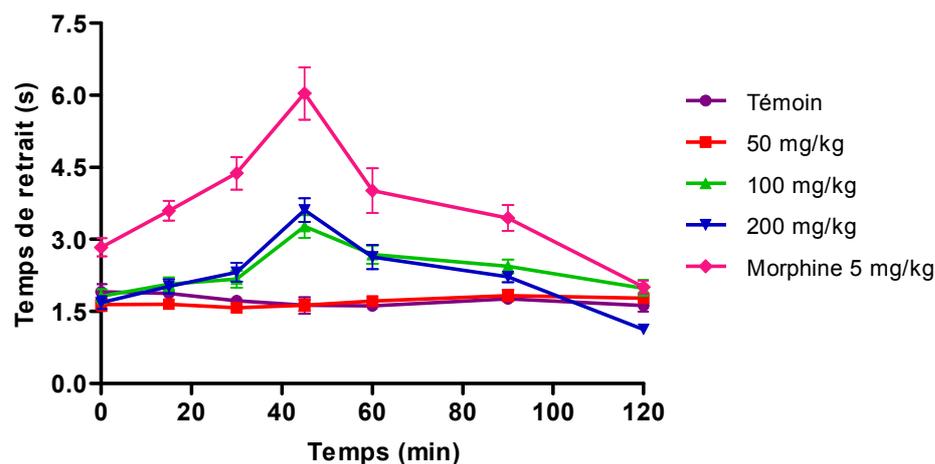


Figure 48 : Effet analgésique central de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et de la morphine (5mg/kg pc) sur le temps de latence du retrait de la queue chez la souris. Chaque valeur représente la moyenne (n=8) ± SEM.

Le test d'immersion de la queue a montré que l'extrait a augmenté le seuil de perception de la douleur suggérant une activité analgésique centrale. Cet effet antinociceptif s'est manifesté de façon apparente aussi bien pour l'extrait que pour la morphine à la 45^{ème} minute où les plus grands temps de latence ont été enregistrés. A la dose de 50 mg/kg pc l'extrait n'a pas inhibé significativement la douleur comparativement au groupe témoin. Le temps de latence du retrait de la queue est de 1.63 ± 0.19 s et qui est pratiquement égal à celui du témoin (1.63 ± 0.17 s) ce qui exclut toute activité antinociceptive de l'extrait à cette dose (figure 48). De plus, il est aisément facile de constater que ce temps maximum de réflexe n'a pas dépassé le seuil d'inhibition de la douleur, l'extrait n'a donc aucune action analgésique centrale à cette dose.

Aux doses de 100 et 200 mg/kg pc l'extrait a significativement augmenté le seuil de perception de la douleur ce qui reflètent en réalité une réduction significative de la sensation de la douleur causée par l'eau chaude par rapport au groupe témoin (figure 49). De même, la morphine à 5 mg/kg pc a augmenté significativement le temps de réflexe de retrait de la queue à 6.04 ± 0.55 s ce qui dénote une insensibilité de l'animal à la douleur provoquée par le stimulus thermique. Cette valeur est presque 2 fois supérieure à celle de l'extrait (3.61 ± 0.24 s à 200 mg/kg pc) ce qui témoigne son action analgésique centrale légère (figure 49).

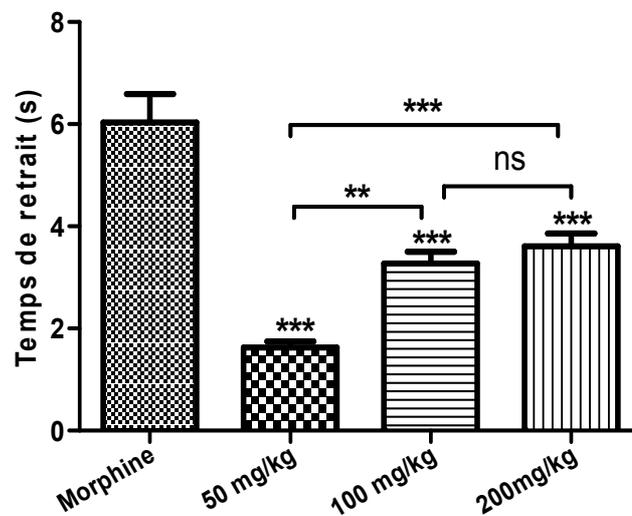


Figure 49 : Comparaison de l'activité analgésique centrale de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) et de la morphine (5mg/kg pc) après 45 min de traitement chez la souris. Chaque valeur représente la moyenne (n=8) ± SEM (p < 0.05, test de Tukey).

Il est connu que les stimuli thermiques sont sélectivement inhibés par les analgésiques centraux et non par les analgésiques périphériques (Chang et Lewis, 1989 ; Sayyah, 2004). De plus, seuls les analgésiques centraux augmentent le temps de latence au saut de l'animal (Sacerdote et al., 1997). Le Bars et al. (2001) classait ce test parmi les méthodes qui permettent d'identifier les analgésiques centraux puisqu'il met en jeu un réflexe spinal qui pourrait aussi impliquer les structures neuronales.

L'extrait administré à la concentration de 200 mg/kg pc a révélé une action analgésique centrale non négligeable type « morphine-like », la morphine est un analgésique central. La méthode de l'immersion de la queue dans l'eau chaude est considérée comme sélective pour des composés à affinité opioïde. Cela peut laisser supposer que l'extrait agit par une voie périphérique en inhibant les prostaglandines et par une voie centrale en inhibant des récepteurs

centraux. Comme il a été déjà signalé l'extrait aqueux de *L. guyonianum* contient des flavonoïdes et des saponines qui sont des inhibiteurs des prostaglandines et des phénomènes inflammatoires. Cette étude ne permet pas de donner des assertions finales mais elle sert plutôt de base solide pour orienter d'autres recherches ultérieures afin d'isoler la (ou les) molécule(s) responsables de l'activité de l'extrait voire même de déterminer son mécanisme d'action pour caractériser au mieux son effet anti-inflammatoire et analgésique.

VI. Activité Antipyrétique

La mise en évidence de l'activité antipyrétique de l'extrait aqueux a été réalisée selon le protocole décrit par Abena et al. (1995). L'administration de la suspension de levure engendre une élévation de température rectale après 18 heures de son injection. L'extrait aqueux et le paracétamol entraînent une diminution significative de la température rectale des rats traités par rapport aux non traités (figure 50).

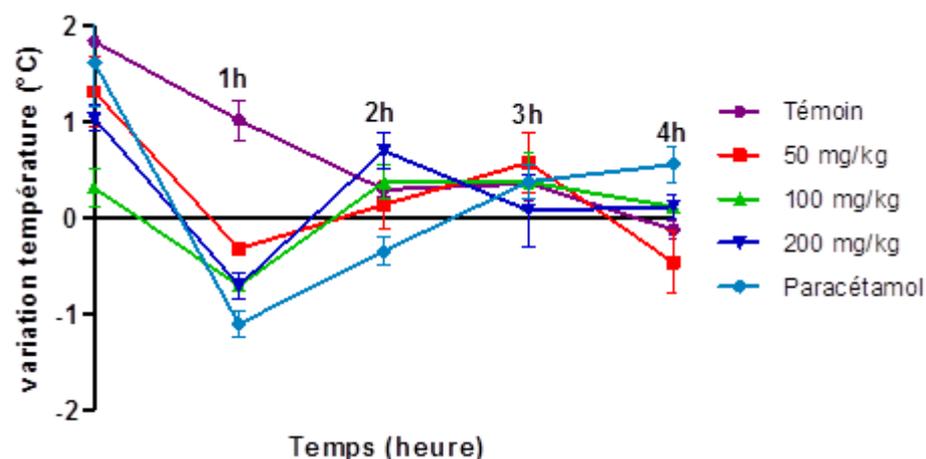


Figure 50 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) sur l'évolution des températures rectales des rats après induction de l'hyperthermie. Chaque valeur représente la moyenne (n=5) \pm SEM.

Le paracétamol (antipyrétique de référence) à la dose de 150 mg/kg pc a provoqué la plus forte réduction de la température à la 1^{ère} heure (- 1.1°C) et à la 2^{ème} heure (- 0.34°C). A l'opposé, l'extrait a abaissé significativement l'hyperthermie et de façon dose-dépendante comparativement au groupe témoin mais seulement à la 1^{ère} heure. Cette activité antipyrétique a commencé à diminuer dès la 2^{ème} heure où on observe une augmentation des températures rectales. En résumé, l'extrait s'est montré moins efficace que le paracétamol aussi bien sur le plan dose, que sur le plan temps d'action (figure 51).

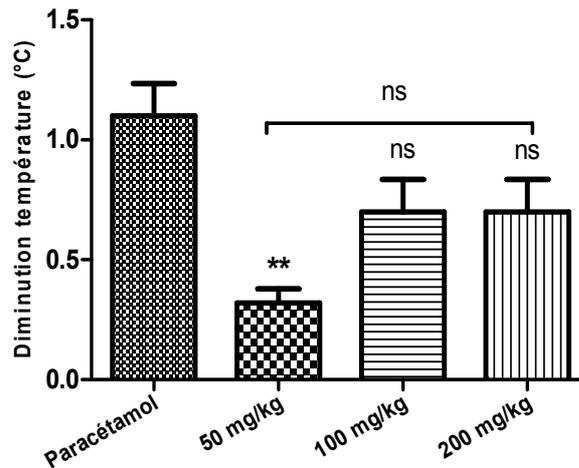


Figure 51 : Effet antipyrétique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (50, 100 et 200 mg/kg pc) sur l'hyperthermie induite une heure après injection de la levure de bière. Chaque valeur représente la moyenne ($n=5$) \pm SEM ($p < 0.05$, test de Tukey).

Lors d'une réaction inflammatoire ou d'une infection comme c'est le cas de la levure de bière, l'hyperthermie est induite par la libération des cytokines suivantes : interleukines 1 β et 6, interférons α et β et le TNF- α . Ces molécules induisent alors une production de PGE2 au niveau de l'aire pré-optique hypothalamique qui provoque une élévation de température *via* une transduction AMPc dépendante (Goodman, 1996). Les AINS et plus particulièrement le paracétamol diminuent la fièvre, quelle que soit son origine (infectieuse, inflammatoire ou néoplasique) par inhibition de la libération hypothalamique de PGE2. Ce pouvoir antipyrétique dépend de leur capacité à passer la barrière hémato-méningée et à inhiber les cyclo-oxygénases (Rubin et Papich, 1989). L'effet antipyrétique de l'extrait pourrait être également dû à la réduction de la libération des cytokines et de la biosynthèse des prostaglandines.

En somme, l'extrait agit au moment de la phase précoce de l'inflammation qui se caractérise par la libération de nombreux médiateurs par inhibition des prostaglandines. Cette inhibition des prostaglandines pourrait intervenir également dans l'activité analgésique. Les prostaglandines sensibilisent les récepteurs périphériques de la douleur à l'action algogène d'autres médiateurs (bradykinine et histamine), ainsi le blocage de leur synthèse entraîne la suppression des effets de sensibilisation et diminue ainsi la douleur. L'effet antipyrétique observé serait également dû au même mécanisme.

VII. Activité thrombolytique

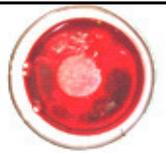
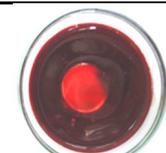
Les différents traitements utilisés pour soigner les thromboses présentent tous des effets secondaires graves d'où la nécessité de rechercher de nouveaux agents thrombolytiques. L'objectif des travaux présentés dans cette partie est dans un premier temps d'explorer l'activité thrombolytique de l'extrait sur un modèle développé sur des boîtes de Pétri ensuite, le testé en *ex vivo* sur un modèle de caillot sanguin afin de démontrer son efficacité et enfin, une étude cinétique est menée.

VII.1. Mise en évidence de l'activité thrombolytique

L'activité thrombolytique de l'extrait aqueux étudié a été réalisée selon le protocole décrit par Singh et al. (2011) et qui consiste à observer le potentiel fibrinolytique de caillot sanguin formé préalablement dans des boîtes de Pétri. La lecture se fait par comparaison au témoin contenant l'eau distillée stérile.

Les résultats, illustrés sous forme de photographies (pour 0 et 3 heures) et consignés dans le tableau 14, indiquent clairement que l'extrait possède des propriétés thrombolytiques, mais plus faibles que celle de la streptokinase. Cette capacité est clairement visible à la 3^{ème} heure et elle est d'autant potentialisée par l'augmentation de la concentration de l'extrait et le temps d'action.

Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité thrombolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* en présence d'un contrôle négatif (H₂O) et un autre positif (streptokinase)

Temps (heure)	Contrôle négatif (H ₂ O)	Extrait (mg/ml)			Streptokinase
		5	10	15	
0					
3					

VII.2. Mesure de l'activité thrombolytique en *ex vivo*

Les résultats de la mise en évidence de l'activité thrombolytique de l'extrait nous ont poussé à l'évaluation de son pouvoir thrombolytique. Cette activité a été étudiée selon le protocole développé par Prasad et al. (2006) qui consiste à provoquer la formation *in vitro* d'un thrombus (caillot sanguin) et d'évaluer par la suite l'effet de l'extrait de la plante sur la lyse de ce thrombus. Ce procédé reproduit de façon artificielle le phénomène physiologique de fibrinolyse. En effet, en présence d'agents thrombolytiques, le plasminogène est activé en plasmine qui provoque la lyse du réseau de fibrine en petits fragments.

Pour mener cette étude nous avons testé 3 concentrations d'extrait (5, 10 et 15 mg/ml). Les résultats obtenus (figure 52) montrent la présence d'une différence très significative entre les trois concentrations, le contrôle négatif et la streptokinase. Les résultats de la figure 52 montrent que l'extrait a une activité de lyse du caillot dose-dépendante allant de 10.08 ± 1.27 à 30.08 ± 4.76 %, des taux importants mais loin d'atteindre la streptokinase (71.01 ± 2.66 %).

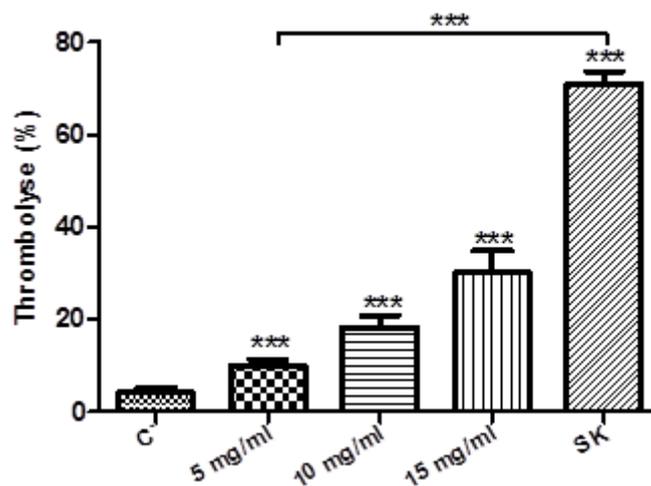


Figure 52 : Pouvoir thrombolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (5, 10 et 15 mg/ml) et de la streptokinase (SK), le contrôle négatif (C-) ne contient que de l'eau. Chaque valeur représente la moyenne ($n = 60$) \pm SD pour 20 volontaires ($p < 0.05$, test de Tukey).

La streptokinase, une protéine bactérienne possédant un pouvoir antigénique, active le plasminogène qui génère la plasmine qui dégrade la fibrine et dissout le caillot. De ce fait, elle n'est pas efficace sur tous les types de caillots sanguins et ne peut briser spécifiquement que les réseaux de fibrine composant le thrombus (Molina et al., 2004). De nos jours, les thrombolytiques sont d'utilisation restreinte (urgence), puisqu'ils engendrent des effets indésirables parfois fatals en plus ils sont très coûteux.

De nombreuses plantes de différentes familles se sont révélées réellement efficaces contre les thromboses telles que *Camellia sinensis* (Hossain et Shahrin, 2014), *Bacopa monnieri*, *Fagonia Arabica* (Prasad et al., (2007), *Swertia chirata* (Hossain et al., 2012) et *Vitex negundo* (Khan et al., 2013). Cependant, il est possible de constater l'absence d'études sur l'activité thrombolytique des espèces *Limoniastrum* et *Limonium*.

D'autres plantes riches en acides phénols, tanins, lignines, flavonoïdes, saponines, glycosides et terpènes ont démontré une bonne capacité thrombolytique, qui a été corrélée avec la teneur en ces composés (Dwivedi et al., 2012 ; khan et al., 2013).

VII.3. Etude cinétique de l'activité thrombolytique

Les concentrations 10 et 15 mg/ml déterminées précédemment comme efficaces sont utilisées pour l'étude cinétique. L'effet du temps d'incubation sur la capacité de thromolyse de l'extrait a été évalué selon le protocole décrit par Elumalai et al. (2012) pour des temps d'incubation de 24, 48 et 72 h. Les courbes d'évolution de l'activité thrombolytique en fonction du temps sont illustrées dans la figure 53.

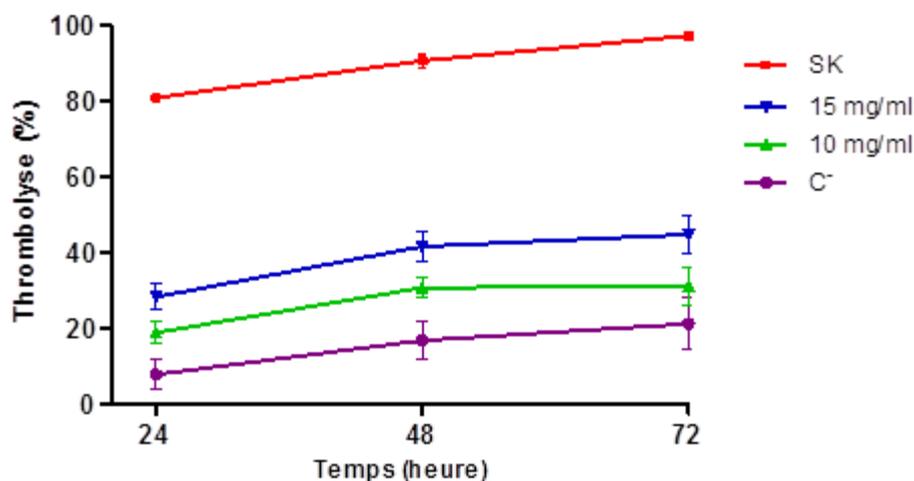


Figure 53 : Effet du temps d'incubation sur la capacité de thromolyse de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* (10 et 15 mg/ml). Chaque valeur représente la moyenne ($n = 60$) \pm SD pour 20 volontaires.

La capacité thrombolytique de l'extrait augmente en fonction du temps, mais d'une manière non linéaire. On constate que le pouvoir de lyse des caillots de l'extrait est d'autant plus significatif après 72 heures pour les deux concentrations utilisées. Il existe donc une corrélation entre le temps d'incubation et le pourcentage de thromolyse. Cette corrélation a été rapportée par Elumalai et al. (2012) pour les extraits des feuilles de *Bougainvillea glabra* et par Ziaul Haque et Moyen Uddin (2015) sur l'extrait de *Manihot esculenta*.

VIII. Activité antibactérienne

Face à une augmentation alarmante de la résistance bactérienne aux antibiotiques, beaucoup de travaux ont été menés afin de rechercher de nouveaux agents antibactériens. Les biomolécules des plantes constituent une solution à ce phénomène de résistance. Dans la perspective de l'exploration d'un éventuel potentiel antibactérien de l'extrait, nous l'avons testé contre 6 bactéries dont 4 souches bactériennes Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 533, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) et 2 Gram négatif (*Enterococcus faecalis* ATCC 2035 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352). Le choix de ces souches a été dicté à la fois par leur pouvoir pathogène et à leur disponibilité au laboratoire. Sachant que très peu de recherches se sont intéressées à l'étude de l'activité antibactérienne de *L. guyonianum*.

La méthode de diffusion en milieu gélosé a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait. C'est une méthode sensible et facile à mettre en œuvre et fréquemment utilisée mais présente la contrainte d'être limitante du fait que l'agarose peut entraver la diffusion de certaines molécules potentiellement actives ce qui ne permet pas de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de ces composés (Du Toit et Rautenbach, 2000). De ce fait, la mesure de l'activité antibactérienne doit être complétée et appuyée par la détermination de la CMI ce qui permet de comparer les activités antibactériennes.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait sur les 6 souches bactériennes de référence sont consignés sur le tableau 15. La sensibilité des bactéries envers l'extrait est classée selon les diamètres des halos d'inhibition. Ces résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches et de la concentration de l'extrait testé. On note que l'extrait n'exhibe aucun effet sur *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, ces souches se sont montrées résistantes. Par ailleurs, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont sensibles à 10mg/ml d'extrait, les zones d'inhibition enregistrées sont respectivement de 11.33 et 13.0 mm. L'extrait de plante a donné une activité antibactérienne remarquable sur *Staphylococcus epidermidis* (23.5 mm) et *Micrococcus luteus* (26.5 mm). Ces dernières se sont révélées extrêmement sensibles puisqu'elles sont sensibilisées même aux faibles concentrations d'extrait.

Tableau 15 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*. Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SD (p < 0.05, test de Tukey). Dans une colonne, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes.

Extrait (mg/ml)	Bactéries cibles					
	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>
10	23.5 ± 2 ^a	26.5 ± 3.5 ^{ab}	13 ± 1.32 ^a	11.33 ± 1.75	-	-
	+++	+++	+	+	0	0
5	18.23 ± 1.04 ^{bc}	19.5 ± 1.32 ^b	11.17 ± 0.76 ^a	-	-	-
	++	++	+	0	0	0
2.5	15.33 ± 0.76 ^c	13.5 ± 1 ^c	-	-	-	-
	++	+	0	0	0	0
1.25	10 ± 0.5 ^d	7.66 ± 0.76 ^d	-	-	-	-
	+	-	0	0	0	0

Les symboles (+) et (-) représentent le degré de sensibilité selon Ponce et al. (2003) : résistante (0) ; non sensible (-) ; sensible (+) ; très sensible (++) ; extrêmement sensible (+++).

La méthode de microdilution en milieu solide permet de déterminer les paramètres d'inhibition de la croissance (CMI) de l'extrait vis à vis des bactéries testées. La CMI est une valeur indicatrice du pouvoir bactériostatique d'un agent antibactérien.

Les CMI obtenues sont comprises entre 1.25 et 10.0 mg/ml (figure 54). Ainsi, nous pouvons constater que l'extrait a démontré des effets antibactériens notables contre *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus*, avec des CMI de 01.25 mg/ml. L'extrait a été aussi efficace contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 5.0 mg/ml. En revanche, la plus grande CMI a été obtenue avec *Klebsiella pneumonia* (10.0 mg/ml). Ces résultats montrent clairement la sensibilité des bactéries Gram⁺ par rapport au Gram⁻.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité de l'extrait et son pouvoir antiseptique qui peut éventuellement rivaliser celui des antibiotiques ce qui peut justifier l'utilisation de cet halophyte en médecine traditionnelle comme anti-dysentérique et dans le traitement des maladies infectieuses qui causent des diarrhées douloureuses et sanglantes (Chaieb et Boukhris, 1998).

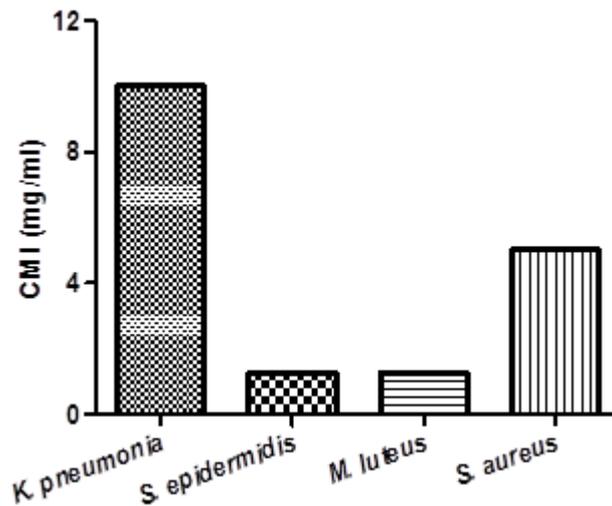


Figure 54 : CMI de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* vis à vis des bactéries testées.

De nombreuses études ont déjà signalé la sensibilité des bactéries Gram⁺ par rapport aux Gram⁻ (Koné et *al.*, 2004 ; Cos et *al.*, 2006 ; Hayouni et *al.*, 2007 ; Turkmen et *al.*, 2007 ; Shan et *al.*, 2007 ; Falleh et *al.*, 2008). En général, les bactéries Gram⁻ sont plus résistantes que les Gram⁺ grâce à la structure de leur membrane externe en plus du peptidoglycane. Le peptidoglycane, constituant majeur des parois des Gram⁺, est poreux et laisse passer de nombreuses substances ce qui n'est pas le cas de la membrane externe qui s'oppose à la pénétration de ces substances. Cette membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide et de phospholipides, où s'insèrent de nombreuses protéines et représente une vraie barrière imperméable à la plupart des molécules. Toutefois, les petits solutés hydrophiles dont leur poids moléculaire est inférieur à 600 Da peuvent traverser cette membrane par diffusion libre *via* des porines présentes dans cette couche qui constituent une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les β -lactamines et les fluoroquinolones (Pagès, 2004).

De nombreux travaux ont rapporté que plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins favorisent les mécanismes de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes. L'activité antibactérienne des plantes serait attribuée à ces métabolites secondaires (Falleh et *al.*, 2008).

Cowan (1999) rapporte que les principaux composés antimicrobiens des plantes sont des polyphénols qui sont actifs sur un grand nombre de microorganismes et possèdent plusieurs modes d'action. Ces mécanismes peuvent se résumer essentiellement dans la dégradation de la paroi cellulaire (Zhang et *al.*, 2009), la séquestration de substrats et la privation des ions

métalliques nécessaires à la croissance microbienne (Milane, 2004) et l'influence de la synthèse des protéines et des lipides (Balentine et al., 2006) et par conséquent l'inhibition du métabolisme microbien. Des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines) ou les enzymes comme les hydrolases sont aussi impliqués (Scalbert, 1991 ; Cowan, 1999).

En outre, la diversité structurale des polyphénols leur procure des activités antimicrobiennes importantes et diverses. Le nombre et la position des hydroxyles sur les groupes phénoliques influencent directement leurs propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins exercent un pouvoir antimicrobien à large spectre et relativement fort par rapport aux autres polyphénols (Daglia, 2011).

De nombreuses études ont souligné que l'acide gallique possède une activité antibactérienne contre diverses bactéries, telles que *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Ahn et al., 1998 ; Jayaraman et al., 2010). Les saponines et les quinones mis en évidence dans l'extrait, sont susceptibles aussi de justifier l'activité antibactérienne observée. En somme, l'activité de l'extrait est probablement due à une action synergique entre un certain nombre de ses constituants.

L'activité antibactérienne de *L. guyonianum* a été très peu investiguée. Récemment, Bouzidi et al. (2016) ont rapporté que les extraits méthanolique, chloroformique et d'éther de pétrole ont montré une bonne activité antibactérienne contre *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. faecalis* avec des CMI de 23.46 à 93.0 µg/ml. De même, les activités antibactériennes des extraits de *L. monopetalum* et *L. guyonianum* sont également corrélées à la sensibilité des différentes souches bactériennes testées.

Conclusion

CONCLUSION

Le choix de l'extrait aqueux des feuilles d'une plante halophyte du chott Hodna *Limoniastrum guyonianum* (plumbaginaceae) ressort de l'intérêt croissant des halophytes en tant que source potentielle de molécules bioactives, en plus des différentes utilisations que trouve cette plante en pharmacopée traditionnelle et plus particulièrement en tant qu'anti-inflammatoire et antibactérien. De plus, l'étude bibliographique n'a révélé que peu d'études qui se sont intéressées aux effets pharmacologiques et phytochimiques de cette plante et aucune étude toxicologique n'a été réalisée au paravent. Toutes ces données nous ont encouragé à mener ce travail.

L'étude phytochimique des feuilles de *L. guyonianum* a montré la présence de polyphénols, de flavonoïdes, des tanins, des saponines, des substances quinoniques libres ou combinées, des stérols et des polyterpènes. Par ailleurs, les coumarines, les alcaloïdes et les anthocyanes se sont révélés absents. L'estimation quantitative des polyphénols totaux contenus dans l'extrait aqueux a montré que celui-ci est relativement riche en polyphénols, avec un taux de 64.337 µg EAG/mg Ex. Les résultats de cette étude ont montré que les feuilles de cette plante halophyte renferment des quantités intéressantes en flavonoïdes (34.109 µg/mg EQ/mg Ex) et en tanins (63.25 µg EAT/mg Ex). La caractérisation chimique de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* réalisée par analyse détaillée de l'extrait par HPLC-TOF/MS nous a permis de démontrer sa richesse particulière en acide fumarique et en acides phénoliques (6 composés parmi les 11 identifiés) dont l'acide syringique et l'acide cinnamique sont les plus représentés. Le reste des composés appartient aux classes des flavones aglycones (eupatorine et diosmine), des flavanols (catéchine) et des flavanones glycosilés (naringine) à l'état de traces.

Afin de garantir l'innocuité de l'extrait aqueux, nous avons cherché à étudier à la fois sa toxicité aiguë par voie orale et sa cytotoxicité sur des globules rouges humains. La toxicité aiguë a été menée sur des souris femelles. Or, au cours de cette présente étude, il n'a pas été constaté de mortalité ni signes toxiques particuliers après l'administration orale de l'extrait aqueux de *L. guyonianum* à toutes les doses testées. La DL 50 peut être alors estimée supérieure à 5000 mg/kg. Cette valeur est relativement élevée ce qui présage une sécurité d'emploi de cet extrait qui est considéré comme substance pratiquement non toxique. Les paramètres biochimiques et histologiques ont été également discutés. Le test de cytotoxicité de l'extrait aqueux a été réalisé sur des globules rouges (GR) humain provenant de donneurs sains. Le

pourcentage d'hémolyse évalué par mesure de la quantité d'hémoglobine libérée et par un comptage des GR résiduels après traitement à l'extrait pour une large gamme de concentrations allant de 5 à 200 mg/ml. Une légère hémolyse de 13.52 % a été obtenue pour une concentration extrême de 200 mg/ml ce qui permet de dire que notre extrait n'exprime pas une activité cytotoxique vis à vis les GR testés.

L'étude des effets pharmacologiques de l'extrait représente en réalité les objectifs majeurs de ce travail de thèse. L'activité antioxydante de l'extrait aqueux des feuilles *L. guyonianum* a été mesurée *in vitro* par les tests DPPH ($IC_{50} \approx 488.038 \pm 5,97 \mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50} \approx 307.59 \pm 4.07 \mu\text{g/ml}$), β -carotène (AAR $\approx 98.483 \pm 1.17 \%$), FRAP ($EC_{50} \approx 249.55 \pm 1.33 \mu\text{g/ml}$) et chélation de fer ($EC_{50} \approx 89.71 \pm 8.59 \mu\text{g/ml}$). Les résultats de ces tests bien qu'ils ne soient pas tout à fait les mêmes mais reflètent tous le potentiel antioxydant réel de l'extrait aqueux. L'activité antioxydante de l'extrait a été également étudié *in vivo* en mesurant son effet hématoprotecteur contre le stress oxydatif induit par le nickel chez des souris blanches. Le prétraitement à l'extrait aqueux entraîne une amélioration nette des paramètres hématologiques étudiés par rapport aux souris non traitées et traitées à l'antioxydant de référence la vitamine C.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait utilisé a été étudiée par voie générale et par voie topique. L'extrait à faible dose (50 mg/kg pc) a montré un effet anti-œdémateux similaire à celui du diclofenac mais qui ne se manifeste qu'à partir de la 3^{ème} heure après administration de la carragénine. Cette capacité de l'extrait aqueux à inhiber l'évolution de l'œdème est donc évocatrice de la présence de substances à potentiel anti-inflammatoire élevé. De même, l'extrait s'est montré avoir un effet anti-inflammatoire dose dépendant sur l'œdème de l'oreille.

Le criblage de l'effet analgésique a été étudié selon ses deux composantes périphérique et centrale. Dans le test de torsion qui est fréquemment utilisé pour évaluer les composés à activité analgésique périphérique, l'extrait a présenté une action analgésique périphérique de type paracétamol 200 mg/kg pc par voie orale. De même, l'extrait dosé à 50, 100 et 200 mg/kg pc *per os* a significativement augmenté le seuil de perception de la douleur de façon dose dépendante comparativement au groupe témoin. À l'opposé, l'extrait a montré une action analgésique centrale légère en testant son effet sur la douleur induite par un stimulus thermique par le test de Tail Flick chez les souris et qui ne s'est manifesté de façon apparente qu'à une dose de 100 mg/kg pc.

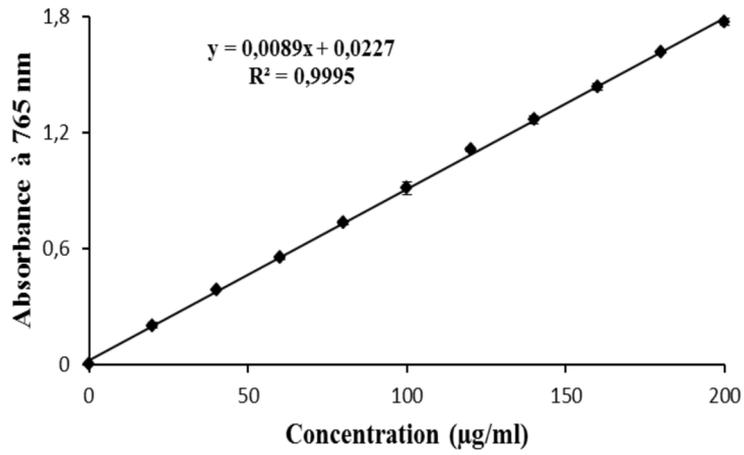
Dans l'étude de son activité antipyrétique, l'extrait a abaissé significativement l'hyperthermie de façon dose-dépendante mais seulement à la 1^{ère} heure après le traitement, en plus il s'est montré moins efficace que le paracétamol aussi bien sur le plan dose-effet que sur le plan temps d'action.

Il est aussi important de noter que l'extrait possède des propriétés thrombolytiques, démontrées par la destruction des caillots. Cette capacité est d'autant potentialisée par l'augmentation de la concentration de l'extrait et du le temps d'action.

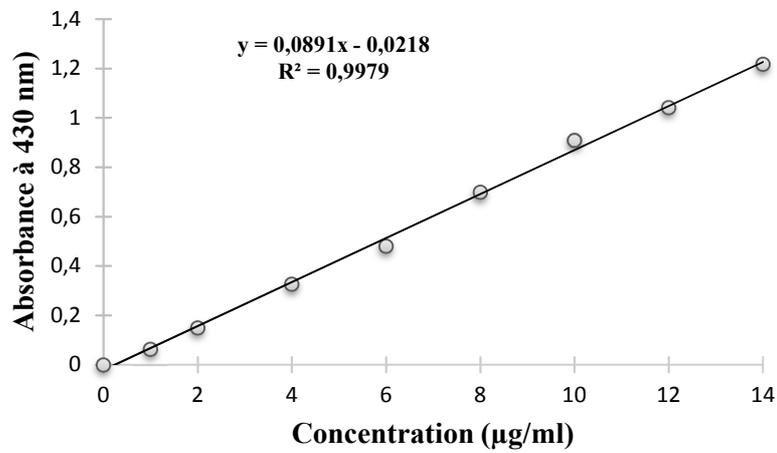
L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait a démontré des effets antibactériens notables contre *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* (CMI de 01.25 mg/ml). L'extrait a été aussi efficace contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 5.0 mg/ml. Par ailleurs, *Klebsiella pneumonia* s'est montré moins sensible (CMI = 10.0 mg/ml). Ces résultats montrent la sensibilité des bactéries Gram⁺ par rapport aux Gram⁻ et ils peuvent expliquer au moins partiellement l'utilisation de cet halophyte en médecine traditionnelle comme anti-dysentérique et dans le traitement de certaines maladies infectieuses.

Par ce travail, nous espérons avoir contribué à l'étude de la phytochimie, de la toxicité et des effets pharmacologiques de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* pour une éventuelle valorisation. Toutefois, les résultats de cette étude ne constituent qu'une ébauche mais suffisante pour être une base scientifique dans le domaine de recherche des molécules bioactives à partir de cette plante halophyte. Il serait judicieux et intéressant d'étayer ce travail par d'autres études chimiques et pharmacologiques afin d'isoler, de caractériser et de purifier les principes actifs responsables surtout des activités antioxydantes, anti-inflammatoire, analgésique, bactérienne potentielles de l'extrait. Aussi, il serait très souhaitable de tester d'autres activités telles que les activités antimutagène et anticancéreuse et d'étendre l'étude à d'autres parties de la plante.

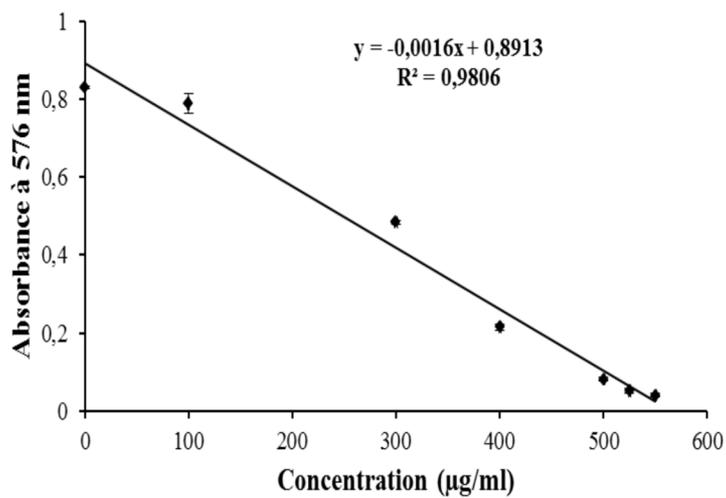
Annexes



Annexe 01 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 02 : Droite d'étalonnage de la quercétine



Annexe 03 : Droite d'étalonnage de l'acide tannique

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abay, G., Altun, M., Koldas, S., Riza Tufekci, A. and Demirtas, I. (2015). Determination of antiproliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Combinatorial chemistry and high throughput screening*, 18(5), 453-463.
2. Abena, A. A., KIBOR, D. and Bioka, D. (1995). Propriétés antalgiques et antipyrétiques de l'huile essentielle d'ageratum conyzoides. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, VIII éd, 67-72.
3. Adeyemi, O. S. and Elebiyo, T. C. (2014). *Moringa oleifera* supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in wistar rats. *Journal of nutrition and metabolism*, 2014,1-8.
4. Adouane, S. (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).
5. AFSSAPS (2006). Essais cliniques de première administration à l'homme en dose unique d'un médicament expérimental. Choix de la première dose, de la progression de dose et protocole d'administrations aux volontaires. *Agence Française Sécurité Sanitaire*, 1-5.
6. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
7. Aggarwal, B. B. and Sung, B. (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in pharmacological sciences*, 30(2), 85-94.
8. Ahn, E. Y., Shin, D. H., Baek, N. I. and Oh, J. A. (1998). Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(3), 680-687.
9. Alaoui, K., Lagorce, J. F., Cherrah, Y., Hassar, M., Amarouch, H. and Roquebert, J. (1998). Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 56, No. 5, pp. 220-228). Masson.
10. Alston, R.E. and Turner, B.L. (1963). *Biochemical systematics*, Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, N.J. 404p.
11. Amacher, D. E. (2002). A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Human and experimental toxicology*, 21(5), 253-262.
12. Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N. and Fougrach, H. (2013). Évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie Biologie*, 61(6), 254-258.
13. Amresh, G., Reddy, G. D., Rao, C. V. and Singh, P. N. (2007). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 526-531.
14. Antonelli-Ushirobira, T. M., Blainski, A., Fernandes, H. G., Moura-Costa, G. F., Costa, M. A., Campos-Shimada, L. B., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Kaneshima E.N., Becker, T.C., Leite-Mello, E.V. and de Mello, J. C. (2015). Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*, 174, 293-298.
15. AOAC (1990a). "Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," No. 934.06, Arlington.
16. AOAC (1990b). "Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," No. 923.03, Arlington.
17. Arslan, R., Bektas, N. and Ozturk, Y. (2010). Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 131(1), 28-32.
18. Ashley, N. T., Weil, Z. M. and Nelson, R. J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 385-406.
19. Awika, J. M., Rooney, L. W. and Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1-2), 293-301.
20. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.

21. Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'bryan, C. A., Duong, D. Q. and Pohlman, F. W. (2006). The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73(3), 413-421.
22. Ballou, L. R., Botting, R. M., Goorha, S., Zhang, J. and Vane, J. R. (2000). Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10272-10276.
23. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.
24. Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C. and Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta histochemica*, 102(1), 21-35.
25. Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40(4), 405-412.
26. Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G. and Von Eiff, C. (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 4988-4995.
27. Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T. and Ehile, E. E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences and Nature*, 4(2), 217-225.
28. Berhens, B. and Karber, G. (1935). Wie sind reihenversuche für biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol*, 177, 379-388.
29. Belfar, A., Hadjad, j M., Dakmouche, M., Bensaci, C., Belguidoum, M., Ghiaba, Z. and Cherbi, Y. (2015). Antibacterial Activity of *Limoniastrum guyonianum* Medicinal Plant Used in Algerian Traditional Medicine. *Der Pharma Chemica*, 8(21), 31-34.
30. Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N. ; Oiki, S. ; Yamada, K. ; Cellier, F. ; Gosti, F. ; Simonneau, T. ; Essah, P A. ; Tester, M. ; Very, A A. ; Sentenac, H. and Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal*, 22(9), 2004-2014.
31. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199.
32. Bodamyali, T., Stevens, C. R., Blake, D. R. and Winyard, P. G. (2000). Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: a physiological process. In: Winyard P.G., Blake D.R., Evans C.H. (eds) *Free Radicals and Inflammation*. Progress in Inflammation Research. Birkhäuser, Basel 11-16.
33. Boulila, S., El Feki, A., Oudadesse, H., Kallel, C. and El Feki, H. (2014). Detoxification of rats subjected to nickel chloride by a biomaterial-based carbonated orthophosphate. In *Annales pharmaceutiques francaises* (Vol. 72, No. 5, pp. 348-362). Elsevier Masson.
34. Bouzidi, A., Benzarti A., El Arem A., Mahfoudhi A., Hammami S., Gorcii M., Mastouri M., Hellal A. and Mighri Z. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects of Tunisian *Limoniastrum guyonianum* Durieu ex Boiss extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(4) :1299-1305.
35. Brill, R. H. (1999). Chemical Analyses of Early Glasses, v. 1. *Catalogue of Samples*, 1 and, 2, 118-123.
36. Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C. and Rice-Evans, C. (1998) Structural dependence of flavonoides interactions with Cu²⁺ ions: implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*. 330: 1173-1178.
37. Brucka-Jastrzebska, E., Bska, M. and Protasowicki, M. (2005). Effects of cadmiun and nickel exposure on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 1(35).
38. Brunet, S., and Hoste, H. (2006). The effects of condensed tannins on the exsheathment of nematode larvae depend on the biochemical structure of flavan-3-ols and on the parasite species. *J. Agric. Food Chem*, 54, 7481-7487.
39. Bruneton, J. (2005). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3e éd.)*. Lavoisier.
40. Buhmann, A., and Papenbrock, J. (2013). An economic point of view of secondary compounds in halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 952-967.
41. Cabrera, G. (2000). Effect of five dietary antimutagens on the genotoxicity of six mutagens in the microscreen prophage-induction assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(3), 206-220.

42. Capecka, E., Mareczek, A. and Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry*, 93(2), 223-226.
43. CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation*. Ottawa, 1, 232-256.
44. Center, S. A., Elston, T. H., Rowland, P. H., Rosen, D. K., Reitz, B. L., Brunt, J. E., Rodan, I., House, J., Bank, S., Lynch, L.R., Dring, L.A. and Levy, J.K. (1996). Fulminant hepatic failure associated with oral administration of diazepam in 11 cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(3), 618-625.
45. Cechinel-Filho, V., Santos, A. R., Campos, R. O., Miguel, O. G., Yunes, R. A., Ferrari, F., Messana, I. and Calixto, J. B. (1996). Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(12), 1231-1236.
46. Chaabi, M., Beghidja, N., Benayache, S. and Lobstein, A. (2008). Activity-guided isolation of antioxidant principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(11-12), 801-807.
47. Chaieb, M. and Boukhris, M. (1998). *Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie*. l'Or du Temps.
48. Chang, J. Y. and Lewis, A. J. (Eds.). (1989). *Pharmacological methods in the control of inflammation* (Vol. 1). Wiley-Liss.
49. Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F., Ksouri, R., Azzi, R., Boucherit, Z., Tefiani Ch. and Larbat, R. (2015). Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MS n characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus*. *Industrial Crops and Products*, 64, 182-187.
50. Chaumont, J. P. and Millet-Clerc, J. (2011). *Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie*. Lavoisier.
51. Chehma, A. (2005). *Étude floristique et nutritive des parcours camelins du Sahara septentrional algérien. Cas de la région de Ouargla et Ghardaïa* (Doctoral dissertation, Thèse Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba).
52. Chehma, A., Djebbar, M. R., Hadjaiji, F. and Rouabeh, L. (2005). Étude floristique spatio-temporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 16(4), 275-285.
53. Chehma, A. and Djebbar, M. R. (2008). Les espèces médicinales spontanées du sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie*, 17, 36-45.
54. Chen, C. Y., Huang, Y. L. and Lin, T. H. (1998). Effects of vitamin A pretreatment on nickel-induced lipid peroxidation and concentration of essential metals in liver, kidney and lung of mice. *Archives of toxicology*, 72(6), 381-386.
55. Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2), 437-448.
56. Choukr-Allah, R. (1991). The use of halophytes for the agricultural development of south of Morocco. In *Proc Int Conf Agric Manag salt affected areas, Agadir*. (Vol. 25, pp. 377-386).
57. Chowdhury, N. S., Alam, M. B., Haque, A. S. M. T., Zahan, R., Mazumder, M. E. H. and Haque, M. E. (2011). *In vitro* free radical scavenging and thrombolytic activities of Bangladeshi aquatic plant *Aponogeton undulatus* Roxb. *Global J Pharmacol*, 5(1), 27-32.
58. Chung, W. J. (2014). Management of portal hypertensive gastropathy and other bleeding. *Clinical and molecular hepatology*, 20(1), 1.
59. Cléon, P. and D'Angeli, D. (2005). Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. *Spectra analyse*, 34(242), 13-25.
60. Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A. and Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology*, 32(2), 295-310.
61. Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. and Della Loggia, R. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.
62. Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V. and Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
63. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
64. Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, Edition 2.

65. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
66. Das, K. K., Gupta, A. D., Dhundasi, S. A., Patil, A. M., Das, S. N. and Ambekar, J. G. (2007). Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate. *Biometals*, 20(2), 177-184.
67. Da Silva, E.J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994). Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Durtin and Claussequinone, in Rats and Mice. *Journal of pharmacy and Pharmacology*, 46(2), 118-122.
68. De Billerbeck V. G., Roques C., Vanière P. and Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 10(3), 248-251.
69. Debouba, M., Zouari, S. and Zouari, N. (2013). Evaluation of antioxidant status of two *Limoniastrum* species growing wild in Tunisian salty lands. *Antioxidants*, 2(3), 122-131.
70. Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P. and Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4303-4310.
71. de Queiroz, A. C., de Lira, D. P., Dias, T. D. L. M. F., de Souza, É. T., da Matta, C. B. B., de Aquino, A. B. and Barbosa Filho, J. M. (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 128(2), 377-383.
72. Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallée, F. and Flahaut, M. (1980). Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European journal of pharmacology*, 61(1), 17-24.
73. Devulder B, Hatron PY and Hachulla E. (2002). Physiologie de l'Inflammation. Edition Cedex : Paris ; 15.
74. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
75. Dou, W., Jiao, Y., Goorha, S., Raghov, R. and Ballou, L. R. (2004). Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). *Prostaglandins and other lipid mediators*, 74(1), 29-43.
76. Dragsted, A. and Lang, B. (1957). Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Ann Pharm Fr*, 11.
77. Dray, A., Urban, L. and Dickenson, A. (1994). Pharmacology of chronic pain. *Trends in pharmacological sciences*, 15(6), 190-197.
78. Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.
79. Du Toit, E. A. and Rautenbach, M. (2000). A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of microbiological methods*, 42(2), 159-165.
80. El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., and Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(1), 37-48.
81. El-Haci, I. A., Didi, A., Atik Bekkara, F. and Gherib, M. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic contents in methanol crude extracts from the Algerian medicinal plant *Limoniastrum feei*. *Sci Study Res*, 10, 329-336.
82. El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M. and Didi, M. A. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of a medicinal plant endemic to the Algerian Sahara. *Phytotherapie-Heidelberg*, 10(5), 280.
83. El Rhaffari, L. and Zaid, A. (2002). Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet) : Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée.
84. El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M. and Didi, M. A. (2012). Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 1-6.
85. Elumalai, A., Eswariah, M. C., Chowdary, C. H., Kumar, R., Anusha, M. and Naresh, K. (2012). Screening of Thrombolytic Activity of *Bougainvillea glabra* Leaves Extract by In-Vitro. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2(4), 134-136.

86. Emamuzo, E. D., Miniakiri, S. I., Tedwin, E. J. O., Ufouma, O. and Lucky, M. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of the leaves of *Helianthus Annus* in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(5), 341-347.
87. 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.
88. Falleh, H., Ksouri, R. and Abdelly, C. (2006). Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage *Cynaracar dunculus*. *Revue des Régions Arides*, 341-344.
89. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
90. Falleh H., Ksouri R., Oueslati S., Sylvain G., Christian M. and Abdelly C. (2009). Interspecific variability of antioxidant activities phenolic composition in *Mesembryanthemum* and genus. *Food and chemical toxicology*, 47(9), 2308-2313.
91. Falleh, H., Oueslati, S., Guyot, S., Dali, A. B., Magné, C., Abdelly, C. and Ksouri, R. (2011). LC/ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Food Chemistry*, 127(4), 1732-1738.
92. Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M. E., Abdelly, C. and Magné, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249.
93. Farahpour, M.R. and Khoshgozaran, L. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of hydroethanolic extract of *Urtica dioica*. *Int J Biol Pharm Allied Sci*, 1:160-70.
94. Fauve, R., and Hevin, M. B. (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. *L'inflammation (JL Eurotext, éd.)*, 10-20.
95. Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
96. Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florencio, M. H. and Jennings, K. R. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(2), 105-111.
97. Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., and Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
98. Fintelmann, V. and Weiss, R. F. (2004). Practical Handbook of Phytoterapie.
99. Flipo, R.M., Hatron, P.Y. and Devulder, B. Maladies inflammatoires. Paris : Masson, 1993.
100. Foyer, C. H. and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
101. Flowers, T. J. and Colmer, T. D. (2015). Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of botany*, 115(3), 327-331.
102. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. and Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
103. Frankel, E. N. and Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
104. Fuchs, T. C. and Hewitt, P. (2011). Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *The AAPS journal*, 13(4), 615-631.
105. Fukumoto, L. R. and Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
106. Galati, E.M., Monforte, M.T., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M, Trovato, A. and Tripodo, M.M.(1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (Note I): anti-inflammatory and analgésie activity. *Farmaco*. 40 (11): 709-712.
107. Gallez, B., Demeure, R., Baudelet, C., Geurts, M., Geubel, A. and Roels, H. (1999). Evaluation par RMN de l'intoxication cérébrale par le Manganèse. *Louvain Med*, 118, 165-168.

108. Garg, R., Ramchandani, A. G. and Maru, G. B. (2008). Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. *Carcinogenesis*, 29(6), 1249-1257.
109. Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
110. Georgé, S., Brat, P., Alter, P. and Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.
111. Gilroy, D. and De Maeyer, R. (2015). New insights into the resolution of inflammation. In *Seminars in immunology* (Vol. 27, No. 3, pp. 161-168). Academic Press.
112. Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(4), 1220-1234.
113. Goodman, L. S. (1996). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (Vol. 1549). New York : McGraw-Hill.
114. Guillard, J. C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K: synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(2), 59-67.
115. Guirimand, F. (2003). Physiologie de la douleur : données récentes. *Néphrologie*, 24(7), 401-410.
116. Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F. and Chasteen, N. D. (2007). Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions*, (43), 4951-4961.
117. Haddi, M. L., Filacorda, S., Meniai, K., Rollin, F. and Susmel, P. (2003). In vitro fermentation kinetics of some halophyte shrubs sampled at three stages of maturity. *Animal feed science and technology*, 104(1), 215-225.
118. Hadjadj, S., Bayoussef, Z., El Hadj-Khelil, A. O., Beggat, H., Bouhaf, Z., Boukaka, Y., Khaldi, I.A., Mimouni, S., Sayah, F. and Tey, M. (2015). Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in the Northeastern Sahara of Algeria (area of Ouargla). *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(41), 1049-1059.
119. Hagerman, A. E. and Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15(6), 1795-1810.
120. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C. and Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
121. Halliwell, B. and Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 10), 5.
122. Halliwell, B. (1999). Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 31(4), 261-272.
123. Hamidi, A. (2013). *Etude phytochimique et activité biologique de la plante Limoniastrum guyonianum*. (Mémoire de Magister, Kasdi Merbah Ouargla).
124. Hammami, S., Nguir, A., Saidana, D. and Mighri, Z. (2011). Chemical analysis and antimicrobial effects of essential oil from *Limoniastrum guyonianum* growing in Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2540-2545.
125. Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
126. Headland, S. E. and Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. In *Seminars in immunology* (Vol. 27, No. 3, pp. 149-160). Academic Press.
127. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
128. Henrotin, Y., Deby-Dupont, G. and Reginster, J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue Médicale de Liège*, 56(6), 433-42.

129. Hermes-Lima M (2005). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Eds, Wiley-Liss (Hoboken), 319-368.
130. Hfaiedh, N., Allagui, M. S., Hfaiedh, M., El Feki, A., Zourgui, L. and Croute, F. (2008). Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3759-3763.
131. Hodge, H. C. and Sterner, J. H. (1949). Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 10(4), 93-96.
132. Hossain, M. M. and Shahrin, S. (2014). In vitro studies on antibacterial, thrombolytic and antioxidant activities of green tea or *Camellia sinensis*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(10), 1200-1211.
133. Hossain, M. S., Chowdhury, M. E. H., Das, S. and Chowdhury, I. U. (2012). In-Vitro Thrombolytic and Anti-inflammatory Activity of Swertia Chirata Ethanolic Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(4).
134. Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
135. Idrissi Hassani, M. (1985). Etude de la variabilité flavonique chez deux conifères méditerranéens : Le pin maritime *Pinus Pinaster* Ait. et le Génévrier thurifère *Juniperus thurifera* L (Doctoral dissertation, Lyon 1).
136. Inaba, K., Murata, K., Naruto, S. and Matsuda, H. (2010). Inhibitory effects of devil's claw (secondary root of *Harpagophytum procumbens*) extract and harpagoside on cytokine production in mouse macrophages. *Journal of natural medicines*, 64(2), 219-222.
137. IASP, I. (1979). subcommittee on taxonomy. Pain terms. A list with definitions and notes on usage. *Pain*, 6(3), 249-52.
138. Janda, J. M. and Abbott, S. L. (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria*, 2nd ed Washington, USA: ASM Press.115-129.
139. Jayaraman, P., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Tang, T. H. and Sakharkar, K. R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International journal of biological sciences*, 6(6), 556.
140. Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine vétérinaire*, 149(10), 911-920.
141. Jia, Y., Zhao, G. and Jia, J. (2008). Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 181-189.
142. Jones, W. P. and Kinghorn, A. D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. *Natural products isolation*, 323-351.
143. Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846-4851.
144. Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review*, 14(2), 41-53.
145. Kadenbach, B., Ramzan, R. and Vogt, S. (2009). Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. *Trends in molecular medicine*, 15(4), 139-147.
146. Karamac, M., Kosińska, A. and Pegg, R. B. (2005). Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 165-170.
147. Karumi, Y., Onyeyili, P. A. and Ogugbuaja, V. O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.
148. Katselis, G. S., Estrada, A., Gorecki, D. K., and Barl, B. (2007). Adjuvant activities of saponins from the root of *Polygala senega* L. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(11), 1184-1194.
149. Kavitha, K., George, S., Venkataraman, G., and Parida, A. (2010). A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte *Avicennia marina* confers salt stress tolerance on transgenic plants. *Biochimie*, 92(10), 1321-1329.
150. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M. and Oikawa, S. (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 822-832.

151. Kawsar, M. H., Sikder, M. A. A., Rana, M. S., Nimmi, I. and Rashid, M. A. (2011). Studies of thrombolytic, antioxidant and cytotoxic properties of two *asteraceous* plants of Bangladesh. *Bangladesh Pharm J*, 2, 103-06.
152. Keffous, F., Belboukhari, N., Sekkoum, K., Djeradi, H., Cheriti, A. and Aboul-Enein, H. Y. (2016). Determination of the antioxidant activity of *Limoniastrum feei* aqueous extract by chemical and electrochemical methods. *Cogent Chemistry*, 2(1), 1186141.
153. Kew, M. C. (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*, 355(9204), 591-592.
154. Khan, M. S. S., Syeed, S. H., Uddin, M. H., Akter, L., Ullah, M. A., Jahan, S. and Rashid, M. H. (2013). Screening and evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, thrombolytic and membrane stabilizing properties of the methanolic extract and solvent-solvent partitioning effect of *Vitex negundo* Bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(5), 393-400.
155. Khedher, O., Moussaoui, Y. and Salem, R. B. (2014). Solvent effects on phenolic contents and anti-oxidant activities of the *Echinops spinosus* and the *Limoniastrum monopetalum*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 66-76.
156. Khiari, R., Mhenni, M. F., Belgacem, M. N. and Mauret, E. (2010). Chemical composition and pulping of date palm rachis and *Posidonia oceanica*—A comparison with other wood and non-wood fibre sources. *Bioresource Technology*, 101(2), 775-780.
157. Kim, H. P., Mani, I., Iversen, L. and Ziboh, V. A. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 58(1), 17-24.
158. Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. and Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229-245.
159. Kim, K. H., Lee, E. N., Park, J. K., Lee, J. R., Kim, J. H., Choi, H. J., Kim, B.S., Lee, H.W., Lee, K.S. and Yoon, S. (2012). Curcumin attenuates TNF- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and proinflammatory cytokines in human endometriotic stromal cells. *Phytotherapy Research*, 26(7), 1037-1047.
160. King, M. B. and Bott, T. R. (Eds.). (2012). *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Springer Science and Business Media.
161. Kissin, I., Bright, C. A. and Bradley Jr, E. L. (2000). Acute tolerance to continuously infused alfentanil: the role of cholecystokinin and N-methyl-D-aspartate-nitric oxide systems. *Anesthesia and Analgesia*, 91(1), 110-116.
162. Kilmartin, P. A., Zou, H. and Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1957-1965.
163. Kone, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traore, D. and Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 43-49.
164. Korul'Kina, L. M., Shul'ts, E. E., Zhusupova, G. E., Abilov, Z. A., Erzhanov, K. B. and Chaudri, M. I. (2004). Biologically active compounds from *Limonium Gmelinii* and *L. Popovii* I. *Chemistry of natural compounds*, 40(5), 465-471.
165. Koster, R. (1959). Acetic acid for analgesic screening. In *Fed proc* 18, 412.
166. Krifa, M., Bouhleb, I., Ghedira-Chekir, L. and Ghedira, K. (2013a). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Journal of ethnopharmacology*, 146(1), 243-249.
167. Krifa, M., Bouhleb, I., Skandrani, I., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. (2013b). Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Drug and chemical toxicology*, 37(1), 76-82.
168. Krifa, M., Alhosin, M., Muller, C.D., Gies, J.P., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Mély, Y., Bronner, C. and Mousli M. (2013c). *Limoniastrum guyonianum* aqueous gall extract induces apoptosis in human cervical cancer cells involving p16 INK4A re-expression related to UHRF1 and DNMT1 down-regulation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 32(1), 30.

169. Krifa, M., Pizzi, A., Mousli, M., Chekir-Ghedira, L., Leloup, L. and Ghedira, K. (2014a). *Limoniastrum guyonianum* aqueous gall extract induces apoptosis in colorectal cancer cells by inhibiting calpain activity. *Tumor Biology*, 35(8), 7877-7885.
170. Krifa, M., Skandrani, I., Pizzi, A., Nasr, N., Ghedira, Z., Mustapha, N., Ghedira, Z. and Chekir-Ghedira, L. (2014b). An aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall induces anti-tumor effects in melanoma-injected mice via modulation of the immune response. *Food and chemical toxicology*, 69, 76-85.
171. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3), 244-249.
172. Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C. and Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*, 47(8), 2083-2091.
173. Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., and Abdelly, C. (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 289-326.
174. Ku, C. S., Jang, J. P. and Mun, S. P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science*, 53(6), 524-528.
175. Kubitzki, K. (1993). Plumbaginaceae. In *Flowering Plants· Dicotyledons* (pp. 523-530). Springer Berlin Heidelberg.
176. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. and Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition E-Book*. Elsevier Health Sciences.
177. Lahtinen, M.L. (2003). *Variation in secondary chemistry within a natural population of birch: effects of génotype, environment and ontogeny*. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, No:20. ISSN 1457-2486, 98 pp.
178. Lakhani, S.R., Dilly, S. A. and Finlayson, C.J. (2009). *Basic pathology: an introduction to the mechanisms of disease*. London: Hodder Arnold.
179. Laguerre, M., Lecomte, J. and Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
180. Laitinen, M. L., Julkunen-Tiitto, R. and Rousi, M. (2000). Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 26(7), 1609-1622.
181. Lantto, T. A., Dorman, H. D., Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Tikhonov, V. P., Hiltunen, R. and Raasmaja, A. (2009). Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, 112(4), 936-943.
182. Laudadio, V., Tufarelli, V., Dario, M., Hammadi, M., Seddik, M. M., Lacalandra, G. M. and Dario, C. (2009). A survey of chemical and nutritional characteristics of halophytes plants used by camels in Southern Tunisia. *Tropical animal health and production*, 41(2), 209-215.
183. Le Bars, D., Gozariu, M. and Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, 53(4), 597-652.
184. Lebreton, P. and Méneret, G. (1964). Eléments de chimiotaxonomie botanique. I. Généralités ; notion d'espèce biochimique ; cas des flavonoïdes chez *Humulus lupulus* L. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 111(1-2), 69-80.
185. Lee, J.I., Kong, C. S., Jung, M. E., Hong, J. W., Lim, S. Y. and Seo, Y. (2011). Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(5), 992.
186. Levizou, E., Drilias, P. and Kyparissis, A. (2004). Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of Mediterranean summer. *Photosynthetica*, 42(2), 229-235.
187. 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.

188. Li, J. H., Nesumi, A., Shimizu, K., Sakata, Y., Liang, M. Z., He, Q. Y., Zhou, H.J. and Hashimoto, F. (2010). Chemosystematics of tea trees based on tea leaf polyphenols as phenetic markers. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1342-1349.
189. Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K. and Kim, I. H. (1993). Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 192(1), 273-280.
190. Limasset, B., Le Doucen, C., Dore, J. C., Ojasoo, T., Damon, M. and De Paulet, A. C. (1993). Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils: Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). *Biochemical pharmacology*, 46(7), 1257-1271.
191. Luo, W., Zhao, M., Yang, B., Ren, J., Shen, G. and Rao, G. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, 126(1), 277-282.
192. Malairajan, P., Gopalakrishnan, G., Narasimhan, S. and Veni, K. J. K. (2006). Analgesic activity of some Indian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 425-428.
193. Malaviya, R., Ansell, J., Hall, L., Fahmy, M., Argentieri, R. L., Olini, G. C., Pereir D. W., Sur, R. and Cavender, D. (2006). Targeting cytosolic phospholipase A2 by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice. *European journal of pharmacology*, 539(3), 195-204.
194. Manga, H. M., Brkic, D., Marie, D. E. P. and Quetin-Leclercq, J. (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. and Thomn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 92(2-3), 209-214.
195. Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. and Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *médecine/sciences*, 20(4), 458-463.
196. Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S. and Lanzo, C. A. (1999). Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2 Mechanisms of catalysis and inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22903-22906.
197. Martin, K., Ohayon, D. and Witko-Sarsat, V. (2015). Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation. *Swiss medical weekly*, 145, w14056.
198. Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Fenina, N., Bouraoui, A. and Aouni, M. (2010). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 15-19.
199. Mazières B. (2000). Guide pratique de rhumatologie. Paris : MMI,
200. McCann, J. and Ames, B. N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(3), 950-954.
201. Mebirouk-Boudechiche, L., Cherif, M., Abidi, S. and Bouzouraa, I. (2015). Composition chimique et facteurs antinutritionnels de quelques feuilles de ligneux fourragers des zones humides du nord-est de l'Algérie.
202. Médaille, C., and Briend-Marchal, A. (2008). *Guide pratique des analyses biologiques vétérinaires*. Éditions Med'Com.
203. Medini, F., Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N. and Abdelly, C. (2011). Effects of physiological stage and solvent on polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Limonium densiflorum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6719-6730.
204. Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. and Abdelly, C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 216-224.
205. Medini, F., Bourgou, S., Lalancette, K., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., Abdelly, C., Legault, J. and Ksouri, R. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, 99, 158-164.
206. Medini, F., Megdiche, W., Mshvildadze, V., Pichette, A., Legault, J., St-Gelais, A. and Ksouri, R. (2016). Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 726-732.

207. Medimagh, S., Hammami, S., Faidi, K., Hajji, N., Abreu, P. J. M., and Mighri, Z. (2010). Galocatechin and trans syringin from *Limoniastrum guyonianum* bois growing in Tunisia. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12, 207-210.
208. Melzig, M. F., Bader, G., and Loose, R. (2001). Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica*, 67(01), 43-48.
209. Merchant, M. and Modi, D. (2004). Acute and chronic effects of aspirin on hematological parameters and hepatic ferritin expression in mice. *Indian journal of pharmacology*, 36(4), 226.
210. Middleton, E.J. (1996). Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int.J.Pharmacol*, 34(5), 344-348.
211. Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques (Doctoral dissertation, Strasbourg 1).
212. Milbury, P. E. and Richer, A. C. (2008). *Understanding the Antioxidant Controversy*; Ed: PRAEGER; 81-100.
213. Miller, L. C. and Tainter, M. (1944). Estimation of the ED50 and Its Error by Means of Logarithmic-Probit Graph Paper. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 261-264.
214. Mohammed, H. A., Alshalmi, S. K. and Abdellatif, A. G. (2013). Antioxidant and Quantitative Estimation of Phenolics and Flavonoids of Three Halophytic Plants Growing in Libya. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(3).
215. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
216. Murphy, F. A., Schinwald, A., Poland, C. A. and Donaldson, K. (2012). The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 9(1), 8.
217. Murray, A. P., Rodriguez, S., Frontera, M. A., Tomas, M. A., & Mulet, M. C. (2004). Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(7-8), 477-480.
218. Naczki, M. and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
219. Namgoong, S. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life sciences*, 54(5), 313-320.
220. NCCLS. (2000). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 5th ed. Vol. 17. Approved standards-M7-A4. NCCLS document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standard Wayen Pa.
221. Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*, 79(3), 629-661.
222. Nordberg, J. and Amer, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
223. Novelli, E. L., Rodrigues, N. L., Nagahashi, A. M., Sforcin, J. M. and Ribas, B. O. (1990). Nickel chloride effects on erythrocyte generation of superoxide radical. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 23(8), 643-645.
224. OCDE (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, 2000: 19.
225. OCDE (2001). *Guidance document on Acute Oral toxicity*. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment, 2001: 24.
226. Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis—the “accidental” pathogen*. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), 555.
227. Ouarghidi, A., Martin, G. J., Powell, B., Esser, G. and Abbad, A. (2013). Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 9(1), 59.

228. Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R. W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., Dijoux M.G. and Guissou, I. P. (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 1-7.
229. Ozenda, P. (2004). Flore du Sahara, CNRS, Paris.
230. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. and Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205.
231. Pagès, J.M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine/sciences*, 20(3), 346-351.
232. Panda, B. B., Gaur, K., Kori, M. L., Tyagi, L. K., Nema, R. K., Sharma, C. S. and Jain, A. K. (2009). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* in experimental animal models. *Global Journal of Pharmacology*, 3(1), 1-5.
233. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*, 133(9), 2812-2819.
234. Pelzer, L. E., Guardia, T., Juarez, A. O. and Guerreiro, E. (1998). Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*, 53(6), 421-424.
235. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. and Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
236. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
237. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. and Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
238. Prasad, S., Kashyap, R. S., Deopujari, J. Y., Purohit, H. J., Taori, G. M. and Dagainawala, H. F. (2006). Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thrombosis Journal*, 4(1), 14.
239. Prasad, S., Kashyap, R. S., Deopujari, J. Y., Purohit, H. J., Taori, G. M. and Dagainawala, H. F. (2007). Effect of *Fagonia Arabica* (Dhamasa) on in vitro thrombolysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7(1), 36.
240. Prin, L., Hachulla, E., Hennache, B., Bonnotte, B., Dubucquoi, S., Abbal, M., Faure G. and Bouletreau, P.. (2009). Available from: http://w3med.univlille2.fr/inflammation/documents/Immuno_1.pdf
241. 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(10), 4290-4302.
242. Que, F., Mao, L. and Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, 39(5), 581-587.
243. Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et II. Edition CNRS, Paris.
244. Rajeshwar Y. and Lalitha R. (2013). Preliminary phytochemical screening and in vitro anthelmintic effects of *acmella paniculata* plant extracts. *Biolife*, 1(3), 106-112.
245. Rankin, J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, 15(1), 3-17.
246. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
247. Reiter, R. J., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J., and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129-1146.
248. Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., and Tantaoui-Elaraki, A. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 179-184.
249. Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., and Lyoussi, B. (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 378-386.
250. Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les Composés phénoliques des végétaux. *Dunod*, Paris.
251. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

252. Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
253. Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Quatar. 1. A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*, 53, 35-44.
254. Rodrigues, M. J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Varela, J. o., Barreira, L. S. and Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products*, 77, 315-322.
255. Roschek, B., Fink, R. C., McMichael, M. and Alberte, R. S. (2009). Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. *Phytotherapy research*, 23(7), 920-926.
256. Rubin, S.I. and Papich, M.G. (1989). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: KirkRW, ed. *Current Veterinary Therapy*. Philadelphia : WB Saunders ; 47-53.
257. Russo-Marie, F. (1998). *L'inflammation*. John Libbey Eurotext.
258. Saada, M., Falleh, H., Jalleli, I., Snouss, M. and Ksouri, R. (2014). Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte *Retama raetam*. *South African Journal of Botany*, 94, 114-121.
259. Sacerdote, P., Bianchi, M., Manfredi, B. and Panerai, A. E. (1997). Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice. *Pain*, 72(3), 325-330.
260. Sachidanandam, K., Fagan, S. C. and Ergul, A. (2005). Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues. *Cardiovascular Therapeutics*, 23(2), 115-132.
261. Sahreen, S., Khan, M. R. and Khan, R. A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food chemistry*, 122(4), 1205-1211.
262. Sanchez-Moreno, C., Larrauri Jose, A. and Saura-Calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
263. Sánchez-Rodríguez, E., Moreno, D. A., Ferreres, F., del Mar Rubio-Wilhelmi, M. and Ruiz, J. M. (2011). Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, 72(8), 723-729.
264. Sarker, R., Sharmin, T., Chowdhury, S. R. and Islam, F. (2012). Thrombolytic Activity and Preliminary Cytotoxicity of Five Different Fractions of Methanol Extract of *Allamanda cathartica* Leaf.
265. Sayyah, M., Hadidi, N., and Kamalinejad, M. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2), 325-329.
266. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
267. Sebaldt, R. J., Yang, X. H., Adachi, J. D. and Bensen, W. (1993). Pulse glucocorticosteroid (gcs) therapy in ra patients inhibits whole-blood leukotriene b4 (ltb4) biosynthesis ex-vivo. in *arthritis and rheumatism* (Vol. 36, No. 9, pp. S269-S269). 227 EAST WASHINGTON SQ, PHILADELPHIA, PA 19106: LIPPINCOTT-RAVEN PUBL.
268. Seidel, V. (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S. D., Latif, Z. and Gray, A. I. *Natural products isolation*. Eds, Humana Press (Otawa), 27-46.
269. Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A. and Deby-Dupont, G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét*, 147, 79-93.
270. Sestili, P., Guidarelli, A., Dachà, M. and Cantoni, O. (1998). Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(2), 196-200.
271. Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. and Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1), 112-119.
272. Shikanga, E. A., Combrinck, S. and Regnier, T. (2010). South African Lippia herbal infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 76(3), 567-571.
273. Silbernagl, S., Lang, F., Duval, D. and Gay, R. (2000). *Atlas de poche de physiopathologie*. Flammarion médecine-sciences.

274. Singh, K. A., Nayak, M. K., Jagannadham, M. V. and Dash, D. (2011). Thrombolytic along with anti-platelet activity of crinum, a protein constituent of *Crinum asiaticum*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 47(2), 129-132.
275. Sirwal, I.A., Banday, K.A., Reshi, A.R., Bhat, M.A. and Wani, M.M. (2004). Estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR). *JK Science*, 6, 121–123.
276. Skandamis, P. N. and Nychas, G. J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022.
277. Sparg, S., Light, M. E., and Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2), 219-243.
278. Spear J.W. (1994). Mineral in forages. In: Forage quality, Evaluation and utilization. Faher J.R. (Eds.), *National Conference on Forage Quality*, Lincoln., 281-317.
279. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
280. Stanković, M. S., Petrović, M., Godjevac, D. and Stevanović, Z. D. (2015). Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *Journal of Arid Environments*, 120, 26-32.
281. Swierkosz, T.A., Jordan, L., Mc Bride, M., Mc Gough, K., Devlin, J. and Botting, R. M. (2002). Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Medical Science Monitor*, 8(12), 496-503.
282. Swain, T. (1963). Chemical plant taxonomy, Academic Press, New York. In Ribéreau-Gayon, P. et Peynaud, E.
283. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. and Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
284. Tabassi, S. A., Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Moghimipour, E. and Mohajeri, S. A. (2006). Isolation, characterization and study of enhancing effects on nasal absorption of insulin in rat of the total saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Current drug delivery*, 3(4), 399-404.
285. Tang, X. H., Gao, J., Chen, J., Xu, L. Z., Tang, Y. H., Zhao, X. N. and Michael, L. (2008). Mitochondrial modulation is involved in the hepatoprotection of *Limonium sinense* extract against liver damage in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 120(3), 427-431.
286. Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. and Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
287. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., and Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, 90(3), 333-340.
288. Tikare, S. N., Yendigeri, S., Gupta, A. D., Dhundasi, S. A., and Das, K. K. (2012). Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematology and erythrocyte antioxidant defense system of albino rats exposed to heavy metals (nickel II and chromium VI). *Indian J Physiol Pharmacol*, 56(2), 137-46.
289. Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. and Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 632-639.
290. Trabelsi, N., Oueslati, S., Falleh, H., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Mérillon, J. M., Abdelly, C. and Ksouri, R. (2012). Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, 135(3), 1419-1424.
291. Trabelsi, N., Oueslati, S., Henry-Vitrac, C., Waffo-Téguo, P., Medini, F., Mérillon, J. M., Smaoui, A. and Ksouri, R. (2013a). Phenolic contents and biological activities of *Limoniastrum guyonianum* fractions obtained by Centrifugal Partition Chromatography. *Industrial crops and products*, 49, 740-746.
292. Trabelsi, N., Waffo-Téguo, P., Snoussi, M., Ksouri, R., Mérillon, J. M., Smaoui, A. and Abdelly, C. (2013b). Variability of phenolic composition and biological activities of two Tunisian halophyte species from contrasted regions. *Acta physiologiae plantarum*, 35(3), 749-761.

293. Trabelsi, N., Oueslati, S., Ksouri, R., Nassra, M., Marchal, A., Krisa, S., Abdelly, C., Mérillon, J. M. and Waffo-Téguo, P. (2014). The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. *Food chemistry*, 146, 466-471.
294. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
295. Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C. and Della Loggia, R. (1986). The croton oil ear test revisited. *Agents and Actions*, 17(3-4), 347-349.
296. Tucker, J. M. and Townsend, D. M. (2005). Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 59(7), 380-387.
297. Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F. and Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
298. Uche, F. I. and Aprioku, J. S. (2008). The Phytochemical Constituents, Analgesic and Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Jatropha curcas* leaves in Mice and Wister albino rats. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 12(4), 99 - 102.
299. Unten, L., Koketsu, M. and Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr. Food. Chem*, 45(6), 2009-2019.
300. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), 44-84.
301. Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. and Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
302. Van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., and van der Vijgh, W. J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*, 56(8), 935-943.
303. Vane, J. R. and Ferreira, S. H. (Eds.). (1979). *Anti-inflammatory drugs* (Vol. 50). Springer.
304. Van Tyne, D., Martin, M. J. and Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolyisin. *Toxins*, 5(5), 895-911.
305. Vergne, P., Bertin, P. and Trèves, R. (2000). Aspirine, douleurs et inflammation. *Rev. Méd. Interne*, 21(11), 89-96.
306. Viana, C. F. G., Aragao Jr, A. G. M., Ribeiro, R. A., Magalhaes, J. F. G. and Vale, M. R. (1998). Effects of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. *Fitoterapia*, 69(4), 349-354.
307. Visser, C. E., Tekstra, J., Brouwer-Steenbergen, J. J. E., Tuk, C. W., Boorsma, D. W., Sampat-Sardjoepersad, S. C., Meijer, S., Krediet, R.T. and Beelen, R. H. J. (1998). Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO- α , IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clinical and experimental immunology*, 112(2), 270.
308. Vogel, W. H. (1997). Analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activity. In *Drug Discovery and Evaluation*. Springer Berlin Heidelberg, 360-420.
309. Von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem*, 45, 632-638.
310. Watson, L. and Dallwitz, M. J. (1992). *The grass genera of the world*. CAB international.
311. Weill, B. and Batteux, F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur.
312. Wepierre, J. (1977). *Abrégé de pharmacologie générale*. Paris, New York, Milan: Masson, 191 p.
313. Whiteside, G. T., Boulet, J. M. and Walker, K. (2005). The role of central and peripheral μ opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA ([8-(3, 3-diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1, 3, 8-triazaspiro [4.5] dec-3-yl]-acetic acid). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1234-1240.
314. Willard, M. D. and Twedt, D. C. (1999). Gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 172-207.
315. Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), 544-547.

316. Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology*, 115(4), 1405-1412.
317. Yam, M. F., Asmawi, M. Z. and Basir, R. (2008). An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 362-368.
318. Yam, M. F., Ang, L. F., Ameer, O. Z., Salman, I. M., Aziz, H. A. and Asmawi, M. Z. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Elephantopus tomentosus* ethanolic extract. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 2(4), 280-287.
319. Zhang, D., and Hamauzu, Y. (2004). Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 95-100.
320. Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L. and Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 C. *Meat science*, 81(4), 686-692.
321. Ziani, B. E., Calhelha, R. C., Barreira, J. C., Barros, L., Hazzit, M. and Ferreira, I. C. (2015). Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Industrial Crops and Products*, 77, 582-589.
322. Ziaul Haque, M. and Moyen Uddin, M.P.K. (2015). Thrombolytic Activity Profiling of Cassava, *Manihot Esculenta* Leaves and Tuber Extracts with Two Formulations. *Medicine Journal*, 2(3), 44-47.

ملخص

يوضح هذا العمل ما تم إنجازه بشأن الدراسة الكيميائية، الـممية وتقييم الخصائص العلاجية (النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المـمكّن للألم، النشاط الخافض للحرارة، النشاط التحليلي لثخانة الدم والنشاط المضاد للبكتيريا) للمـم تخلص المائي لأوراق *L. guyonianum*. أظهرت نتائج التحليل الكيميائية غنى النبات بمتعددة الفينول ($64.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ EAG/ mg Ex) والفلافونويدات ($34.1 \mu\text{g}$ EQ/ mg Ex)، والدباغ على وجه الخصوص ($63.25 \mu\text{g}$ EAT/ mg Ex). كما مكنت تقنية الفحص الكروماتوغرافي HPLC-TOF/MS من إثبات الوجود الغالب لحمض fumarique، للأحماض الفينولية، فلافونات، catéchine (فلافانول) و naringine (فلافانول الاسكري) على شكل آثار. وقد أظهرت اختبارات الـممية على النموذج الحيواني وعلى خلايا الدم الحمراء أن المـم تخلص غير سام تماما. كما بينت دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة للمـم تخلص أكثر فاعلية من فيتامين ج في الحد من تأثير التـم الدموي β -carotène et chélation de fer و في الحي ضد الاكـممة الناجمة عن النيكل قدرات مضادة للأوكسدة. حيث كان المـم تخلص أكثر فاعلية من فيتامين ج في الحد من تأثير التـم الدموي للنبيكل بطريقة تعتمد على الجرعة. من ناحية أخرى، فإن المـم تخلص المائي حال بفعالية دون تطور التهاب القدم (74.0 %) والأذن (86.15 %) مما يوحي باحتوائه على مواد مضادة للالتهابات ذات قدرة عالية. من جهة أخرى تم الكشف باستعمال جهاز قياس الألم (287.48 %) واختبار Koster (63.0 %) أن للمـم تخلص خصائص مـمكّنة للألام الطرفية. على عكس ذلك، أظهر المـم تخلص باستعمال اختبار Tail Flick قدرة ضعيفة على تـمكّن الآلام المركزية عكس المورفين. علاوة على ذلك، أبان المـم تخلص قدرة على خفض درجة حرارة الجرذان الناجمة عن حقن الخميرة ولكن بفاعلية أقل من الباراسيتامول. كما تبين أن للمـم تخلص خصائص تحليل ثخانة الدم (30.08 %) وأخيرا نوه بقدرة المـم تخلص الكبيرة المضادة للبكتيريا وخصوصا ضد *Staphylococcus epidermidis* و *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). و في الختام، مكنت هذه الدراسة من الكشف عن خصائص دوائية وعلاجية واعدة جدا للمـم تخلص المائي لأوراق *L. guyonianum* يمكن تطبيقها في المـم تحضرات البيولوجية الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية : *Limoniastrum guyonianum*، المستخلص المائي للأوراق، الكيمياء النباتية، السمية، الخصائص الدوائية.

Résumé

Ce travail a été consacré à l'étude phytochimique, toxicologique et de certaines activités pharmacologiques (antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, thrombolytiques et antibactérienne) de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum*. Les résultats de l'analyse phytochimique ont montré une richesse de la plante en polyphénols ($64.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ EAG/ mg Ex), en flavonoïdes ($34.1 \mu\text{g}$ EQ/ mg Ex) et plus particulièrement en tanins ($63.25 \mu\text{g}$ EAT/ mg Ex). L'analyse par HPLC-TOF/MS a montré la présence prépondérante d'acide fumarique, d'acides phénoliques, de flavones aglycones, de catéchine (flavanol) et de naringine (flavanone glycosylé) à l'état de traces. Les tests de toxicité *in vivo* et sur globules rouges ont montré l'innocuité de l'extrait. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* par les tests de DPPH, ABTS, β -carotène, FRAP, β carotène et chélation de fer et *in vivo* contre le stress oxydatif induit par le nickel a montré le potentiel antioxydant de l'extrait. L'extrait s'est avéré plus efficace que la vit C dans la réduction de l'effet hématotoxique du nickel et ceci de manière dose-dépendante. D'autre part, l'extrait aqueux a inhibé de façon significative l'évolution de l'œdème la patte (74.0 %) et de l'oreille (86.15 %) ce qui démontre la présence de substances à potentiel anti-inflammatoire élevé. Le criblage de l'effet analgésique périphérique de l'extrait a été confirmé par le test de Koster (63.0 %) et par analgésimètre (287.48 %). Par ailleurs, un faible pouvoir analgésique central morphine-like est enregistré par le test de Tail Flick aux doses étudiées. De surcroît, l'extrait a réduit l'hyperthermie provoquée par l'injection de la levure mais son effet antipyrétique est moins efficace que celui du paracétamol. L'extrait s'est montré avoir également des propriétés thrombolytiques (30.08 %). Enfin, on note les effets antibactériens de l'extrait, particulièrement contre *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). En conclusion, cette étude a permis de dévoiler des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques très prometteuses de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guyonianum* pour être concrétiser en biopharmaceutique.

Mots clés : *Limoniastrum guyonianum*, extrait aqueux des feuilles, phytochimie, toxicité, activités pharmacologiques.

Abstract

This work was devoted to the phytochemical, toxicological and many pharmacological activities (antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, thrombolytic and antibacterial activity) of the aqueous extract of the leaves of *L. guyonianum*. The phytochemical analysis showed the richness of the plant in polyphenols ($64.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ EAG/ mg Ex), flavonoids ($34.1 \mu\text{g}$ EQ/ mg Ex) and particularly in tannins ($63.25 \mu\text{g}$ EAT/ mg Ex). Analysis by HPLC-TOF/MS allowed us to demonstrate the predominant presence of fumaric acid, phenolic acids and aglyconic flavones, catechin (flavanol) and naringin (flavanone glycosylated) as trace. Toxicity tests on animal models and on red blood cells demonstrated the safety of the extract. The *in vitro* antioxidant potency tested by DPPH, ABTS, β -carotene, FRAP, β carotene and iron chelation and the *in vivo* against nickel-induced oxidative stress showed the antioxidant potential of the extract. The extract was more effective than vit C in reducing the hematotoxic effect of nickel in a dose-dependent manner. On the other hand, the aqueous extract significantly inhibited the evolution of the ear (74.0 %) and paw edema (86.15 %), which demonstrates the presence of substances with a high anti-inflammatory potential. The screening of the peripheral analgesic effect of the extract was demonstrated by the Koster test (63.0 %) and by analgesimeter (287.48 %). On the other hand, a low morphine-like central analgesic power is recorded by the Tail Flick test at the doses studied. In addition, the extract reduced the hyperthermia caused by the injection of yeast but its antipyretic effect is less effective than of paracetamol. The extract was also shown to have thrombolytic properties (30.08 %). Finally, we note antibacterial effects of the extract particularly against *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus* (CMI = 01.25 mg/ml). In conclusion, this study revealed very promising pharmacological and therapeutic properties of the aqueous extract of the *L. guyonianum* leaves to be realized in biopharmaceuticals.

Key words: *Limoniastrum guyonianum*, aqueous leaves extract, phytochemistry, toxicity and pharmacological activities.