

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2019

## THÈSE

Présentée par

**Mayouf Nozha**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT**

**Filière: Sciences Biologiques**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

THÈME

**Propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et  
immunomodulatrice des extraits *d'Asphodelus  
microcarpus***

Soutenue publiquement le ...../...../2019

DEVANT LE JURY

Président :	<b>Pr Abderrahmane BAGHIANI</b>	Professeur	UFA Sétif 1
Directeur :	<b>Pr Lekhmici ARRAR</b>	Professeur	UFA Sétif 1
Examineurs :	<b>Pr Fatiha BEDJOU</b>	Professeur	UAM Bejaia
	<b>Pr Saliha DAHAMNA</b>	Professeur	UFA Sétif 1
	<b>Dr Ridha AICHOIR</b>	MCA	UFA Sétif 1
	<b>Dr Asma MOSBAH</b>	MCA	UFM Constantine

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## *Dédicaces*

*En guise de reconnaissance envers Allah le Tout Puissant, le Tout Scient et l'Omnisavant*

*Je dédie ce travail à la communauté scientifique*

*Espérant qu'il lui sera utile,*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Celui qui a été toujours le meilleur guide de ma vie, et le plus près de mon cœur, mon Père  
BOUAZIZ qui a toujours espéré me voir grande parmi les meilleurs et qui n'a jamais hésité  
de faire les plus grands sacrifices pour arriver à mon but*

*\* je t'aime beaucoup papa\*,*

*Le plus grand amour dans mon cœur, à la prunelle de mes yeux qui n'a jamais cessé de  
m'encourager, ma mère "NEDJMA"*

*\*Je t'aime très fort Mama\**

,

*A mes frères KHALED et KHMISSE et à mes sœurs*

*qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont toujours soutenu et encouragée,*

*A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, A tous mes  
amies en qui j'ai toujours trouvé soutien et réconfort,*

*A toute la famille Mayouf*

*Nozha*

## REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah le Tout Puissant qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je remercie **Pr Lekhmici Arrar**, Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et son équipe, pour ses conseils très importants, pour m'avoir fait profiter de son savoir faire et compétence durant toute la période de cette recherche compétence. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

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

Je tiens à remercier Monsieur **Abderrahmane Baghiani**, Professeur au département de Biologie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour sa disponibilité et ses précieux conseils, et d'avoir accepté d'être le président du jury.

Mes sincères remerciements vont au **Pr Fatiha Bedjou**, Université Abderrahmane Mira, Béjaïa, **Pr Saliha Dahamna** et **Dr Ridha Aichour**, Université Ferhat Abbas, Sétif 1 et **Dr Asma Mosbah**, Université Frères Mentouri, Constantine 1, de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens à remercier **Pr Nouredine Charef** pour son aide et ses conseils qui m'ont été d'une grande utilité tout au long de ce travail.

Je remercie vivement tous mes enseignants en particulier, **Pr Rachid Belhattab**, **Pr Seddik Khennouf** et **Pr Smain Amira**.

Enfin, je voudrai exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire de Biochimie Appliquée de Sétif, en particulier, **Mr Nacer Amraoui**, **Dr Thoraya Guemmaz**, **Dr Kamel Mokhnache**, **Mme Soulef Saoudi** et **Dr Saoussen Kada** qui m'ont soutenue au cours de la réalisation de cette thèse.

## Liste des travaux

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

### Publications

**Mayouf N**, Arrar L, Charef N, Baghiani A. 2017. Contenu en polyphénols et activité antioxydante des extraits aqueux d'*Asphodelus microcarpus*. *Revue des Régions Arides*. 43(3): 585-588.

**Mayouf N**, Charef N, Saoudi S, Baghiani A, Khennouf S, Arrar L. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Asphodelus microcarpus* methanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 239, 1-9.

### Communications

**Mayouf N**, Arrar L, Charef N, Baghiani A, 2016. Contenu en polyphénols et activités antioxydante d'extrait aqueux d'*Asphodelus microcarpus*. 5<sup>th</sup> International Meeting on Plant Biotechnology in Arid and Oasis Zones. 19-21 December, Zarzis, Tunis.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Baghiani A, 2016. Propriété Antioxydante de l'extrait aqueux de la plante *Asphodelus microcarpus*. Congrès International de phytothérapie. 29 avril - 1 mai, Monastir, Tunis.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Baghiani A, Khennouf S, 2017. Evaluation of the antioxidant effect of the aqueous extract of the roots of *Asphodelus microcarpus*. 8<sup>es</sup> Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des bioressources 5-7 mai, Monastir, Tunis.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Baghiani A, 2017. Evaluation of flavonoids and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* leaves extract. 1<sup>ère</sup> Journée Nationale de l'arbre: Place et rôle dans l'appui au développement durable. 25 octobre, M'Sila. Algeria.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Charef N, Baghiani A, Khennouf S, 2017. Evaluation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes et propriété antioxydante de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus*. 3<sup>ème</sup> Congrès International de la SAN 28-30 Novembre, Constantine, Algeria.

**Mayouf N**, Arrar L, Charef N, Baghiani A, 2017. Evaluation de l'effet antioxydant de l'extrait aqueux de la plante *Asphodelus microcarpus*. Journées Internationales de Génétique Clinique (Génétique et pathologie). 22-24 mai, Setif, Algeria.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Baghiani A, 2018. Investigation of Antioxidant propriétés and anti-inflammatory activity using xylene induced ear oedema in mice of *Asphodelus microcarpus*. Aerial part methanolic extract. 9<sup>èmes</sup> journées scientifiques internationales sur la valorisation des bioressources du 3- 6 Mai, Monastir, Tunis.

**Mayouf N**, Khennouf S, Saoudi S, Baghiani A, Arrar L, 2018. Antioxidant activity of *Asphodelus microcarpus* leaves extract and its relationship with phenolic composition. Seminaire National Biologie Environnement et Santé SNBES 8-9 October Skikda, Algeria.

**Mayouf N**, Arrar L, Saoudi S, Baghiani A, 2018. Phytochemical analysis, antioxidant activity and analgesic effect of SFME *Asphodelus microcarpus*. Third Africa international Allelopathy Congress 24-26 november, Blida, Algeria

## المخلص

يهدف العمل الحالي إلى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والمسكنات للألم والمنظمة للمناعة للمستخلصات الميثانولية (EM) المائية (EA) للأجزاء المختلفة من نبتة البرواق *Asphodelus microcarpus* ، وهي نبات من عائلة ليلياسي. لقد أظهر تحديد كميات عديدة الفينول والفلافونويدات أن الـ EM أكثر ثراءً بعديدات الفينول والفلافونويدات من EA ، وأجريت ستة اختبارات لدراسة النشاطات المضادة للأكسدة: DPPH ، ABTS ، OH<sup>\*</sup> ، التقاط ايونات الحديد الثنائي ، خلاصة الحديد الحديدية و تثبيط الأكسدة المزدوجة لحمض لينوليك و β كاروتين. أظهر التقييم الكمي لقدرة الكسح على DPPH أن المستخلصات EAF و EMF هي الأكثر نشاطاً بقيم IC<sub>50</sub> 33.33 و 98 ميكروغرام / مل ، على التوالي. علاوة على ذلك، أثبتت مقتطفات EMF و EAF و EAPA أنها الأكثر نشاطاً ككانسات لـ ABTS<sup>+</sup> مع IC<sub>50</sub> مساوية لـ 29 و 55.3 و 55.6 ميكروغرام / مل. تم الحصول على قيمة IC<sub>50</sub> الأكثر أهمية (490 و 650 و 822 و 839 ميكروغرام / مل) ، عن طريق تثبيط الجذر OH<sup>\*</sup> ، بواسطة EAPA و EATF و EM PA و EMTF . أظهر اختبار القدرة المخيلية لأيونات الحديد أن المستخلصات المائية EAF و EAPA و EATF مسخليات جيدة مع IC<sub>50</sub> من 60 و 63 و 79 و 80 ميكروغرام / مل. تتمتع جميع المستخلصات الميثانولية والمائية لـ *Microcarpus Asphodelus* بقوة مخفضة ملحوظة بالترتيب التالي > AR > EAPA > EATF > EAF > EMF > EMTF > EMPA : EMR. أظهر تثبيط أكسدة حمض اللينوليك / كاروتين نشاطاً مضاداً للأكسدة مرتفعاً نسبياً في EAF و EAPA و EATF و EMTF (I = % 99 ، 96.14 ، 94.6 و 88.02). تمت دراسة الآثار المضادة للالتهابات والمنظمة للمناعة في الجسم الحي في نماذج حيوانية. أظهر اختبارا الالتهاب المحرض "Xylen Edema Ear Edema: XIEE" و Carrageenan induced Paw Edema: CIPE" أن مستخلصات APME و RME سببت تأثيراً مهماً مضاداً للوذمة (p < 0.05) بجرعة 500 مغ / كغ في CIPE بعد 6 ساعات (58.04% ، 58.75% ، على التوالي). أظهر APME ، LME SFME و RME (100 و 300 و 500 مغ / كغ) تثبيطاً كبيراً (p < 0.05) من الوذمة في حالة XIEE. في

التهاب المفاصل الناجم عن الفورمالديهايد في رجل الفئران، كشف العلاج عن طريق الفم باستعمال 50 و 100 و 200 مغ / كغ من ME و EA تثبيطا كبيرا للتورم بنسب تراوحت بين 38,81-60,4% و 50-89,11%، على الترتيب. أدى التأثير المناعي للمستخلصات EM و EA عند 50 و 100 و 200 مغ / كغ إلى التحفيز المناعي لإنتاج الأجسام المضادة في الفئران الممنعة بواسطة كريات الدم الحمراء للغنم بنسب تحفيز بين 19-88% و 23-80% لكل من EM و EA على التوالي . وأظهرت الدراسة في الجسم الحي تأثيرا مسكنا للألم بجرعات 100 و 300 و 500 مغ / كغ مع نسب تثبيط بين 86-100% و 83-88% على التوالي ل EM و EA ، وهو تأثير مماثل لذلك الذي سببه الأسبرين.

في الختام ، فإن المستخلصات المائية والميثانولية لـ *A. microcarpus* لها خصائص مضادة للالتهابات وللأكسدة وللتهاب ومنظمة للمناعة. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذا النبات لعلاج بعض الاضطرابات ذات الصلة بالالتهابات ويمكن أن تكون أساسا دوائيا للاستخدام العلاجي لـ *Asphodelus microcarpus* في حالات الالتهاب ونقص المناعة.

**الكلمات المفتاحية:** التنظيم المناعي، مضادات للالتهابات، *Asphodelus microcarpus*، المستخلصات النباتية، مضادات الأكسدة، مسكنات الألم.

## Résumé

Le travail de la présente thèse vise à évaluer les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, analgésiques et immunomodulatrices des extraits méthanoliques (EM) et aqueux (EA) des différentes parties d'*Asphodelus microcarpus*, une plante de la famille des Liliaceae. L'estimation des quantités des polyphénols et des flavonoïdes a montré que les EM sont plus riches que les EA, en polyphénols (377-755,03 et 164-704 mgEAG/g, respectivement) et flavonoïdes (15,37-42,2 et 7,6-25,93 mg ER/g, respectivement). Six tests ont été réalisés pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits : DPPH, ABTS, OH<sup>•</sup> scavenging, chélation du fer ferreux, pouvoir réducteur et β-carotène/acide linoléique. L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur du DPPH montre que les EA des feuilles (EAF et EMF) sont les plus actifs avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 33,33 et 98 µg/mL, respectivement. Par ailleurs, les extraits EMF, EAF, et EA de partie aérienne (EAPA) se sont révélés les plus actifs comme piègeurs du radical ABTS<sup>•+</sup> avec des IC<sub>50</sub> respectives de 22,29, 55,3 et 55,6 µg/mL. Les effets d'inhibition du radical OH<sup>•</sup>, les plus importants sont obtenus avec les extraits EAPA, EATF, EMPA et EMTF (IC<sub>50</sub> = 490, 650, 822 et 839 µg/mL, respectivement). Le test de chélation du fer ferreux a montré que les extraits aqueux, EAPA, EA tiges-fleurs (EATF) et EA racines (EAR) sont de bons chélateurs avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 60, 63 et 79 µg/mL. Tous les extraits méthanoliques et aqueux d'*Asphodelus microcarpus* possèdent un pouvoir réducteur remarquable dans l'ordre : EMPA > EMTF > EMF > EAF > EATF > EAPA > AR > EMR. L'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique/β-carotène a montré une activité antioxydante relativement importante pour EAF, EAPA, EATF et EMTF (I% = 99, 96,14, 94,6 et 88,02%, respectivement). Les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs ont été étudiés *in vivo* sur des modèles animaux. Les deux tests d'inflammation induite, par le Carragénine (Carrageenan Induced Paw Edema : CIPE) et par le xylène (Xylen-Induced Ear Edema : XIEE) ont montré que les extraits APME et RME ont produit un effet anti-

œdémogène significatif ( $p < 0,05$ ) avec la dose de 500 mg / kg pour le CIPE après 6 h (58,04%, 58,75%, respectivement). Les extraits APME, LME SFME et RME (100, 300 et 500 mg / kg) ont montré une inhibition significative ( $p < 0,05$ ) de l'œdème pour le XIEE. Dans l'arthrite induite par la formaline chez les rats, le traitement par voie orale par 50, 100 ou 200 mg/kg des EM et des EA a révélé une inhibition significative du gonflement des pattes de 38, 81 -60,4% et 50- 89,11% respectivement.

L'effet immunomodulateurs des EM et EA des doses de 50, 100 et 200 mg/kg ont provoqué une immunostimulation significative de la production des anticorps chez les souris immunisées par les globules rouges de mouton allant de 19–88% et 23–80% respectivement.

L'étude *in vivo* a montré un effet analgésique périphérique du type acide acétique significatif aux les doses 100, 300 et 500 mg/kg avec des pourcentages d'inhibition de 86-100% et 83-88% respectivement pour les EM et EA, effet comparable à celui de l'aspirine. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques d'*A. microcarpus* présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antiarthritiques, analgésiques et immunostimulatrices intéressantes. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et pourrait constituer une base pharmacologique pour son utilisation thérapeutique dans les cas d'inflammation et d'immunodéficiences.

**Mots clés :** Immunomodulation, effets anti-inflammatoires, *Asphodelus microcarpus*, extraits de plante, antioxydants, analgésique.

## Abstract

The present work aims to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and immunomodulatory activities of the methanolic (ME) and aqueous (AE) extracts of the different parts of *Asphodelus microcarpus*, a plant of the Liliaceae family. The determination of the amounts of polyphenols and flavonoids has shown that ME are richer than AE, in polyphenols (377-755,03 et 164-704 mgEAG/g, respectively) and flavonoids (15.37-42.2 and 7.6-25.93 mg ER/g, respectively). Six tests were carried out for the study of the antioxidant activity of the extracts: DPPH, ABTS, OH<sup>•</sup> scavenging, ferrous iron chelation, reducing power and β-carotene / linoleic acid. The quantitative evaluation of the scavenging power on DPPH showed that the LAE and LME extracts are the most active with IC<sub>50</sub> values of 33.33 and 98 μg / mL, respectively. Furthermore, the LME, LAE and APAE extracts proved to be the most active as scavengers of the ABTS<sup>+</sup> radical with respective IC<sub>50</sub> of 22, 29, 55.3 and 55.6 μg / mL. The most important inhibition effects of the radical are obtained with the extracts EAPA, EATF, EMPA and EMTF IC<sub>50</sub> value (IC<sub>50</sub> value 90, 650, 822 and 839 μg/mL respectively). The chelating capacity test of ferrous ions showed that the aqueous extracts, APAE, SFAE and RAE are good chelators with IC<sub>50</sub> of the order of 60, 63 and 79 μg/mL. All the methanolic and aqueous extracts of *Asphodelus microcarpus* have a remarkable reducing power in the following order: APME > SFME > LME > LAE > SFAE > APAE > RAE > RME. Inhibition of linoleic acid/β-carotene oxidation showed relatively high antioxidant activity for LAE, APAE, SFAE and SFME (I% = 99%, 96.14%, 94.6% and 88.02). The anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been studied *in vivo* in animal models. The two induced inflammation tests, 'Carrageenan Induced Paw Edema: CIPE' and 'Xylen Induced Ear Edema: XIEE' showed that APME and RME extracts produced a significant anti-edematogenic effect (p <0.05) with the dose of 500 mg / kg for CIPE after 6 h (58.04%, 58.75%, respectively). All methanolic extracts (100, 300 and 500 mg / kg) showed significant

( $p < 0.05$ ) inhibition of edema for XIEE. In formaline-induced arthritis in the rat, oral treatment with 50, 100 or 200 mg/kg of ME and AE revealed significant inhibition of paw swelling of 38.11-60.4% and 50- 89.11%, respectively. The immunomodulatory effect of methanolic (ME) and aqueous (AE) extracts of the plant at 50, 100 and 200 mg / kg resulted in significant immunostimulation of antibody production in mice immunized with sheep red blood cells of 19–88% and 23–80% respectively . The *in vivo* study showed a significant peripheral analgesic effect of the acetic acid type at doses of 100, 300 and 500 mg / kg with inhibition percentages of 86-100% and 83-88%, respectively for EM and EA, effect comparable to that of aspirin. In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *A. microcarpus* have interesting anti-inflammatory, antioxidant, anti-arthritic, analgesic and immunostimulatory properties. This study supports the traditional use of this plant for the treatment of certain inflammation-related disorders and could provide a pharmacological basis for the therapeutic use of *Asphodelus microcarpus* in cases of inflammation and immunodeficiency.

**Keywords:** Immunomodulation, anti-inflammatory effects, *Asphodelus microcarpus*, plant extracts, antioxidants, analgesic.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Différents types des espèces réactives (ROS et RNS).....	4
<b>Tableau 2.</b> Principaux rôles physiologiques des ROS .....	5
<b>Tableau 3.</b> Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires.....	18
<b>Tableau 4.</b> Classification botanique d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	34
<b>Tableau 5.</b> Plantes médicinales recensées, leurs usages thérapeutiques et leurs modes de préparation.....	56
<b>Tableau 6.</b> Aspects, couleurs et rendements des extraits bruts des différentes parties d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	59
<b>Tableau 7.</b> Teneurs en polyphénols totaux (mgEAG/g), flavonoids (mg ER/g) de différentes parties d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	60
<b>Tableau 8.</b> Composés phénoliques identifiés par HPLC/MS/ MS dans les extraits méthanolique d' <i>A. microcarpus</i> .....	65
<b>Tableau 9.</b> Pouvoir chélateur des ions ferreux, exprimé en IC <sub>50</sub> (µg/ mL), des différents extraits méthanoliques et aqueux d' <i>A. microcarpus</i> et du standard de référence (EDTA).....	71
<b>Tableau 10.</b> Inhibition de l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats (en %) par l'extrait méthanolique de la partie aérienne (EMPA) et racinaire (EMR) d' <i>A. microcarpus</i> .....	84
<b>Tableau 11.</b> Inhibition de l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats (en %) par l'extrait aqueux de la partie aérienne (EAPA) et racinaire (EAR) d' <i>A. microcarpus</i> .....	84

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Stress oxydatif et ses conséquences .....	7
<b>Figure 2</b> : Digramme de classification des antioxydants, vert : antioxydants exogènes, bleu : antioxydants endogènes .....	8
<b>Figure 3</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	13
<b>Figure 4</b> : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques ( $Me^{+n}$ ) .....	15
<b>Figure 5</b> : Evolution de l'inflammation aiguë .....	17
<b>Figure 6</b> : Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens .....	19
<b>Figure 7</b> : Photographie d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	33
<b>Figure 8</b> : Carte du découpage administratif de la wilaya de Tébessa.....	37
<b>Figure 9</b> : Droite d'étalonnage de l'acide gallique .....	40
<b>Figure 10</b> : Droite d'étalonnage de la rutine. ....	41
<b>Figure 11</b> : Fréquences des maladies traitées par les plantes médicinales.....	54
<b>Figure12</b> : Profil chromatographique des EM d' <i>A. microcarpus</i> obtenu par HPLC/MS/MS .....	63
<b>Figure13</b> : Activité anti radicalaire des extraits méthanoliques d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	66
<b>Figure14</b> : Activité anti radicalaire des extraits aqueux d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	67
<b>Figure 15</b> : Pourcentage d'inhibition du blanchissement de $\beta$ -carotène après 24 heures par les extraits méthanoliques d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	68
<b>Figure 16</b> : Pourcentage d'inhibition du blanchissement de $\beta$ -carotène après 24 heures par les extraits aqueux d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	70
<b>Figure17</b> : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	74
<b>Figure18</b> : Pouvoir réducteur des extraits aqueux d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	74
<b>Figure 19</b> : Capacité des différents extraits méthanoliques d' <i>A. microcarpus</i> à piéger le radical hydroxyle.....	76
<b>Figure 20</b> : Capacité des différents extraits aqueux d' <i>A. microcarpus</i> à piéger le radical hydroxyle.....	76

<b>Figure 21</b> : Activité scavenging du radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits aqueux d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	78
<b>Figure 22</b> : Activité scavenging du radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits méthanoliques d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	78
<b>Figure 23</b> : Effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.....	82
<b>Figure 24</b> : Effet anti-inflammatoire des extraits aqueux sur l'œdème de la patte induit par la carragénine .....	83
<b>Figure 25</b> : Effet des extraits méthanoliques (EM) d' <i>A.microcarpus</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'xylène chez les souris .....	87
<b>Figure 26</b> : Effet des extraits aqueux (EA) d' <i>A. microcarpus</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris .....	88
<b>Figure 27</b> : Effet anti-inflammatoire des extraits EMPA(A), EM R (B) sur l'évolution de l'œdème de la patte gauche enflammée par la formaline .....	91
<b>Figure 28</b> : Effet anti-inflammatoire des extraits EAPA(C), EAR (D) sur l'évolution de l'œdème de la patte gauche enflammée par la formaline.....	92
<b>Figure 29</b> : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits méthanoliques d' <i>A. microcarpus</i> par rapport à l'aspirine à 100 mg/kg.....	94
<b>Figure 30</b> : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits méthanoliques d' <i>A. microcarpus</i> par rapport à l'aspirine à 100 mg/kg .....	95
<b>Figure 31</b> : Effet des extraits méthanoliques d' <i>A. microcarpus</i> sur le titre des anticorps chez les souris.....	98
<b>Figure 32</b> : Effet des extraits aqueux d' <i>A. microcarpus</i> sur le titre des anticorps chez les souris.....	99

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AAR %** : Activité antioxydante relative

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

**AIS**: Anti-inflammatoires stéroïdiens.

**BHT**: butylatedhydroxytoluene

**COX**: Cylooxygenase

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

**EA** : Extrait aqueux

**EAG**: Equivalent d'acide gallique

**EDTA**: Ethylenediaminetetraacetic acid

**EM**: Extrait méthanolique

**EQ**: Equivalent quercétine

**ER** : Equivalent rutine

**HA**: Hémagglutination

**IC50**: concentration of inhibitor required to produce 50% inhibition

**IL**: Interleukine

**MAPK**: Mitogen Activated Protein Kinase

**MDA**: Malondialdéhyde

**NFκB**: Nuclear factor-kappa B.

**OCDE**: Organisation de Coopération et de Développement Economiques

**PGE2** : Prostaglandine E2

**SD**: Standard deviation

**SEM**: Standard error of mean

**SRBC**: Sheep Red Blood Cells

**TCA**: Trichloroacetic acid

**TNFα**: Tumor Necrosis Factor

# Sommaire

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

---

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

<b>1. Antioxydants</b> .....	3
1.1. Stress oxydatif .....	3
1.2. Espèces réactives de l'oxygène .....	3
1.3. Types des radicaux libres.....	3
1.4. Rôles des ROS.....	4
1.5. Cible des ROS et conséquences .....	5
1.6. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques .....	7
1.6.1. Antioxydants enzymatiques .....	8
1.6.2. Antioxydants non enzymatiques .....	10
1.6.2.1. Vitamines.....	10
1.6.2.2. Polyphénols .....	11
1.6.2.3. Acides phénoliques .....	11
1.6.2.4. Tannins .....	12
1.6.2.5. Flavonoïdes .....	12
<b>2. Inflammation et anti-inflammatoires</b> .....	16
2.1. Médiateurs de l'inflammation.....	17
2.2. Anti-inflammatoires .....	18
2.3. Anti-inflammatoires naturels .....	21
<b>3. Analgésiques et antalgiques</b> .....	23
3.1. Analgésiques opioïdes.....	23
3.2. Analgésiques non morphiniques.....	24
3.3. Analgésiques d'origine végétale.....	24
<b>4. Immunomodulation</b> .....	26
4.1. Immunomodulateurs.....	26
4.2. Immunomodulateurs naturels.....	27
4.2.1. Polysaccharides .....	30
4.2.2. Terpenoïdes.....	31
4.2.3. Lectines .....	31
4.2.4. Flavonoïdes.....	32

<b>5. <i>Asphodelus microcarpus</i></b> .....	33
5.1. Description et classification botanique.....	33
5.2. Utilisations traditionnelles d' <i>A.microcarpus</i> .....	34
5.3. Composition chimique.....	35
5.4. Activités biologiques.....	36

---

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

<b>1. Matériels</b> .....	37
1.1. Description et Choix des localités de l'enquête.....	37
1.2. Matériel végétal .....	38
1.3. Animaux.....	38
1.4. Sang de mouton.....	39
<b>2. Méthodes</b> .....	39
2.1. Préparation des extraits .....	39
2.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	40
2.3. Détermination de la teneur en Flavonoïdes totaux.....	41
2.4. Détermination des composés phénoliques par HPLC/ MS/MS.....	41
2.5. Evaluation de la toxicité des extraits.....	42
2.6. Evaluation des activités antioxydante.....	42
2.6.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH .....	43
2.6.2. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	43
2.6.3. Chélation du fer ferreux .....	44
2.6.4. Test du pouvoir réducteur.....	45
2.6.5. Test du piégeage du radical hydroxyle .....	45
2.6.6. Test ABTS .....	46
2.7. Activités anti-inflammatoires in vivo.....	46
2.7.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène.....	47
2.7.2. Inflammation aiguë induite par la carragénine chez les rats.....	48
2.7.2. Inflammation induite par la formaline.....	49
2.8. Détermination de l'activité analgésique .....	50
2.9. Activités immunomodulatrices .....	51
2.9.1. Préparation des globules rouges de mouton.....	51
2.9.2. Évaluation de la réponse humorale .....	52

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

<b>1. Etude ethnobotanique</b> .....	53
<b>2. Extractions et analyse phytochimique</b> .....	58
2.1. Rendements des extractions.....	58

2.2. Analyse phytochimiques.....	60
<b>3. Caractérisation phytochimiques par HPLC/MS /MS.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Activités antioxydantes des extraits d'Asphodelus microcarpus.....</b>	<b>66</b>
4.1. Effet de piégeage du radical DPPH•.....	66
4.2. Effet sur l'oxydation du β-carotène .....	67
4.3. Effet chélateur du fer ferreux .....	70
4.4. Pouvoir réducteur .....	73
4.5. Piégeage du radical hydroxyle .....	75
4.6. Pouvoir antioxydant par ABTS .....	77
<b>5. Activités anti inflammatoires et antiarthritique <i>in vivo</i>.....</b>	<b>80</b>
5.1. Test de toxicité des extraits d' <i>A. microcarpus</i> .....	80
5.2. Activités anti inflammatoires <i>in vivo</i> .....	80
5.2.1 Effet des extraits sur l'œdème induit par la carragénine .....	80
5.2.2 Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylene.....	86
5.3. Activité antiarthritique.....	90
<b>6. Activité antalgique <i>in vivo</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>7. Effet immunomodulateurs <i>in vivo</i>.....</b>	<b>98</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	101
<hr/>	
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>103</b>

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les vertus thérapeutiques des plantes présentent un regain d'intérêt grâce à l'amélioration des techniques extractives et aux progrès des méthodes d'analyses structurales pour la découverte de nouveaux principes actifs. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle obtenus par hémi synthèse ou par modification d'un produit naturel (Newman *et al.*, 2007). Les plantes constituent une source immense de molécules chimiques complexes (métabolites secondaires), largement exploités dans les industries cosmétologiques, agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces métabolites, on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols. Ces derniers et principalement les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leurs nombreuses activités biologiques, parmi lesquelles : les actions antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique et immunomodulatrice.

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme, leur traitement est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires, non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes. Tous les AINS, quelles que soient leur voie d'administration, présentent des risques de toxicité gastro-intestinale et rénale. Cependant, elle se trouve impliquée dans un très grand nombre de pathologies humaines. D'une autre part, le stress oxydant est également à l'origine de plusieurs maladies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardiovasculaires et l'arthrite rhumatoïde. De ce fait, la recherche de substances d'origine végétales douées d'activités anti-inflammatoires et/ou antioxydante s'avère très utile pour l'amélioration du santé humain tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse.

A l'heure actuelle un grand nombre de plantes de la médecine traditionnelle sont utilisées pour traiter des maladies d'infections, les troubles immunologiques et le cancer (Ganju *et al.*, 2003). Ceci est basé sur la capacité des plantes à moduler efficacement les fonctions immunitaires, pouvant ainsi promouvoir la santé positive et maintenir la résistance

de l'organisme à l'infection (Jayathirtha et Mishra, 2004). L'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies constitue une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes. Nous avons orienté notre étude pour vérifier un éventuel effet immunomodulateurs des extraits méthanoliques et aqueux des différentes parties de la plante *Asphodelus microcarpus*.

- ✓ Analyse phytochimiques des extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus*.
- ✓ Evaluation de la toxicité aigue des extraits méthanoliques et aqueux des différentes parties de plante étudiée.
- ✓ Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques et aqueux d'*Asphodelus microcarpus*.
- ✓ Recherche des propriétés analgésiques des extraits d'*A. microcarpus*.
- ✓ Explorer l'effet des extraits de la plante, *in vivo* sur le système immunitaire comme anti-inflammatoires et immunomodulateurs.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1. Antioxydants**

## **1.1. Stress oxydatif**

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives oxygénées (ROS), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défendre des antioxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies, cancer, diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

## **1.2. Espèces réactives de l'oxygène**

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) sont présentes sous forme radicalaire (radicaux libres) ou non radicalaires. Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires extrêmement instable, qui lui confère une réactivité (demi-vie courte) vis-à-vis d'autres molécules, soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant, soit à le céder ; c'est alors un radical réducteur (Favier, 2003 ; Fontaine, 2009). Les radicaux libres peuvent être désactivés et piégés par des composés antioxydants, qui peuvent inhiber l'effet des oxydants en faisant don d'un atome d'hydrogène ou par des chélateurs (Bursal *et al.*, 2001).

## **1.3. Types des radicaux libres**

Les radicaux libres peuvent être dérivés de l'oxygène (ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Espèce réactive de l'azote RNS : reactive nitrogen species). On définit les espèces réactive d'oxygène comme étant une famille d'entités chimiques regroupant les radicaux libres ou des espèces moléculaires capables de produire des radicaux libres (tableau 1), (Mukhopadhyay *et al.*, 2016),

(tableau 1). Les RNS sont dérivés de l'oxyde nitrique ou du monoxyde d'azote comme le radical monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ), l'anion peroxydinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) et le radical dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), (Finaud *et al.*, 2006).

**Tableau 1:** Différents types des espèces réactives (ROS et RNS), (Fontaine, 2009).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\bullet$	Peroxyde organique	$\text{ROOH}$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\bullet$	Acide hypochlorique	$\text{HOCl}$
Radical alkoxyde	$\text{RO}^\bullet$	Oxygène singulet	$\text{O}_2$
Monoxyde d'azote	$\text{NO}^\bullet$	Peroxydinitrite	$\text{ONOO}^-$

#### 1.4. Rôles des ROS

Les ROS sont connus en biologie pour jouer un double rôle physiologique et pathologique.

La production des ROS pro-oxydantes est normale à faible concentration et s'accompagne d'un rôle physiologique important. Selon Droge (2002), les radicaux libres ont les fonctions physiologiques résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Principaux rôles physiologiques des ROS.

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

### 1.5. Cible des ROS et conséquences

En plus des fonctions biologiques, les ROS conduisent à des concentrations élevées, à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversible. En effet, toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles des ROS (Barouki, 2006 ; Valko *et al.*, 2007) :

**Lipides :** les acides gras polyinsaturés sont la cible lipidique majeure des ROS, plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé (Favier, 2003). Les acides gras polyinsaturés sont privilégiée de l'attaque par le HO<sup>•</sup>. Ce dernier est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. (Fontaine, 2007; Miwa *et al.*, 2008). Cette réaction est appelée peroxydation lipidique qui conduisent à la formation des nombreux dérivés toxiques, parmi ces dérivés, le MDA (malondialdéhyde). Et elle provoque aussi une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une

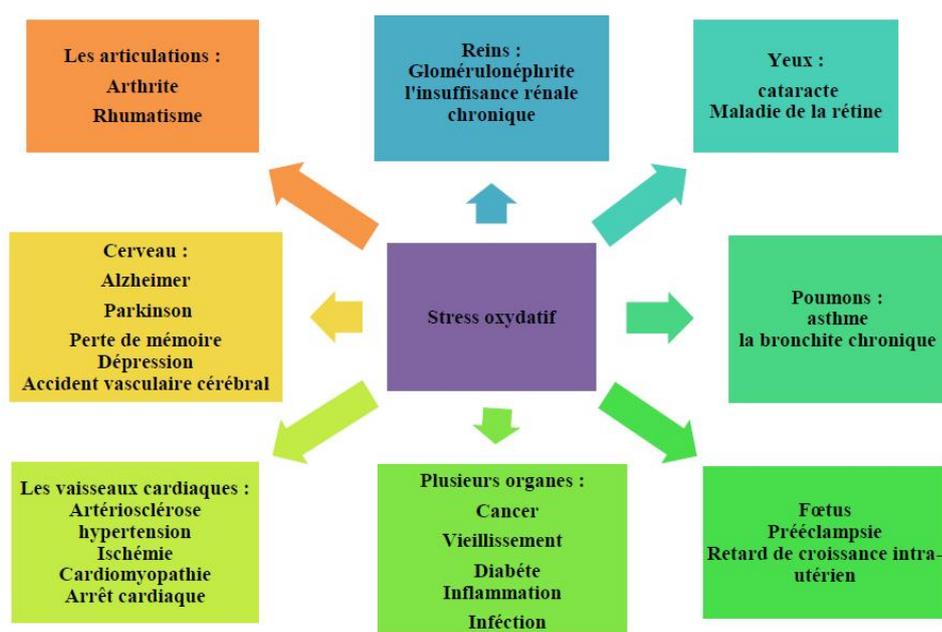
altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Favier, 2003).

**Protéines :** de façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi des cibles pour les ROS, en particulier Les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le  $\text{OH}^\bullet$  s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Schnackenberg, 2002). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH), (Stocker et Keaney, 2004). Les sites actif contenant le groupement Fe-S sont également très sensibles à l'inactivation par l' $\text{O}_2^\bullet$  (Beckman et Ames, 1998). Les réactions d'oxydation de protéines peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui coupent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE (4-Hydroxynonanal). Ces modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées (Valko *et al.*, 2007).

**Acides nucléiques :** les bases nucléiques sont susceptibles d'être directement oxydées par les ROS (Barouki, 2006). L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées (Fontaine, 2007; Orban, 2011). Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) (Valko *et al.*, 2006), mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Fontaine, 2007; Orban, 2011). Ces modifications vont perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non

fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagenèse (Valko *et al.*, 2006).

Le stress oxydant et les ROS provoquent peuvent être à l'origine de dommages cellulaires et sont donc à l'origine du développement de diverses pathologies (Kone *et al.*, 2012). telles que le diabète, les désordres rhumatismaux (figure 1), (Luximon *et al.*, 2002).



**Figure 1 :** Stress oxydatif et ses conséquences (Nagar *et al.*, 2017).

## 1.6. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

La production excessive ou incontrôlée des ROS induit une perturbation du statut redox pouvant induire de sérieuses altérations des structures cellulaires. Il est donc absolument nécessaire que cette production de ROS soit contrôlée (Halliwell, 1990). En effet, l'organisme dispose de systèmes de défense très efficaces contre la production et la présence des ROS. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme d'antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (Pastre et

Priymenko, 2007). Certains antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde (Benbrook, 2005). Dans le système de défense antioxydant de l'organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques résumés dans la figure 2.

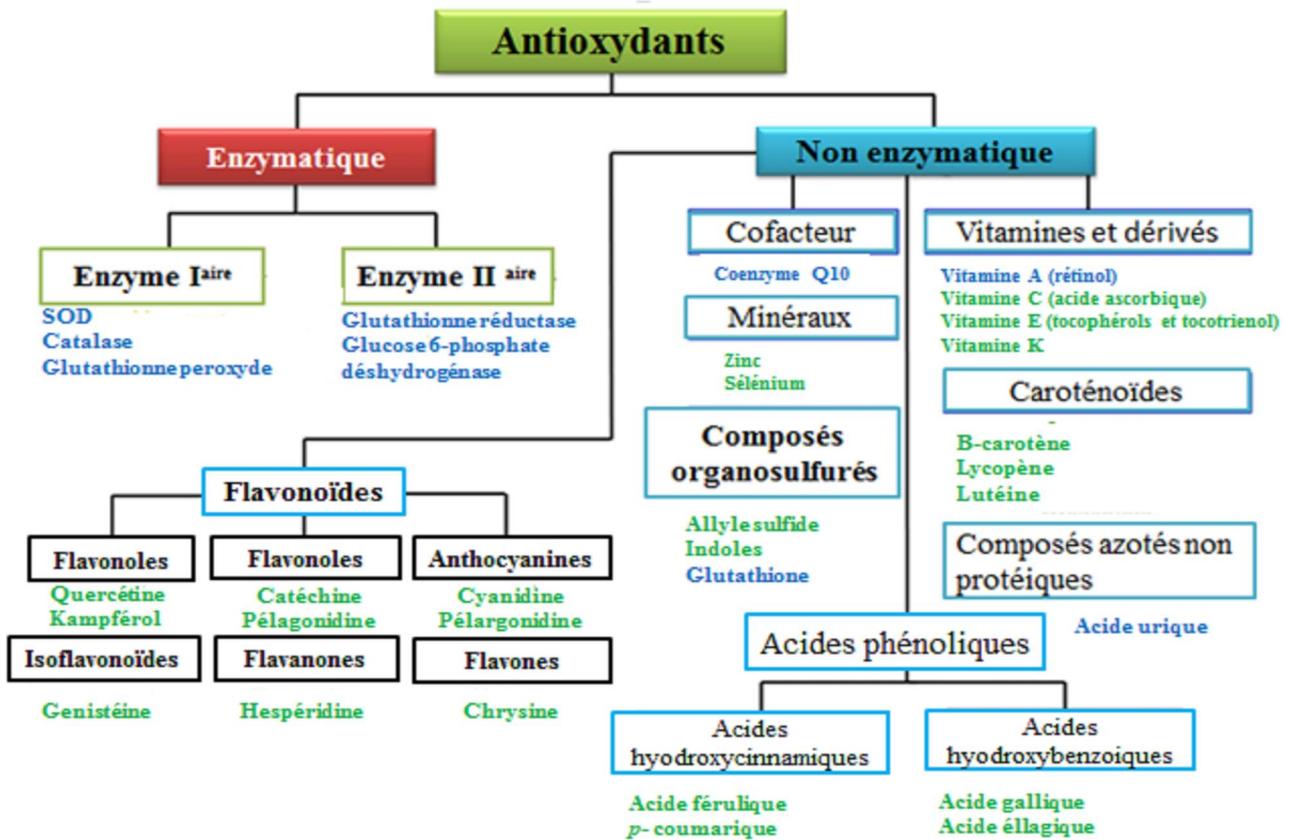


Figure 2 : Digramme de classification des antioxydants, vert : antioxydants exogènes, bleu : antioxydants endogènes (Godman *et al.*, 2011).

### 1.6.1. Antioxydants enzymatiques

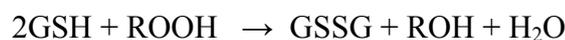
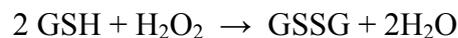
Les antioxydants enzymatiques sont représentés essentiellement par la Superoxyde dismutase (SOD), la Catalase (CAT), et Glutathion peroxydase (GPx) élaborées par

l'organisme. Elles sont présentes en permanence mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika *et al.*, 2004).

La SOD est une métalloprotéine qui constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres de l'oxygène. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs SOD qui diffèrent par leur cofacteur, leur structure et leur localisation cellulaire. C'est ainsi qu'on trouve une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD), (Valko *et al.*, 2007).

La catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules, et il possède une grande affinité à son substrat (Kohen et Nyska, 2002). C'est une enzyme qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire, empêchant ainsi la formation du radical hydroxyle (Stocker et Keane, 2004).

La GPx catalyse la détoxification d'hydroperoxyde en présence de glutathion réduit (GSH) pour former le disulfure de glutathion (GSSG) et le produit de réduction de l'hydroperoxyde selon la réaction suivante:



La GPx agit en synergie avec la SOD puisqu'elles permettent l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acide gras polyinsaturés (Haleng *et al.*, 2007).

## 1.6.2. Antioxydants non enzymatiques

Pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) nocives, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants propres mais d'autres sont fournis par l'alimentation saine et équilibrée, riche en antioxydants, parmi ces molécules antioxydants exogènes, on trouve les vitamines E, C ainsi phytoconstituants des plantes tels que les polyphénols, les caroténoïdes et autres (Tato Rocha *et al.*, 1994).

### 1.6.2.1. Vitamines

L'acide ascorbique ou vitamine C est hydrosoluble et considéré comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Les aliments ayant la plus grande teneur en vitamine C sont les agrumes, les kiwis et les légumes (Gulcin, 2012). Il est localisé dans le cytosol et le fluide extracellulaire (Comhair et Erzurum, 2002). Elle empêche l'oxydation des 'light density lipids' (LDL) produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase), (Cuzzocrea *et al.*, 2001). La vitamine C peut directement réagir avec des ROS comme  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{O}_2^\bullet$ , (Comhair et Erzurum, 2002). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Singh *et al.*, 2005).

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , avec une activité antioxydante variable (Singh *et al.*, 2005). L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols qui est synthétisé par les plantes (Gulcin, 2012). La vitamine E se fixe aux membranes et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en captant un radical lipidique peroxyde ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Elle devient à son tour un radical moins actif que le  $\text{LOO}^\bullet$  et

pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000 ; Zelek *et al.*, 2010).

Les caroténoïdes sont une classe de pigments naturels présents principalement dans les fruits (Qian *et al.*, 2010) ; le bêta-carotène est le plus connu. Ils sont des précurseurs de la vitamine A. Ils sont capables d'inactiver l'oxygène singlet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

#### **1.6.2.2. Polyphénols**

Les polyphénols ou composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont des produits du métabolisme secondaire, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques les plus importants des plantes (Beta *et al.* 2005). Ils sont des molécules biologiquement actives (King et Young, 1999). Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées, en raison de leurs diverses activités comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antimicrobiens, antioxydants et anti radicalaires. Les polyphénols sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations. Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Bahorun, 1997 ; Cetkovic *et al.*, 2008).

#### **1.6.2.3. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont contenus dans certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Ces composés sont dérivés de deux sous-groupes distincts,

les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique et les acides hydroxybenzoïques, mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotique, antioxydant et anti-inflammatoire. Certains acides phénoliques possèdent des effets anticancéreux tel que l'acide férulique et l'acide caféique qui empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, et l'acide gallique qui inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats (Hale, 2003).

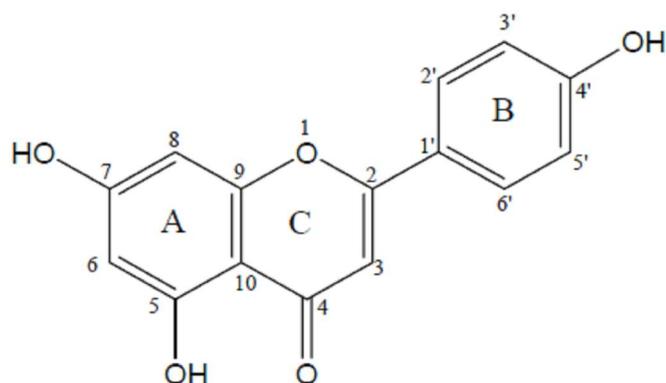
#### **1.6.2.4. Tannins**

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (Sereme *et al.*, 2010). Ils ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol leur permettant le piégeage des radicaux libres et d'inactivation des ions pro-oxydants. Des études ont montré que de nombreux tannins présentent des propriétés anti-inflammatoires, antifongiques, anti tumorales, antivirale et anti-diarrhéique (Maïga *et al.*, 2005).

#### **1.6.2.5. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005). Ils constituent les pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Havasteen, 2002). Les flavonoïdes exercent plusieurs rôles tels que la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV, et aussi un rôle dans la défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes (Bovy, 2004). Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de 15 atomes de carbone (figure 3) constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) reliés par

une chaîne en C3 et le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyranne (Vermerris et Nicholson, 2006).



**Figure 3 :** Structure de base des flavonoïdes (Vermerris et Nicholson, 2006).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000). Quatorze groupes différents ont été identifiés dont les plus importantes sont les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aures et les anthocyanes (Harborne et Williams, 2000 ; Kuresh *et al.*, 2002). Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire (Julies et Christin, 2002).

Les flavonoïdes possèdent une forte activité antioxydante qu'est le principe de plusieurs activités biologiques douées par ces molécules (Saija *et al.*, 1995), qui sont attribuées à leur capacité de piéger directement les RL, de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des ROS *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss est d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases (Wong, 2006).

### a. Piégeage direct des radicaux libres

L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante des flavonoïdes. Ce mécanisme est lié à leur structure et principalement à l'arrangement des groupements hydroxyles (Sokol *et al.*, 2007). Les flavonoïdes hydroxylés (FLOH) sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles (FLO<sup>•</sup>) moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction (Amic *et al.*, 2003) :



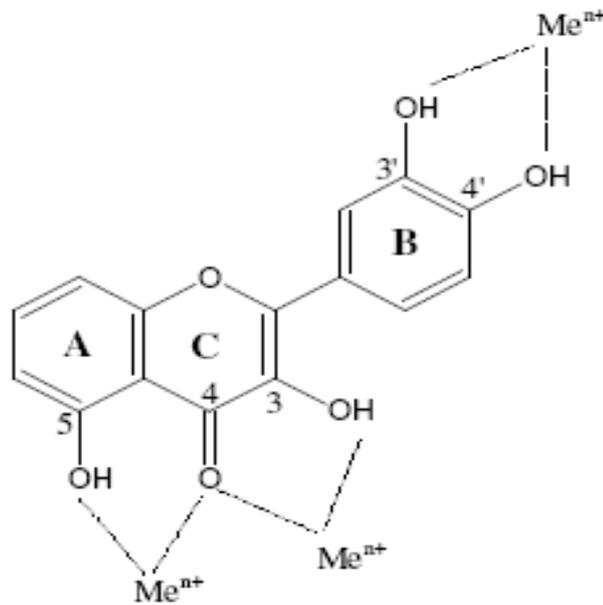
Cette réaction donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO<sup>•</sup>) qui va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R<sup>•</sup>. En outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs. (Amic *et al.*, 2003)



### b. Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être potentiellement dangereux. (Tiwari, 2001). Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes sont considérés également comme de bons chélateurs des ions métalliques. Ils peuvent facilement chélater les

ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntic, 2007). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques présentés sur la (figure 4).



**Figure 4:** Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ), (Tiqwari, 2001).

### c. Inhibition de la xanthine oxydase

De multiples systèmes enzymatiques sont responsables de la production des ROS. Ces enzymes incluent la xanthine oxydase (XO), enzyme clé du métabolisme des purines (Pietta, 2000). Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR isolés des plantes. Les études ont montré que les flavonoïdes inhibent la XOR de manière compétitive (Lin *et al.*, 2002 ; Boussoulim *et al.*, 2015). Des études menées sur l'inhibition de la XO par les flavonoïdes ont montré théoriquement l'existence de similarités structurales entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau puranique de l'hypoxanthine et la xanthine (Rastelli *et al.*, 1997).

---

## 2. Inflammation et anti-inflammatoires

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression. Le rôle de cette réponse inflammatoire est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus. Elle permet donc de maintenir l'intégrité du «soi». L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (Ashley *et al.*, 2012). Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. Ce processus comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement par de la fièvre et une altération de l'état général du tissu (Das, 2011).

La réaction inflammatoire est classée en deux catégories : l'inflammation aiguë et chronique. L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), qui est médiée par l'activation du système immunitaire (Lin et Karin, 2007). Elle est caractérisée par sa durée limitée dans le temps (quelques minutes à quelques jours) (Dorward *et al.*, 2012). L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (figure 5), (Weill *et al.*, 2003).

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé. Elle

est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années (Rankin, 2004), et être à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, et la goûte (Das, 2011).

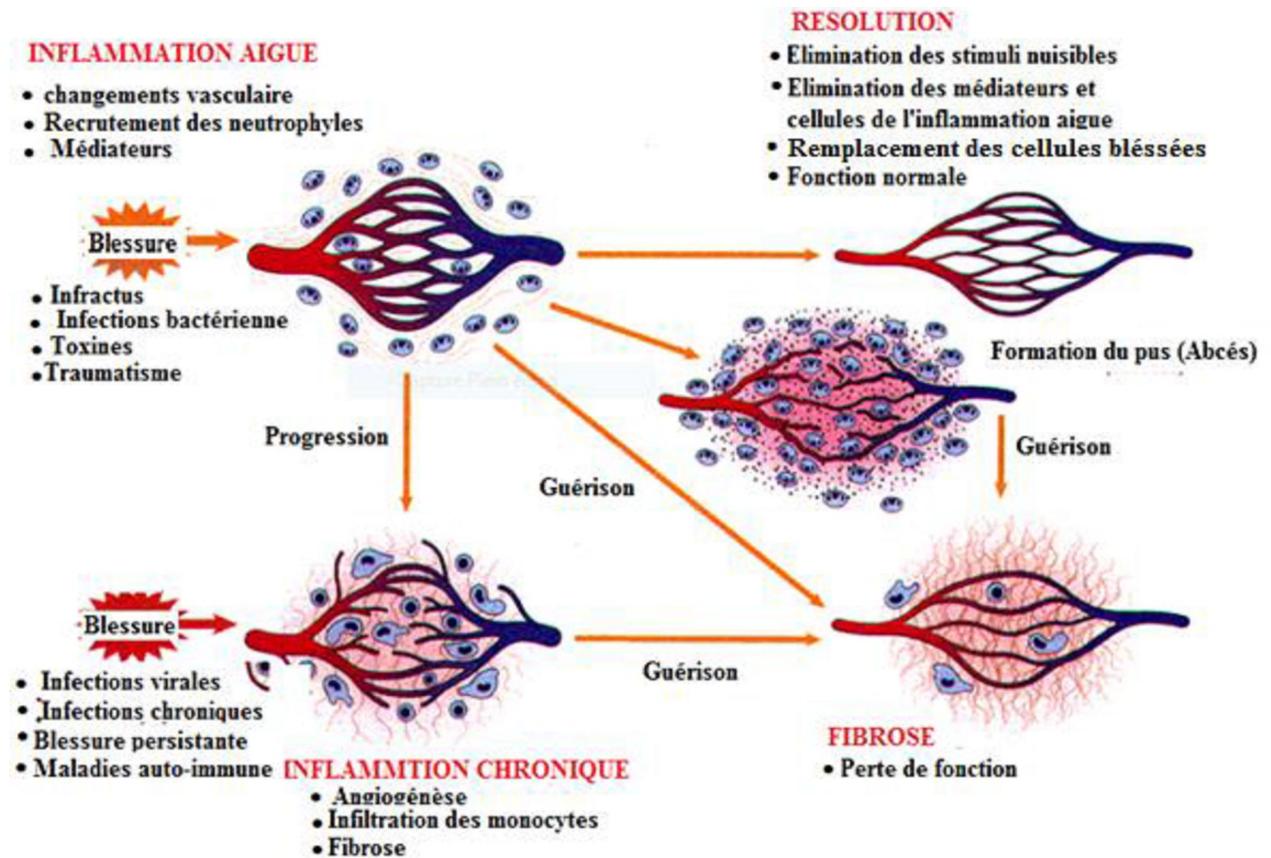


Figure 5. Evolution de l'inflammation aiguë (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.1. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium, augmentent l'agrégation des plaquettes (Techer, 2013). Le tableau 3 résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs de l'inflammation.

**Tableau 3** : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires (Rankin, 2004; Male *et al.*, 2007 )

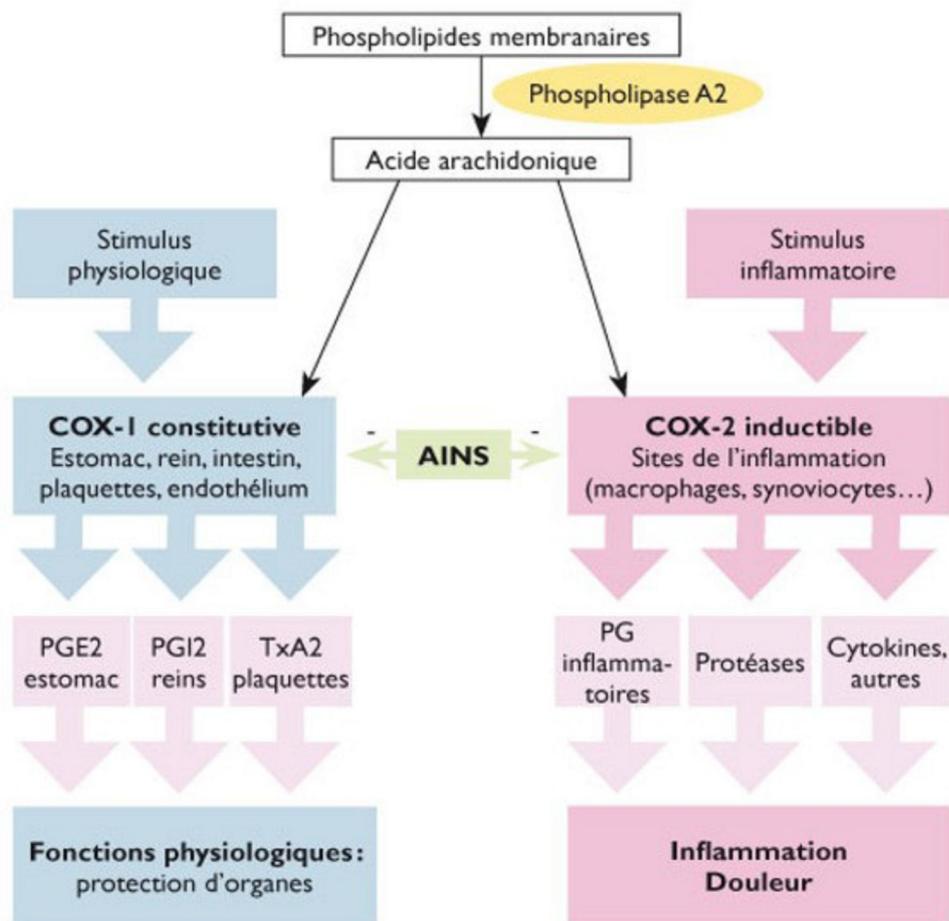
Médiateurs	Origine	Actions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la broncho constriction, l'agrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Cytokines	Lymphocytes et macrophages	Médiateurs de la communication intercellulaire, qui agissent à faible concentration, généralement localement par action autocrine et paracrine grâce à la fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité.

## 2.2. Anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou stéroïdien (corticoïdes), (Das, 2011), Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes et des antihistaminiques (Tricot et Jouzeau, 2014).

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande

hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la production des prostaglandines (Bidaut-Russell, 2001). Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), (figure 6), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout générées dans des conditions inflammatoires (Shaikh *et al.*, 2016).



**Figure 6 :** Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Demoly, 2007).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes, dérivés synthétiques de la cortisone sont de puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et

antiallergiques. Ces corticoïdes représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Payne et Adcock, 2001). Ils ont néanmoins l'inconvénient de réduire la défense de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (hypertension artérielle, dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère gastroduodéal...) ou chroniques tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003 ; Strehl *et al.*, 2011).

Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (hypersensibilité), (Benavente *et al.*, 2008; Conforti *et al.*, 2008). Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et les cytokines pro-inflammatoires. L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant les mastocytes. De nombreuses études ont indiqué que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire ( De medina *et al.*, 2009 ; Soro *et al.*, 2015 ; Aichour *et al.*, 2016 ).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse des prostaglandines telles que la cyclooxygénase (Gonzalez *et al.*, 2007 ; Boussoualim *et al.*, 2015). Une étude portant sur l'astragaline, la fisetine, le kaempferol, la myricétine, la quercétine et la rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de constater que toutes ces molécules, hormis l'astragaline, inhibaient

la sécrétion de l'histamine (Park *et al.*, 2008). De même, dans la famille des stilbènes, le resvératrol a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (Renaud, 2011).

### 2.3. Anti-inflammatoires naturels

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire et antioxydant d'un grand nombre de plantes utilisées en médecine traditionnelle ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs substances naturelles extraites de ces plantes. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant par exemple l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Dowiejua et Zeitlin, 1993).

- ✓ Certains constituants de *Zingiber officinale*, largement utilisé en médecine asiatique et arabe pour traiter les inflammations et les rhumatismes, inhibent la production du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005).
- ✓ *Harpagophytum procumbens*, plante issue de la médecine traditionnelle africaine, réduit significativement l'œdème de la patte induit par le carragénine (Catelan *et al.*, 2006). L'activité anti-inflammatoire de *H. procumbens* est peut être due à sa capacité d'inhiber la synthèse des eicosanoïdes et la production du TNF- $\alpha$  par les monocytes humains ou à son pouvoir de réduire la production de la myelopéroxydase par les neutrophiles (Setty et Sigal, 2005).
- ✓ *Curcuma longa* contient des polyphénols qui inhibe la production de la prostaglandine E2 et l'expression de la cyclooxygénase 2 (Madden *et al.*, 2009). Ce polyphénol inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la production du NO et l'expression de l'enzyme NO Synthase (NOS) inducible (Mathy *et al.*, 2007).

- ✓ *Urtica dioica* est une plante largement utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement d'eczéma et les douleurs arthritiques (Lin *et al.*, 2006).
- ✓ *Zygophyllum gaetulum* est largement utilisée en médecine traditionnelle pour des indications thérapeutiques très variées, comme les affections gastro-intestinales, hépatiques, antidiabétiques (Bellakhdar, 1997) et principalement comme anti-inflammatoire (Ait El Cadi *et al.*, 2012).
- ✓ La *Matricaria pubescens* a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter l'estomac douloureux, le syndrome d'intestin irritable et comme une aide douce de sommeil. Elle est aussi utilisée pour traiter des maladies inflammatoires aiguës et chroniques. De ce fait, Bouden *et al.*, (2017) a démontré que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* présente une efficacité sur l'œdème aigue et chronique de la patte des souris induit par la carragénine, et des rats induit par le collagène type II.
- ✓ *Teucrium polium* est également très utilisée pour le traitement des œdèmes. Son effet anti-inflammatoire revient à ces composés phénoliques tels que les flavonoides, l'acide phénolique et les tannins qui inhibent la synthèse de prostaglandines au niveau périphérique et la formation d'œdème (Krache *et al.*, 2018).
- ✓ *Capparis spinosa* est une plante largement utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement des douleurs arthritiques, L'écorce des racines à un pouvoir analgésique, Il est employé aussi dans le traitement du mal de dents. Aichour *et al.* (2018) ont rapporté que le câprier possède un effet anti-inflammatoire, du fait que, la richesse du plante en poly phénols, flavonoïde, les alcaloïdes, stéroïdes et saponines a inhibé considérablement l'œdème de la pate induit par la carragénine.

### **3. Analgésiques et antalgiques**

La douleur est un phénomène pathologique résultant de l'activation des récepteurs nociceptifs par une variété de stimuli douloureux. Elle possède des récepteurs appelés nocicepteurs, des voies de conduction du message nociceptifs et des centres supérieurs. La définition actuelle de la notion de la douleur a été rendue officielle par l'ASP (International Association for the Study of Pain): « la douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion » (Le Bars *et al.*, 2001). La durée d'évolution permet de distinguer deux sortes de douleurs. La douleur aiguë est une douleur immédiate, et généralement brève. Elle est causée par une stimulation nociceptive de l'organisme. Ce type de douleur doit être traité dès l'aperçu du signal d'alarme. La douleur chronique est une douleur d'intensité variable qui a une durée d'évolution de plus de 3 mois. Elle persiste et devient rebelle aux antalgiques usuels. Au stade de la douleur chronique, elle représente pour le patient l'essentiel de sa maladie avec un fort impact psychologique et social (Laroche, 2014).

Les médicaments analgésiques standards utilisés dans la gestion et le traitement de la douleur sont réparties en trois catégories, à savoir; opioïdes, analgésiques non morphiniques et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Portenoy, 2000 ; Rossiter, 2012).

#### **3. 1. Analgésiques opioïdes**

Un opioïde est une substance opiacée psychotrope de synthèse ou peptidique dont les effets sont similaires à ceux de la morphine sans y être chimiquement apparentés. Les analgésiques opioïdes sont d'efficacité faible, intermédiaire ou haute, et sont utilisés pour le soulagement de la douleur légère, modérée ou chronique sévère (Rang *et al.*, 2012; Rossiter, 2012). Parmi les opioïdes à faible efficacité, la codéine utilisée pour soulager la douleur

légère à modérée, et le dextropropoxyphène qui a été retiré du marché en raison du risque accru à des événements cardiovasculaires indésirables. Les opioïdes à haute efficacité sont représentés par la morphine, un analgésique opioïde précieux utilisé pour soulager les douleurs sévères, et la méthadone qui a une longue durée d'action (Rossiter, 2012).

Les substances morphiniques agissent comme des agonistes en inhibant la transmission des influx nociceptifs par la corne dorsale, supprimant ensuite les réflexes spinaux nociceptifs. Cela se produit sur les récepteurs opiacés dans le système nerveux central et d'autres tissus de liaison (McCarver, 2001). Les récepteurs opioïdes sont largement distribués dans le système limbique, le thalamus, le striatum, l'hypothalamus, le mésencéphale et la moelle épinière (Rang *et al.*, 2012).

### **3.2. Analgésiques non morphiniques**

Les analgésiques non morphiniques regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques des douleurs dont le mécanisme d'action est indépendant des récepteurs opioïdes (Perrot *et al.*, 2013). Ils agissent principalement par inhibition de la cyclooxygénase, une enzyme responsable d'une cascade de réactions à l'origine, entre autres, de la douleur. L'acide acétylsalicylique permet la prévention de la sensibilisation des terminaisons nerveuses nociceptives aux substances algogéniques (Webster et Jordan, 1989; Rang *et al.*, 2012).

### **3.3. Analgésiques d'origine végétale**

Les plantes restent une source très importante pour la recherche de nouvelles molécules analgésiques. Leurs extraits sont devenus une alternative efficace pour contrecarrer les effets secondaires potentiels et la faible efficacité des médicaments chimiques. En pratiques traditionnelles, plusieurs plantes trouvent leur utilisation sous différentes formes de recettes

comme analgésique. Ainsi, les feuilles fraîches et écorces de *Cassia alata* pilées et enroulés autour de la tête ont une vertu antalgique. Les feuilles d'*Ipomoea asarifolia* (Convolvulacée) sont recommandées, selon diverses modalités, pour les névralgies, les céphalées et les douleurs articulaires. Le macéré de feuilles de *Solanum incanum* (Solanacée) est employé en association avec celui de *Piliostigma reticulatum* dans le traitement de céphalée et névralgies dentaires. En réalité la solasonine isolée de *Solanum incanum*, est un produit assez toxique, mais analgésique dans les migraines, les gastralgies et dans les douleurs fulgurantes du tabès.

## **4. Immunomodulation**

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la défense de l'organisme. Il a la capacité de reconnaître les agents étrangers, mettant en jeu deux types de défenses: les défenses non spécifiques, naturelles ou innées et les défenses spécifiques ou adaptatives. La modulation du système immunitaire (immunomodulation ou immunostimulation) est devenue un aspect important de la recherche anti-infectieuse (She *et al.*, 1988). En effet, l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire peut engendrer des conséquences néfastes pour l'hôte.

L'immunomodulation est un processus de modification de la réponse immunitaire, par l'administration d'un médicament ou d'une substance active qui peuvent stimuler, supprimer ou moduler les composantes de système immunitaire inné ou adaptatif. (Ganju *et al.*, 2003). L'immunomodulantes est une substance d'origine naturelle ou synthétique qui peut moduler les composantes du système immunitaire par une stimulation spécifique ou un effet suppresseur (Juyal et Singla, 2001). Les adjuvants naturels, les composés synthétiques et les molécules biologiques tels que des anticorps et les cytokines sont utilisées comme immunosuppresseur ou immunostimulants (Sagrawat et Khan, 2007).

### **4.1. Immunomodulateurs**

Le système immunitaire est l'un des systèmes biologiques les plus complexes du corps. Le corps humain est constamment exposé à une série des facteurs de stress, qui affaiblissent la fonction de la réponse immunitaire générant l'immunosuppression. De plus, il n'existe aucun vaccin efficace contre certaines infections et maladies graves comme le VIH, le paludisme et la méningite (Commission Européenne, 2008). Par conséquent, la stimulation non spécifique du système immunitaire est considérée comme très utile lorsque le système immunitaire de l'hôte est altéré. Il existe deux types d'immunomodulateurs en fonction de leurs modes

d'action: les immunosuppresseurs qui suppriment l'activité du système immunitaire et les immunostimulateurs qui stimulent son activité (Odette *et al* , 2013).

Les immunostimulants ou immunostimulateurs sont des médicaments ou des composés qui activent le système immunitaire de l'homme et les animaux pour la prévention des maladies et l'amélioration de la résistance naturelle du corps à divers infections virales et bactériennes (Shahbazi et Bolhassani, 2016). Les immunostimulants ont une action plus générale sur le système immunitaire et peuvent modifier simultanément plusieurs réponses immunologiques (Waiser et Weis, 1999). Elle conduisent principalement à une activation des mécanismes de défense immunologiques (Wagner *et al.*, 1999 ; Nagarathna *et al.*, 2013). Ces mécanismes sont liés à la fonction des macrophages, du système du complément, des granulocytes, des cellules 'Natural killer' (NK), des lymphocytes et également à la production de molécules effectrices telles que les cytokines produites par les cellules activées (Jayathirtha et Mishra, 2004). De nombreux troubles pourraient être traités à l'aide de certains immunostimulants tels que les maladies auto-immunes, infections virales et cancer (Shahbazi et Bolhassani, 2016).

D'autre part les immunosuppresseurs sont utilisés dans les maladies inflammatoires où l'activité immunitaire est supposée excessive comme le cas dans la polyarthrite rhumatoïde (Flipo *et al.*, 1993). Dans des situations où la réponse immunitaire est nuisible, telles que, le rejet de greffe, les allergies immédiate et réactions immunitaires d'hypersensibilité de type retardé (DTH), (Pereira *et al.*, 1999; Juyal et Singla, 2001).

## **4.2. Immunomodulateurs naturels**

Les vertus thérapeutiques des plantes sont dus à la présence de certains composants bioactifs ayant plusieurs propriétés thérapeutiques telles que des propriétés anti-

inflammatoires, antihistaminiques, anti tumorales, analgésiques et immunomodulatrices (Wasser et Weis, 1999; Scartezzini et Speroni, 2000). Parmi ces principes bioactifs, les polysaccharides ont reçu, en raison de leurs propriétés immunomodulatrices. Plusieurs polysaccharides d'origine végétale ont en effet la particularité de stimuler les défenses de l'hôte en favorisant la maturation, la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires (Wasser, 2002). De nombreux travaux effectués *in vitro* ont permis de mettre en évidence un effet immunosuppresseur des acides gras ajoutés au milieu de culture des lymphocytes avant stimulation par un mitogène. Tsang (1977) fut le premier à décrire l'effet immunosuppresseur de l'acide linoléique. Depuis cette date, de nombreux travaux ont montré que les acides gras polyinsaturés inhibaient *in vitro* les fonctions des lymphocytes humains (Verlengia *et al.*, 2003 ; Verlengia *et al.*, 2004). D'autre étude menée *in vivo* sur la fraction riche en polysaccharides obtenue à partir d'un extrait aqueux à chaud de la racine d'*Anacyclus pyrethrum* à montre une activité immunostimulante chez des rats (Bendjeddou *et al.*, 2003) . Les isoflavones, les indoles, les phytostérols, sesquiterpènes, des alcaloïdes, glucanes et tanins, sont des immunomodulateurs potentiels. Il a également été observé que les dérivés de flavonoïdes présentent un effet remarquable sur le système immunitaire (Patwardhan et Gautam, 2005).

Les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle ont attiré l'attention de beaucoup de chercheurs en raison de leur action sur le système immunitaire (Juyal et Singla, 2001; Sagrawat et Khan, 2007). Les exemples des plantes potentiellement immunomodulatrices sont ; *Nigella sativa*, *Aloe vera*, *Curcuma longa* et *Eclipta alba*

*Nigella sativa* est utilisé depuis l'antiquité dans plusieurs pays dans la cuisine et en médecine folklorique. El-Kadi et Kandil (1987) ont montré que la graine de nigelle possède des propriétés immunomodulatrices *in vivo* sur les lymphocytes T. Plus tard d'autres études

ont confirmé que la nigelle agissait à la fois sur l'immunité innée et acquise, donc qu'elle pouvait intensifier la réponse immunitaire (Salem, 2005). Pour l'immunité acquise, des sujets ont été traités pendant quatre semaines avec de l'huile volatile de nigelle ; une augmentation de l'activité des cellules NK ainsi qu'une croissance du nombre de lymphocytes T CD4 et CD8 a été observée (Salemal *et al.*, 2000).

*Curcuma longa* (le curcuma) appartient à la famille des Zingiberaceae. La curcumine, un composant de *C. longa*, module la croissance et les réponses cellulaires de différents types cellulaires du système immunitaire (Gupta et Ghosh, 1999). En effet, l'administration alimentaire de *Curcuma longa* augmente le nombre total de globules blancs et le taux d'anticorps circulants, ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages de souris (Antony *et al.*, 1999), *Aloe vera* (Aloeaceae) est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés cicatrisantes et ses effets immunomodulateurs. L'acémannane, un saccharide de cette plante active les macrophages, augmente la sécrétion des cytokines et stimule la production des lymphocytes T cytotoxiques (Choi et Chung, 2003).

*Eclipta alba* (Asteraceae) également appelé (Bhringraj), utilisée comme poudre séchée à une large gamme d'utilisations dans la médecine traditionnelle. Une étude menée par Jayathirtha et Mishra (2004) a montré la capacité d'*E. alba* pour induire une activité immunomodulatrice chez des souris albinos en augmentant de manière significative l'indice phagocytaire, le titre d'anticorps et le nombre de globules blancs dans le sang.

Les substances naturelles présentant une activité immunostimulante potentielle peuvent être classées selon leur poids moléculaire en deux catégories; les immunostimulants de haut poids moléculaire (les polysaccharides) et les immunostimulants de faible poids moléculaire (les terpénoides et les composés phénoliques), (Wagner, 1999).

La richesse du genre *Capparis* en polyphénols et en flavonoïdes explique en grande partie l'effet immunomodulateurs de leurs extraits. En effet, Aichour *et al.*, (2016) ont trouvé que le traitement des souris par des extraits méthanoliques de *Capparis spinosa*, produit une augmentation significative du titre d'anticorps anti-globules rouges de moutons, de la réponse d'hypersensibilité retardé (DTH), et du nombre des lymphocytes T chez les souris.

#### 4.2.1. Polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules biologiques largement répandues dans la nature. Ils peuvent avoir des effets immunomodulateurs (Kidd, 2000). Ce sont l'une des principales classes de substances bioactives des champignons, des algues et des plantes supérieures (Joseph *et al.*, 2013). La plupart des polysaccharides d'origine végétale sont relativement non toxiques, ne provoquent pas d'effets secondaires graves et présentent une large gamme d'activités pharmacologiques. Ces molécules bioactives sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques, supposés se produire par l'intermédiaire de la stimulation des macrophages et de la modulation du système du complément (Schepetkin et Quinn, 2006). Ils sont principalement reconnus pour leurs propriétés immunomodulatrices (Zhang *et al.*, 2013).

Les polysaccharides acides d'*Angelica sinensis* ont montré un effet immunomodulateurs sur les macrophages. Ils stimulent les macrophages à produire l'oxyde nitrique (NO) par l'induction de l'expression du gène iNOS. Le traitement des macrophages avec des différentes concentrations des polysaccharides acides conduit à l'augmentation de l'activation des enzymes lysosomales et la sécrétion de facteur de nécrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), (Yang *et al.*, 2007).

### 4.2.2. Terpenoides

Les terpenoides sont connus comme des composants majeurs des huiles essentielles végétales. Ces derniers constituent principalement des mono terpènes et des sesquiterpènes et sont supposés être responsables de nombreuses activités biologiques telle que l'activité anti-inflammatoires. Ces activités biologiques semblent être médiées par des processus immunologiques (Hall *et al.*, 1979). Les saponosides triterpéniques présentent une double action sur le système immunitaire; action immunodépressive de l'immunité acquise en diminuant le nombre de lymphocytes circulants et en inhibant la synthèse des cytokines impliquées dans la production d'immunoglobulines. Toutefois, ils peuvent stimuler l'immunité humorale par augmentation de la prolifération des lymphocytes et du taux d'anticorps et par production des cytokines de la voie Th2 (Brunton, 1999).

### 4.2.3. Lectines

Les lectines sont des sucres de liaison, des protéines ou glycoprotéines spécifiques des glucides, qui agglutinent les cellules ou précipitent les glycoconjugués. Les lectines ont été découvertes dans les plantes et ont donc été appelées phytohémagglutinines (PHA). Elles se lient essentiellement aux lymphocytes provoquant la mitose. Les lectines possèdent des propriétés immunostimulante de l'immunité innée en activant la synthèse de TNF $\alpha$  et d'IL-1 et de l'immunité humorale en activant la voie Th2.(Chihara *et al.*, 1970). Les lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar, *et al.* 2005). Le lentinane, un polysaccharide de levure, isolé à partir de *Lentinus edodes*, est l'un des polysaccharides les mieux étudiés. Ce composé présente essentiellement une activité antitumorale en activant les lymphocytes T (Chihara *et al.*, 1970). Le pachymaran de *Poria cocos* montre une bonne activité immunomodulatrice (Narui *et al.*, 1980).

#### 4.2.4. Flavonoïdes

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton, 1996). Ils peuvent être sous forme de flavonoïdes libres (apigénine, lutéoline, hispiduline, quercétine...) ou sous forme d'hétérosides de flavonoïdes (glucoside d'apigénine, de lutéoléine, d'hispiduline, de quercétine, de kaempférol...) Parmi les composés phénoliques, le cleistanthin isolé à partir des lignanes de *Cleistanthus collinus* a été trouvé pour augmenter le nombre de granulocytes chez les rats (Rao et Nair, 1970). Les flavonoïdes sont immunostimulants de l'immunité acquise et antioxydants (Chiang *et al.*, 2003).

## 5. *Asphodelus microcarpus*

### 5.1. Description et classification botanique

Le genre *Asphodelus* regroupe plus de 20 espèces largement répandues dans la région méditerranéenne (Fournier, 1947). *Asphodelus microcarpus* connue sous le nom de «Barouag» à l'est de l'Algérie, fait partie de ce genre. C'est une plante vivace sous forme d'un arbrisseau de 1 mètre de hauteur environ. Les feuilles longues et étroites ayant une largeur de 1 à 4 cm et une longueur de 50 à 60 cm, creusées en gouttière triangulaire et groupées en rosettes à la base de la tige. Les fleurs sont de 35 mm de diamètre, avec des 6 pétales blancs allongé composé de filament blanc et une anthère orange, et un ovaire centrale et supérieure enfermée par une capsule de couleur orange saumon. *Asphodelus microcarpus* possède des fruits sous forme de petites capsules un peu rétrécies à la base à valves minces, elliptiques à bords plans (figure 7). Les racines sont fortement renflées en forme des tubercules cylindrique (Kaddem, 1990).



**Figure 7** : Photographie d'*Asphodelus microcarpus* (Gettyimages, 2019)

La taxonomie d'*Asphodelus microcarpus* selon Ghaleb (1987) est présentée dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Classification botanique d'*Asphodelus microcarpus* (Ghaleb, 1987)

<b>Embranchement</b>	<b>Spermaphytes</b>
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Monocotylédones
<b>Ordre</b>	Liliiflorae
<b>Famille</b>	Liliaceae
<b>Genre</b>	<i>Asphodelus</i>
<b>Espec</b>	<i>Asphodelus microcarpus</i> salzm and viv
<b>Synonymie</b>	<i>Asphodelus aestivus</i> brot
<b>Nom commun</b>	Asphodèle
<b>Noms vernaculaires</b>	Barouag (dans l'est algérien) Balouaz (dans le centre algérien) Ighri (chez les berbères)

## 5.2. Utilisations traditionnelles d'*A. microcarpus*

En médecine traditionnelle *Asphodelus microcarpus* est utilisée dans tout le nord d'Afrique. L'*Asphodèle* est surtout utilisé en médecine traditionnelle algérienne, pour le traitement des otites, avec les racines fraîches qui sont macérées dans l'huile d'olive (Kaddem, 1990 ; Kitaz, 2017). Les racines sont également utilisées pour leurs propriétés antiarthritiques, mycoses cutanées, d'abcès, eczéma, ectoderme (maladies de la peau), jaunisse et psoriasis et pour traiter la douleur de l'oreille (Kaddem, 1991 ; Ali-Shtayeh *et al.*, 1999 ; Zellagui *et al.*, 2013 ; Chermat et Gharzouli, 2015). La poudre de la partie aérienne est

utilisée localement pour soulager les douleurs dentaires (Sarri *et al.*, 2014), ou par inhalation pour traiter de nombreuses maladies telles que l'asthme, et les maladies pulmonaires (bronchite) (Ljubuncic *et al.*, 2005 ; Chermat et Gharzouli 2015; Al Kayali *et al.*, 2016). La décoction des feuilles est utilisée pour leurs propriété diurétique (tend à augmenter le flux de l'urine) (Sarri *et al.*, 2014). les tiges et les racines sont utilisées pour traiter la mauvaise digestion (Fakchich *et al.*, 2014). *Asphodelus microcarpus* est utilisée pour traiter différents types de maladie chronique (Al Kayali *et al.*, 2016).

### 5.3. Composition chimique

L'étude phytochimiques effectuée sur plusieurs espèces d'*Asphodelus* a révélé la présence d'un grand nombre de composés chimiques y compris les huiles essentielles, les flavonoides, les acides phénoliques, les terpenoides, les anthraquinones (sous forme libre ou sous forme de glycoside), et les alcaloides (Hammouda *et al.*, 1971 ; Zellagui *et al.*, 2013 ; Malmir *et al.*, 2018). Il a été rapporté que les racines contiennent principalement des dérivés de l'anthraquinone tels que le chrysophanol et l'aloé-émodyne, les triterpénoïdes et les dérivés du naphthalène, tandis que la partie aérienne contient des flavonoïdes tels que la lutéoléine, l'isovitexine et l'isoorientine, des acides phénoliques et peu des anthraquinones. des acides gras, notamment les acides myristique, palmitique, oléique, linoléique et linoléique, ont été trouvés dans les graines et les racines (Malmir *et al.*, 2018). De même, Zellagui et ses collaborateurs (2013) ont montré que l'huile essentielle d'*Asphodelus microcarpus* est un complexe mixte contenant 51 composés, dont 49 sont identifiés. L'huile d'*A. microcarpus* représentant 99,8% de l'huile totale. Les principaux constituants de l'huile essentielle étaient le Germacrene D (68,3%), le Germacrene B (3,9%), le  $\alpha$ -Elemene (3,8%) et le Caryophyllene (3,3%). Les autres constituants ne présentent qu'une fraction mineure.

Les huiles essentielles d'*Asphodelus microcarpus* sont constituées principalement de composés de sesquiterpènes (83,6%) et de sesquiterpènes oxygénés (3,9%), tandis que les

monomères hydrocarbonés étaient à 0,5%. Au total, la composition en huiles essentielles d'*A. microcarpus* a été considérée comme une source très riche en sesquiterpènes. Les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont lutéoléine aglycones (Di Petrillo *et al.*, 2016).

#### **5.4. Activités biologiques**

Les analyses phytochimiques ont montré qu'*A. microcarpus* renferme un grand nombre de métabolites secondaires responsables des activités biologiques attribuées aux extraits de plantes médicinales. En effet, El-Ghaly (2017) a démontré que cette plante présente une activité antivirale. Des travaux récents ont montrées que l'extrait d'*Asphodelus microcarpus* possède une activité importante contre *E. coli*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* et *B. clausii* (Di Petrillo *et al.*, 2017). Les substances naturelles extraites d'*A. microcarpus* sont également d'importants agents antioxydants. En effet, l'extrait ethanolique des racines de la plante a montré une activité antioxydante dans divers modèles *in vitro*, d'où est suggérée leur utilisation potentielle dans les conditions pathologiques du stress oxydant. Les extraits de cette plante ont exhibé des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'œdème de la patte induit par la carrageenan (Razik *et al.*, 2016).

---

# **PARTIE PRATIQUE**

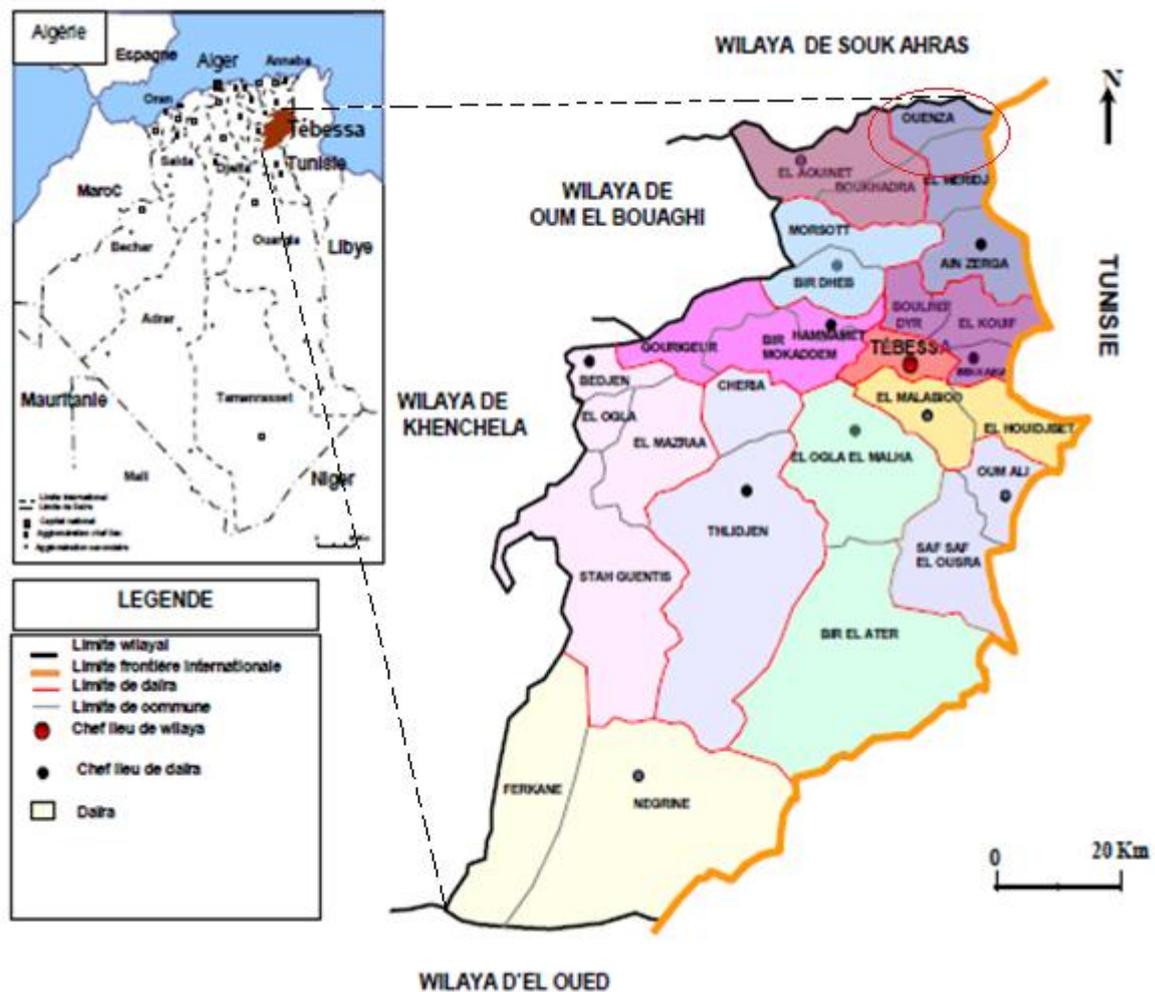
---

# **MATERIEL ET METHODES**

# 1. Matériels

## 1.1. Description et Choix des localités de l'enquête

L'enquête ethnobotanique a été effectuée dans la région de l'Ouenza et dans la wilaya de Tébessa qui est située à l'extrême Est des hauts plateaux à la frontière Algéro-Tunisienne. Elle est limitée au Nord par la wilaya de Souk Ahras, au Sud par la wilaya d'El Oued, à l'Est par la Tunisie et à l'Ouest par la wilaya d'Oum El Bouaghi et la wilaya de Khenchela (figure 8), (Bouabida *et al.*, 2012).



**Figure 8** : Carte du découpage administratif de la wilaya de Tébessa (ANAT, 2001).

L'enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales a été réalisée de Janvier à Mars 2016 à l'aide de questionnaires touchant une population de 73 personnes ayant entre 30 et 65 ans, (23 hommes et 50 femmes). Les informations sur les utilisations des plantes dans la pharmacopée traditionnelle ont été collectées à l'aide d'un questionnaire semi structuré à travers des conversations avec les gens qui ont la connaissance sur l'usage thérapeutique des plantes et aux vendeurs de plantes médicinales (herboristes). Deux sites d'enquête, la ville de Tebessa et la commune de l'Ouenza ont été choisis pour leur facilité d'accès et du fait que les guérisseurs traditionnels sont organisés et réputés pour avoir une bonne connaissance sur l'utilisation des plantes médicinales. Les informations demandées portent sur les noms locaux de toutes les plantes à usage médicinal, les parties utilisées, les modes de préparations et d'utilisations.

## **1.2. Matériel végétal**

La plante d'*Asphodelus microcarpus* a été récoltée au mois de Juin 2016, dans la région de Taoura, Souk Ahras au nord-est d'Algérie. L'identification botanique a été faite par Pr. Laouer H. (Université Ferhat Abbas Sétif-1, Algérie). La plante a été divisée en plusieurs parties : la partie aérienne entière, les racines, les feuilles et les tiges-fleurs. Ces parties ont été bien nettoyées et séchées à l'ombre et à température ambiante. Après broyage, les poudres obtenues ont été mises dans des bocaux en verre hermétiquement fermés jusqu'à leur utilisation.

## **1.3. Animaux**

Les animaux utilisés dans l'étude *in vivo* sont des rats *Wistar albino* femelles pesant entre 150 et 200 g et des souris *Swiss albino* mâles pesant entre 25 et 30 g, issus de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger). Ils étaient hébergés dans des cages avec accès libre à l'eau et à

l'alimentation fournie par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El Kseur (Bejaia). Après une semaine d'adaptation, les animaux ont été pesés et marqués avant les traitements.

#### **1.4. Sang de mouton**

Le sang provenant de mouton a été prélevé de la veine jugulaire externe de mouton dans l'abattoir local de la ville de Sétif. Le sang est collecté dans des flacons dans une solution d'Alsèver (glucose 2,05 g, chlorure de sodium 0,42 g, citrate de sodium 0,80 g, acide citrique 0,55 g, eau distillée qsp 100 mL) et utilisé pour la préparation des globules rouges.

## **2. Méthodes**

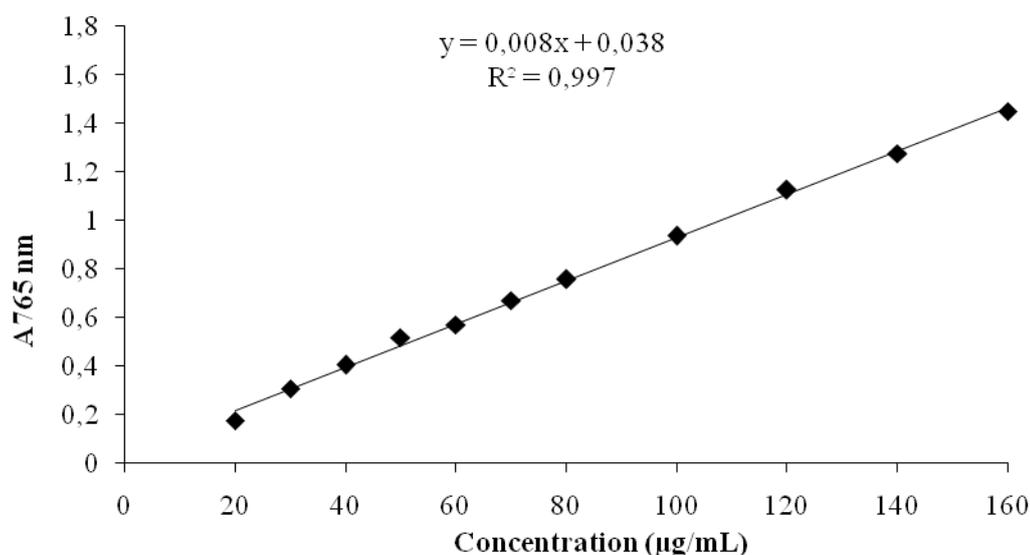
### **2.1. Préparation des extraits**

Les extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus* (EM) sont préparés selon Arrar *et al.* (2013). Une pesée de 500 g de la poudre de chaque partie de la plante a été mise dans 5 L de méthanol pendant 7 jours à température ambiante à l'abri de la lumière. L'extraction a été répétée une fois pendant 5 jours. Après filtration le premier et le deuxième filtrat ont été mélangés. L'extrait est soumis à une évaporation rotative à 40°C (rotavapor Büchi) puis séché à l'air libre pour obtenir l'extrait brut méthanolique (EM).

Les extraits aqueux d'*A. microcarpus* (EA) ont été préparés selon Benzidane *et al.* (2013). Brièvement, 10-20 g de poudre sont incubés dans 200 mL d'eau distillée bouillie pendant 20 min. Après filtration, les extraits récupérés sont soumis à une centrifugation à 3000 rpm (Hettich) pendant 10 min. Une poudre marron claire pour les racines et marron foncée pour les autres parties de la plante ont été obtenus après séchage du surnageant. Les extraits aqueux ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

## 2.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des différents extraits d'*Asphodelus microcarpus* est estimée selon la méthode au Folin-Ciocalteu (Arrar *et al.*, 2013). Le principe de la méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ ) / phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm et l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Un mL de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200  $\mu$ L d'extrait avec des concentrations de 1,25, 2,5 et 5 mg/mL, ou d'acide gallique (standard), préparé dans le méthanol (extraits méthanoliques) et dans l'eau distillée (extraits aqueux). Après 4 min, 800  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160  $\mu$ g/mL) et exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g), (figure 9).



**Figure 9** : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

### 2.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

L'application de la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), est fréquemment utilisée pour estimer la teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanoliques des différentes parties des plantes médicinales. Le protocole consiste à mettre dans un tube à essai 1 mL de chaque extrait *Asphodelus microcarpus* ou du standard (avec dilution convenable) et ajouter 1 mL de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 430 nm (Baghiani *et al.*, 2012). La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est alors exprimée en mg d'équivalente rutine par g d'extrait (mg ER/g), (figure 10).

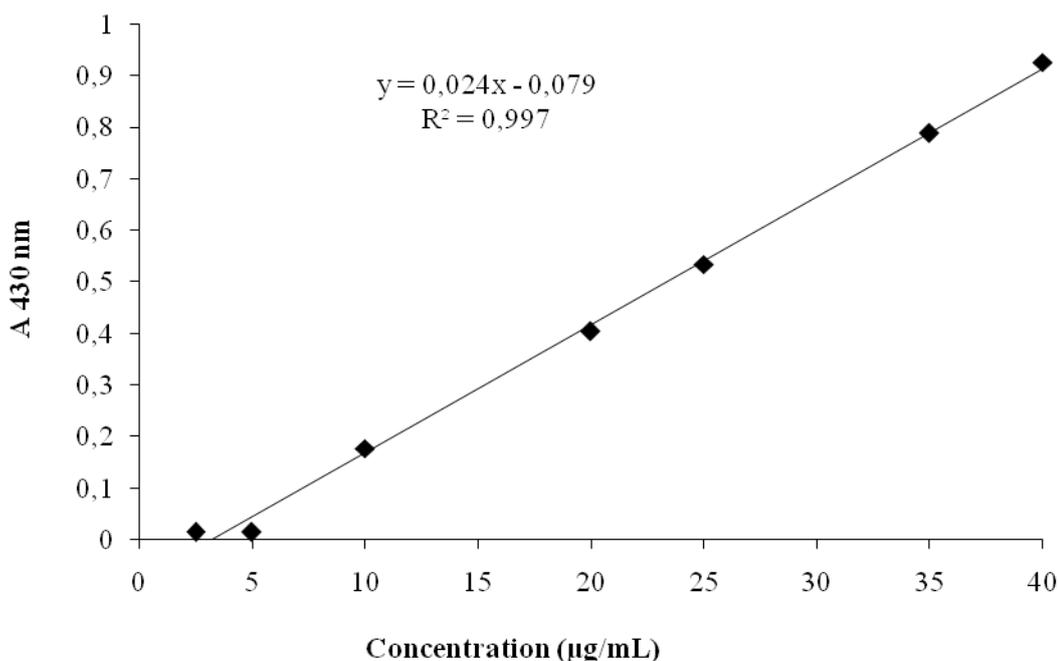


Figure 10 : Droite d'étalonnage de la rutine.

### 2.4. Caractérisation des composés phénoliques par HPLC/MS/MS

La détermination des composés phénoliques dans les différents extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus* est effectuée par chromatographie liquide à haute performance

couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS/MS) au centre de recherche pharmaceutique, 'Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan'. Les extraits méthanoliques (1 mg/mL) sont dissouts dans le méthanol puis 20 µL de chaque extrait sont injectés dans une colonne de type SB-C18 (4.6 x 100 mm). La phase mobile est constituée de deux éluant : l'acétonitrile à 100% et l'acide formique aqueux à 0,1%. Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 35 min. Le débit est de 1 mL/min et la température de la colonne est de 35°C. Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC/MS/MS est négatif, opérant avec le gaz de nitrogène à une température de 650°C et un débit de 4 ml/min, un voltage capillaire de 4500 V et un voltage de fragmentation de 70 V. Un détecteur UV à baratte de diodes à été utilisé pour balayer entre 200 et 400 nm afin d'évaluer le contenu en composés phénoliques individuels. Les échantillons élués et les étalons ont été détectés à 280 nm.

## 2.5. Evaluation de la toxicité des extraits

Le test de toxicité aigüe des extraits d'*A. microcarpus* à été réalisé selon la méthode décrite par l'Organisation de la Coopération Economique et Développement (OCDE, 2008). En bref, des souris males *Swiss* albino de 25 à 30 g de poids corporel préalablement mises à jeun pendant 16 h, ont été divisées en groupes de 5 souris par extrait. Une dose de chaque extrait (2000 mg/Kg) à été administrées par voie orale. L'observation des changements du comportement et des symptômes de toxicité (agitation, convulsions, anorexie, asthénie, diarrhée et mort) a été effectuée durant les quatre premières heures après l'administration de l'extrait puis pendant 14 jours.

## 2.6. Evaluation des activités antioxydantes

La mise en évidence *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits des différentes parties de la plante étudiée a été réalisée par la méthode du piégeage du radical DPPH<sup>\*</sup> (2,2'-

diphenyl-1-picrylhydrazyl), le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène, le test du pouvoir réducteur, la chélation des ions métalliques, le test de l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide)) et le test du radical hydroxyle.

### 2.6.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH

Le test DPPH a été utilisé pour évaluer l'activité anti-radicalaire des différents extraits d'*A. microcarpus*. Le radical DPPH a une couleur violette en raison de l'électron non apparié d'azote. Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphenyl picryl-hydrazyl en un composé jaune, le diphenyl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Villano *et al.*, 2007). Selon le protocole décrit par Zerargui *et al.* (2015), la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. Un volume de 50  $\mu$ L de chacune des différentes concentrations des extraits (0,25-80 mg/mL) ou du standard (quercétine) a été ajouté à 1250  $\mu$ L DPPH, le mélange était laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH était mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = 100 \times (A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}$$

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité du DPPH (IC<sub>50</sub>) exprimée en mg/mL.

### 2.6.2. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des différents extraits d'*A. microcarpus* est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration), par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Le protocole est réalisé selon Arrar *et al.* (2013). Une émulsion de  $\beta$ -carotène/acide linoléique est d'abord préparée dans un ballon en

mélangeant 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 mL de chloroforme, 25  $\mu$ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapor. L'eau distillée saturée en oxygène pendant 30 minutes (100 mL) est ensuite ajoutés à l'émulsion puis agitée vigoureusement. Un volume de 350  $\mu$ L d'extraits ou d'antioxydant de référence (Butyl Hydroxy Toluene : BHT) solubilisés dans du méthanol (2 mg/mL) est ajouté à 2,5 mL de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350  $\mu$ L de méthanol) est suivie à différents intervalles de temps : 1, 2, 3, 4, 6, 24 et 48 heures. L'activité antioxydante relative (AAR %) est calculée selon la formule :

$$\text{AAR \%} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoin}}) \times 100$$

### 2.6.3. Chélation du fer ferreux

L'activité de chélation de fer ferreux est basée sur le suivi de l'inhibition de la formation du complexe Fe(II) ferrozine. Le test a été réalisé en mélangeant 50  $\mu$ L de FeCl<sub>2</sub> (0,6 mM dans l'eau) et 900  $\mu$ L de méthanol à 500  $\mu$ L des extraits à différentes concentrations (0,045 - 20 mg/mL) ou de standard de (Ethylène diamine tétra acétique : EDTA). Le mélange est agité vigoureusement et laissé incubé à température ambiante pendant 5 mn. 100  $\mu$ L de ferrozine (5 mM) sont alors ajoutés à cette solution est secoué de nouveau. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance de la solution est mesurée à 562 nm (Le *et al.*, 2007). L'activité chélatrice est exprimée en utilisant l'équation ci-dessous :

Activité chélatrice (%) = 100 x (Ac- At)/Ac où Ac : absorbance du contrôle et At : absorbance de l'échantillon à 562 nm.

#### 2.6.4. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est déterminé selon le protocole décrit par Bouaziz *et al.* (2015). Le principe de ce test consiste à déterminer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanide-Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>. Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. Les mélanges réactionnels ont été préparés par l'addition de 0,1 mL du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) à 2,5 mL de Potassium Ferricyanide (1% dans l'eau distillée) et les extraits de concentrations croissantes (0,045 - 20 mg/mL). Ces mélanges sont incubés dans un bain marie pendant 20 minutes à 50°C. Après refroidissement à température ambiante 2,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés. Après une centrifugation de 10 mn à 3000 rpm (Sigma 1k15), le surnageant (0,25 mL) a été déposé dans un tube à essai et mélangé avec 0,25 mL d'eau distillée et 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> (0,1% l'eau distillée) et laissé réagir pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance a été ensuite mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. La valeur de la concentration effectrice (EC<sub>50</sub>) est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

#### 2.6.5. Test du piégeage du radical hydroxyle

L'activité de piégeage du radical hydroxyle a été testée par la méthode de Geng *et al.* (2012). En bref, le mélange réactionnel contient 3,0 mL de FeSO<sub>4</sub> (1,5 mM), 0,7 mL de peroxyde d'hydrogène (6 mM), 0,3 mL de salicylate de sodium (20 mM) et un volume de 100 µL d'extraits à différentes concentrations (0,08 - 60 mg/mL). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 60 min à 37°C. L'absorbance a été ensuite mesurée à 562 nm. La vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

Pourcentage inhibition (%) =  $(1 - A_1 / A_0) \times 100$

$A_0$  : l'absorbance de l'échantillon,  $A_1$  : l'absorbance du contrôle.

### 2.6.6. Test ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical cationique,  $ABTS^+$  (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) qui présente un pic d'absorption à 734 nm. En réagissant avec le persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ), l'ABTS forme le radical  $ABTS^+$  de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. Le protocole de détermination de la capacité d'antioxydants à piéger la radical cationique  $ABTS^+$  adopté par Bouaziz *et al.* (2015). La solution mère de l' $ABTS^+$  (ABTS 7 mM, persulfate de potassium 2,45 mM dans le méthanol) est incubée à l'abri de la lumière pendant 16 h. La solution de travail d' $ABTS^+$  est obtenue en diluant la solution mère avec du méthanol jusqu'à obtention d'une absorbance finale de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm. Les échantillons (50  $\mu$ L) à différentes concentrations (0,1 - 20 mg/mL) sont mélangés avec 1 mL de la solution diluée d'ABTS fraîchement préparée. Le mélange est soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture de l'absorbance est réalisée à 734 nm. La Vit C est utilisée comme standard. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$I\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , où  $A_0$  : absorbance initiale de l'ABTS,  $A_1$  : absorbance du mélange ABTS + extrait.

### 2.7. Activités anti-inflammatoires *in vivo*

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits d'*Asphodelus microcarpus*, trois modèles d'inflammation ont été utilisés dans les tests *in vivo*. L'effet du traitement oral par les extraits a été testé par le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'application topique de

xylène, l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat et par l'arthrite induite par la formaline.

### 2.7.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène.

L'évaluation de l'effet anti-œdémateux des extraits d'*A. microcarpus* a été effectuée selon la méthode décrite par Igbe *et al.* (2010). Brièvement, les souris males (25-30 g) ont été répartis en dix groupes de six et jeunées pendant une nuit avant l'expérience. Une heure après l'administration orale des extraits (100, 300 et 500 mg / kg) ou de l'aspirine (100 mg / kg), l'inflammation de la face externe de l'oreille droite des souris est induite par l'application de 30 µL de xylène alors que l'oreille gauche était considérée comme témoin. Après 2 h, l'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital pour chaque souris (Hosseinzadeh *et al.*, 2002). L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'œdème.

- ✓ **Groupes A. (a1, a2, a3)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes B. (b1, b2, b3)** : extrait aqueux de la partie tige et fleurs d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes C. (c1, c2, c3)** : extrait aqueux des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes D. (d1, d2, d3)** : extrait aqueux de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe F. (f1, f2, f3)** : extrait méthanolique de partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes E. (e1, e2, e3)** : extrait méthanolique de partie tige et fleurs d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes G. (g1, g2, g3)** : extrait méthanolique des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.

- ✓ **Groupe H. (d1, d2, d3)** : extrait méthanolique de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- ✓ **Groupe standard** : Aspirine (100 mg/Kg).

### 2.7.2. Inflammation aiguë induite par la carragénine chez les rats

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode décrite par Igbe *et al.* (2010). L'inflammation est induite par injection sub-plantaire d'une solution de carragénine (Mélange de polysaccharides sulfatés extraits d'algues rouges) au niveau de la patte droite des rats. L'œdème causé par cet agent phlogogène est estimé en évaluant le volume de la patte en utilisant un pléthysmomètre ou en mesurant l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital.

Les expériences ont été réalisées sur des rats femelles, de poids compris entre 150 -200 g répartis en 14 lots homogènes de 6 rats chacun. Les rats ont jeuné pendant une nuit avant l'expérimentation. L'épaisseur initiale ( $V_0$ ) de la patte droite est mesurée puis chaque groupe a reçu par voie orale :

- ✓ **Groupes A (a1, a2, a3)** extrait aqueux de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes B (b1, b2, b3)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes C (c1, c2, c3)** : extrait méthanolique de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe D (d1, d2, d3)** : extrait méthanolique de partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- ✓ **Groupe standard** : Diclofenac (20 mg/Kg) dissout dans du NaCl 0,9%.

Une heure après le traitement, 0,01 mL de solution à 1% de carragénine a été injecté à chaque rat au niveau de la patte droite. La patte gauche est considérée comme témoin. L'évolution de l'œdème de la patte postérieure droite a été déterminée après 0, 1, 2, 3, 4 et 6 h de l'injection de la carragénine. Le pourcentage (%) de l'inhibition de l'œdème est calculé selon la formule suivante :

$I\% = 100 \times (T_0 - T_t) / T_0$ , où  $T_t$  = épaisseur de la patte du groupe traité au temps (t),  
 $T_0$  = épaisseur de la patte du groupe témoin au même moment.

### 2.7.3. Inflammation induite par la formaline

Pour évaluer l'effet antiarthritique des extraits d'*A.microcarpus*, un modèle expérimental d'arthrite induite par la formaline (formaldéhyde à 2%) chez les rats a été utilisé selon Igbe *et al.* (2010). Les rats sont répartis en groupes de 6 et privés de nourriture et d'eau pendant 18 h avant l'expérimentation. Des injections sub-plantaires (intra-articulaires) d'une solution de formaline au niveau de la patte droite sont effectuées une heure après l'administration des extraits par voie orale. Les groupes de rats sont traités comme suit :

- ✓ **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- ✓ **Groupe standard** : Aspirine (100 mg/Kg) dissout dans du NaCl 0,9%.
- ✓ **Groupes A (a1, a2, a3)** : extrait aqueux de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 50, 100 et 200 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes B (b1, b2, b3)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 50, 100 et 200 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes C. (c1, c2, c3)** : extrait méthanolique de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 50, 100 et 200 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe D. (d1, d2, d3)** : extrait méthanolique de partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 50, 100 et 200 mg/Kg, respectivement.

Une injection de 0,1 mL de formaline à 2% du NaCl 0,9% a été réalisée dans la patte droite de chaque animal, le premier et le troisième jour de l'expérience. Les extraits ou le standard ont été quotidiennement administrés par voie orale pendant 10 jours. L'épaisseur de la patte a été mesurée quotidiennement pendant 10 jours avec un pied à coulisse digital.

## 2.8. Détermination de l'activité analgésique

L'étude de l'activité analgésique est réalisée pour étudier l'effet des extraits méthanolique et aqueux d'*A. microcarpus* sur la sensibilité nociceptive périphérique. Le test de l'activité analgésique consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits sur la douleur provoquée chez la souris par l'injection intrapéritonéale (IP) d'une solution diluée d'acide acétique (test de Koster).

Dans cette méthode la douleur est induite par l'injection de principes irritants comme l'acide acétique chez les souris (Koster *et al.*, 1995). Des souris de 25 à 30 g réparties en groupes de six ont été maintenues à jeun pendant 18 h avant le début de l'expérience.

- ✓ **Groupes A. (a1, a2, a3)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes B. (b1, b2, b3)** : extrait aqueux de la partie tige et fleurs d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes C. (c1, c2, c3)** : extrait aqueux des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes D. (d1, d2, d3)** : extrait aqueux de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe E. (e1, e2, e3)** : extrait méthanolique de partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes F. (f1, f2, f3)** : extrait méthanolique de partie tige et fleurs d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupes G. (g1, g2, g3)** : extrait méthanolique des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.

- ✓ **Groupe H. (h1, h2, h3)** : extrait méthanolique de la racine d'*Asphodelus microcarpus* aux doses 100, 300 et 500 mg/Kg, respectivement.
- ✓ **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- ✓ **Groupe standard** : Aspirine (100 mg/Kg).

Une heure après l'administration des extraits, les animaux ont reçu par voie intrapéritonéale une injection de 10 mL/kg d'une solution à 0,6 % d'acide acétique. Cette injection induit une sensation de douleur qui se manifeste chez les souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales. Après un temps de latence de 5 minutes, le nombre de torsions pour chaque souris est compté chaque 5 minutes au cours des 30 minutes après l'injection de l'acide acétique (Koster *et al* , 1995). Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante :

$\% \text{ Inhibition} = (M_c - M_t / M_c) \times 100$  ; où **M<sub>c</sub>**: moyenne du nombre des contorsions des souris du lot non traité, **M<sub>t</sub>**: moyenne du nombre des contorsions des souris du lot traité.

## 2.9. Activités immunomodulatrices

### 2.9.1. Préparation des globules rouges de mouton

Le sang de mouton est prélevé de la veine jugulaire externe de mouton dans l'abattoir local de la ville de Sétif. Il est mélangé dans la solution d'Alsèver (glucose 2,05 g, chlorure de sodium 0,42 g, citrate de sodium 0,80 g, acide citrique 0,55 g, eau distillée qsp 100 mL). La solution d'Alsèver est une solution saline isotonique, équilibré à pH 6,1, habituellement utilisée comme agent de conservation ou anticoagulant du sang. Cette solution permet le stockage du sang pour une durée de dix jours. Une solution physiologique (NaCl 0,9%) est ajoutée de manière à remplir presque complètement le tube (dilution à 1/10), mélangée et

centrifugée à 3000 rpm (Hettich) pendant 10 min. Le surnageant est aspiré, et les globules rouges obtenus sont lavés deux fois par le NaCl 0,9% avec centrifugation à chaque fois. Les globules rouges sont amenés à une concentration de  $5 \times 10^9$  cells/mL dans le NaCl 0,9%, adéquate pour l'immunisation des souris (Aichour *et al.*, 2016).

### **2.9.2. Évaluation de la réponse humorale**

La réponse immunitaire anti-globules rouges de mouton (sheep red blood cells : SRBC) a été évaluée par le test l'hémagglutination (HA) suivant le protocole décrit par Aichour *et al.* (2016). Les souris sont divisées en quatre groupes de six souris pour chaque extrait avant d'être immunisées par voie intra-péritonéale avec  $5 \times 10^9$  SRBC (1 mL) au jour 0. Différentes concentrations de l'extrait (50, 100 et 200 mg/kg) sont administrées par voie orale pour les trois groupes concernés au jour -2, -1, 0, 1 et 2. Une solution saline normale NaCl a été administrée au quatrième groupe comme témoin. Les échantillons de sang sont prélevés chez les souris par ponction rétro-orbital au jour 8 et centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min pour séparer le sérum. Après inactivation du complément dans le sérum par incubation à 56°C pendant 30 min. Des dilutions en série (en 25 µL d'aliquote) sont réalisées avec le PBS dans des plaques de microtitration. En premier 25 µL du sérum de souris, dilué deux fois par le NaCl 0,9% dans des microplaques, est additionné par 25 µL de 1% (v/v) de la suspension SRBC. Les plaques sont incubées pendant 1 h à 37°C. Le titre des anticorps (inverse de la dilution) est enregistré comme le dernier puits montrant une hémagglutination visible.

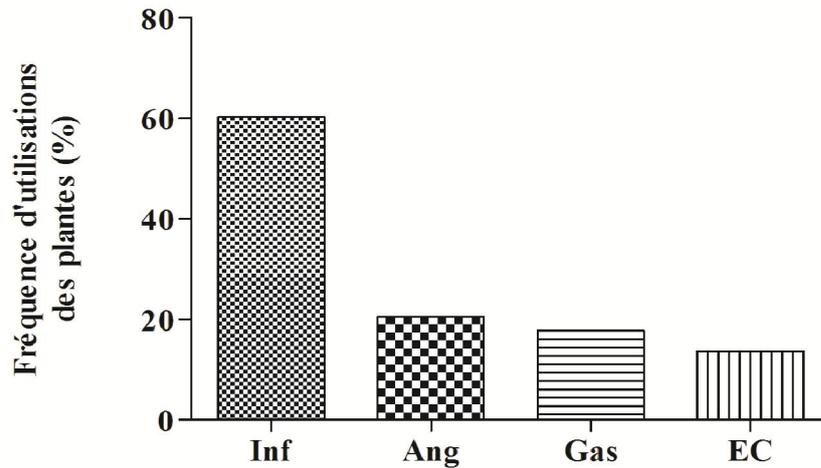
# **RESULTAT ET DISSCUSSION**

## 1. Etude ethnobotanique

Les études ethnobotaniques et ethnomédicinales sont aujourd'hui reconnues comme des méthodes de choix pour la connaissance des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles (Farnsworth, 1986 ; Adjanahoun *et al.*, 1991). Ces études sont indispensables dans la mesure où elles orientent la sélection des plantes à étudier et le choix des tests biologiques (Jones *et al.*, 2000).

La présente étude a permis de dresser une liste des plantes médicinales utilisées dans la région de Tebessa (tableau 5). En outre, l'identification botanique a montré que parmi les 12 familles recensées, les *Lamiaceae* sont les plus représentées avec 07 espèces (soit 25 citations) puis les *Asteraceae* avec 3 espèces (6 citations), les *Liliaceae* avec 02 espèces (16 citations), les *Zingiberaceae* et les *Myrtaceae* avec 4 espèces (5 et 6 citations, respectivement), puis les *Lauraceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Pinaceae*, *Cupressaceae* et *Salicaceae* (1 à 2 citations chacune).

L'estimation d'utilisation des plantes étudiées pour les différentes catégories de maladies fait ressortir une indication massive de ces espèces pour le traitement des maladies inflammatoires (44/73), suivies des analgésiques (15/73), maladies gastriques (13/73) et eczéma (10/73) (figure 11). De cette étude il ressort qu'*Asphodelus microcarpus* est l'espèce médicinale la plus utilisée dans les soins des maladies inflammatoires, analgésiques et de l'eczéma avec 15 citations.



**Figure 11** : Fréquences des maladies traitées par les plantes médicinales, Inf : Inflammation ; Ang : analgésique ; Gas : gastrique ; Ec : eczéma (hypersensibilité)

L'utilisation des plantes investiguées par les populations de la région de Tebessa, essentiellement dans le traitement des maladies inflammatoires et analgésiques pourrait être en relation avec la prédominance de ces pathologies dans la région. La forte incidence de ces maladies pourrait être favorisée par des facteurs tels que les polluants, l'exposition prolongée aux rejets miniers.

Dans les recettes recensées, les plantes sont préparées seules mais souvent combinées avec d'autres ingrédients. Les recettes combinées peuvent renfermer des suppléments de nature végétale (huile, vinaigre et plante), animale (beurre local, lait, miel, viande et blanc d'œuf). A cet effet, *A. microcarpus* est mélangée avec l'huile d'olive. Les conseils d'association sont dictés dans un souci de diminuer le caractère irritant ou annuler l'effet toxique d'un composant ou au contraire renforcer son activité ou encore créer une dynamisation des effets curatifs des divers constituants afin d'aboutir à une synergie thérapeutique (Bigendako-Polygenis et Lejoly, 1990). Cette synergie qui existe à l'intérieur d'une même plante peut encore être améliorée et renforcée par l'action concertée de plusieurs

substances naturelles. Ces résultats sont conformes à ceux d'El Rhaffari et Zaid (2002), signalant qu'en pharmacopée traditionnelle des Oasis du Sud-est du Maroc, les recettes phytothérapeutiques sont préparées seules dans 85.3 % des cas ou mélangées avec d'autres ingrédients (14.7 % des cas).

Différentes parties de la plante sont utilisées pour la préparation des différentes recettes thérapeutiques (feuilles, racines et partie aérienne). Selon les observations, l'efficacité de la plante réside dans l'utilisation des racines alors que la partie aérienne vient en second lieu. La prédominance d'utilisation d'un organe par rapport à un autre dans le domaine de la phytothérapie émane de la différence dans la concentration en principes actifs dans ces organes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rodrigues (2007) qui a trouvé que les racines et les écorces sont les parties de *Cissus populnea* et de *Zizyphus mucronata* les plus utilisées avec des pourcentages de 54,9% et de 57,58%, respectivement. La racine ne peut être utilisée que dans peu de préparations médicinales car l'enlèvement des racines pourrait causer la mort de la plante, mettant l'espèce dans une situation vulnérable quand la récolte est significative et quand il n'ya aucun plan de culture. Les espèces *C. populnea* et *Z. mucronata* seraient alors menacés de disparition en absence d'un plan de culture.

**Tableau 5 :** Plantes médicinales recensées, leurs usages thérapeutiques et leurs modes de préparation.

Famille	Nom Scientifique	Nom locale	Partie utilisée/Traitement	Mode de préparation	Citation
<i>Apiaceae</i>	<i>Petroselinumsativum Hoffm.</i>	maàdnouss	Plante entière, feuilles / Pathologies du système urinaire / Production du lait chez les femmes allaitantes et les anémies.	Décoction Infusion.	03
<i>Astereaceae</i>	<i>Artemisia herba alba</i>	Chih	Plante entière / diabétique, antispasmodique, antihelminthique, carminatif, nausée, analgésique abdominal et analgésique du sein	Décoction, tisane, poudre, Mastication.	03
	<i>Anthemis arvensis.</i>	Baboundj	Fleurs / antihelminthiques, analgésiques, Convulsions, estomac, inflammation de la gorge.	Décoction, tisane, Fumigation.	02
	<i>Artemisia absinthium</i>	Chadjret meriem	Feuilles / hypertensive,	Infusion, Décoction.	01
<i>Cupressaceae</i>	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Aaraar	Partie aérienne / eczéma, Diarrhée, antihelminthique, toux, douleur à l'estomac, douleur à la poitrine, voies carminatives et urinaires, inflammation.	Décoction, tisane, poudre	02
<i>Fabaceae</i>	<i>Trigonella fenum graecum</i>	Helba	Graines/ Apéritif, antihelminthique, infection génitale, anémies et la production laitière dans les femmes allaitantes	Décoction, tisane, poudre	02
<i>Lamiaceae</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Aklil	Partie aérienne / estomac, le diabète et la douleur de la tête.	Décoction, tisane, poudre.	03
	<i>Origanum glandulosum</i>	Zaater	Partie aérienne / Rhum, douleur de menstruation, pelvienne infection, toux, carminatif et antihypertenseur	Décoction, tisane, fumigation, poudre.	05
	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Temeriouit	Partie aérienne / diarrhée, fièvre, maux de tête, antidiabétique, antihypertenseur et stimulant hépatique.	Décoction, tisane	05
	<i>Lavandula officinalis</i>	El khouzama	Partie aérienne / infection de l'appareil génital, antispasmodique et grippal, douleurs de l'estomac	Décoction, tisane, poudre	04
	<i>Mentha spicata</i>	Naanaa	Partie aérienne, feuilles / Antispasmodique, hypotensive, analgésique, dents, antihelminthique et nausée	Décoction, tisane, fresh	03
	<i>Teucrium polium</i>	Khiata	Partie aérienne/ eczéma	Poudre,	03
	<i>Mentha pulegium</i>	Fliou	Partie aérienne / Vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, toux et analgésiques.	Décoction, tisane.	02

Suite tableau 5

<i>Lauraceae</i>	<i>Laurus nobilis</i>	Rand	Feuilles/ Contre les troubles supérieur du système digestif et les douleurs arthritiques.	Décoction, Infusion	03
<i>Liliaceae</i>	<i>Aloe socotrina</i>	Essebar	Feuilles/ Hypersensibilité et maladies de la peau	Decoction	01
	<i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv.	Beruâg	Racine/ partie aérienne, feuilles / Douleurs arthritiques, rhumes et eczéma, douleurs de l'oreille, pathologies de l'appareil respiratoire et bronchite, asthme.	Poudre	15
<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtus communis</i>	Rihan	Feuilles / eczéma, hypertensives et les maladies cutanées.	Poudre, Décoction	03
	<i>Eucalybtus torquata</i> Luehmann	calitouss	Feuilles / Douleur, pathologies du système respiratoire et douleur arthritique.	Décoction, Infusion	.03
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus Pinaster</i> Aiton	Snowber	feuilles / maladies de la peau.	Poudre	02
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta chalepensis</i>	Fidjel	Partie aérienne / diarrhée, Vomissements et tumeurs du sein	Infusion	02
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra</i>	Safsaf	Plante entière, feuilles / pathologies du système respiratoire.	Décoction, Infusion, poudre	01
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	Zendjabil	Racines / carminatif, rhum, relaxation, analgésique et hypotension.	Décoction, tisane	02
	<i>Eugenia caryophyllus</i> (Spreng.) Bullok	Kronfel	Antipyrétique, antiseptique, anesthésique, analgésique	Décoction, tisane	03

## 2. Extractions et analyse phytochimique

### 2.1. Rendement des extractions

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs activités biologiques diverses en particulier leur propriétés antioxydante et anti-inflammatoire (Su *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, deux méthodes d'extraction ont été utilisées. La décoction qui permet d'extraire préférentiellement les composés polaires et quelques composés amphiphiles (Jones et Kinghon, 2005). Selon Markham (1982), l'extrait aqueux contient des flavonoïdes glycosylés et des tannins. Dans la deuxième méthode, l'extraction est faite par le méthanol capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). Il est connu comme un solvant ayant une interaction avec une grande diversité de composés bioactifs. En effet, Khoddami *et al.* (2013) ont montré que le méthanol et l'eau sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques.

Les rendements d'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la plante *A. microcarpus* sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Aspects, couleurs et rendements des extraits bruts des différentes parties d'*Asphodelus microcarpus*.

Partie étudiée	Solvant	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<b>Partie aérienne</b>	Méthanol	Pâteux	Vers foncé	7,49
	Eau	Poudre	Marron foncé	3,88
<b>Feuilles</b>	Méthanol	Pâteux	Vers foncé	13,45
	Eau	Poudre	Marron foncé	17,32
<b>Tige et fleurs</b>	Méthanol	Pâteux	Vers foncé	7,92
	Eau	Poudre	Marron foncé	14,6
<b>Racines</b>	Méthanol	Pâteux	Marron foncé	39,29
	Eau	Poudre	Marron clair	37,4

Les résultats de rendement des extraits méthanoliques et aqueux exprimés par rapport au poids de la matière sèche d'*Asphodelus microcarpus*, relèvent un pourcentage plus élevé pour les racines de l'extrait méthanolique et aqueux qui est de l'ordre de 39,29 et 37,4%, respectivement ; suivi par l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles avec un rendement de 17,32 % et 13,45 % respectivement. Dans cette étude, les rendements des extraits méthanoliques étaient plus divers que ceux de la décoction. Le rendement d'extraction, la composition des extraits obtenus et par conséquent leurs activités biologiques dépendent de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, le temps de macération, la température (Tabart *et al.*, 2007 ; Tiwari *et al.*, 2011 ; Terblanche *et al.*, 2017), la polarité et la nature des solvants utilisés (Franco *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2003). On constate qu'il y a une différence de rendements d'un organe à un autre.

## 2.2. Analyse phytochimique

Les dosages des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques et aqueux ont été réalisés par les méthodes du Folin-Ciocalteu et au trichlorure d'aluminium, respectivement. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7

**Tableau 7 :** Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), flavonoïdes (mg ER/g) de différentes parties d'*Asphodelus microcarpus*. PA : partie aérienne, TF : tiges-fleurs, F : feuilles, R : racines.

Partie de la Plante	Extrait méthanolique		Extrait aqueux	
	Polyphénols	Flavonoïdes	Polyphénols	Flavonoïdes
<b>PA</b>	616 ± 0,01	35,13 ± 0,00	388 ± 0,03	25,93 ± 0,00
<b>TF</b>	602,33 ± 0,07	29,75 ± 0,01	310 ± 0,03	7,6 ± 0,01
<b>F</b>	755,3 ± 0,04	42,2 ± 0,04	704 ± 0,04	13,8 ± 0,02
<b>R</b>	377 ± 0,03	15,37 ± 0,01	164 ± 0,02	11,2 ± 0,05

Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures ± SD.

Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les extraits des différentes parties étudiées d'*A. microcarpus*. Les extraits méthanoliques possèdent les teneurs les plus élevées. Considérant les organes, les feuilles renferment les teneurs les plus importantes en ces composés pour les deux extraits méthanoliques et aqueux. Khoddami *et al.* (2013) ont montré que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques. L'utilisation des feuilles de plantes sous forme de poudre rend

l'extraction plus efficace, car l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant devient plus grande, la pénétration à l'intérieur des cellules est plus facile (Khoddami *et al.*, 2013).

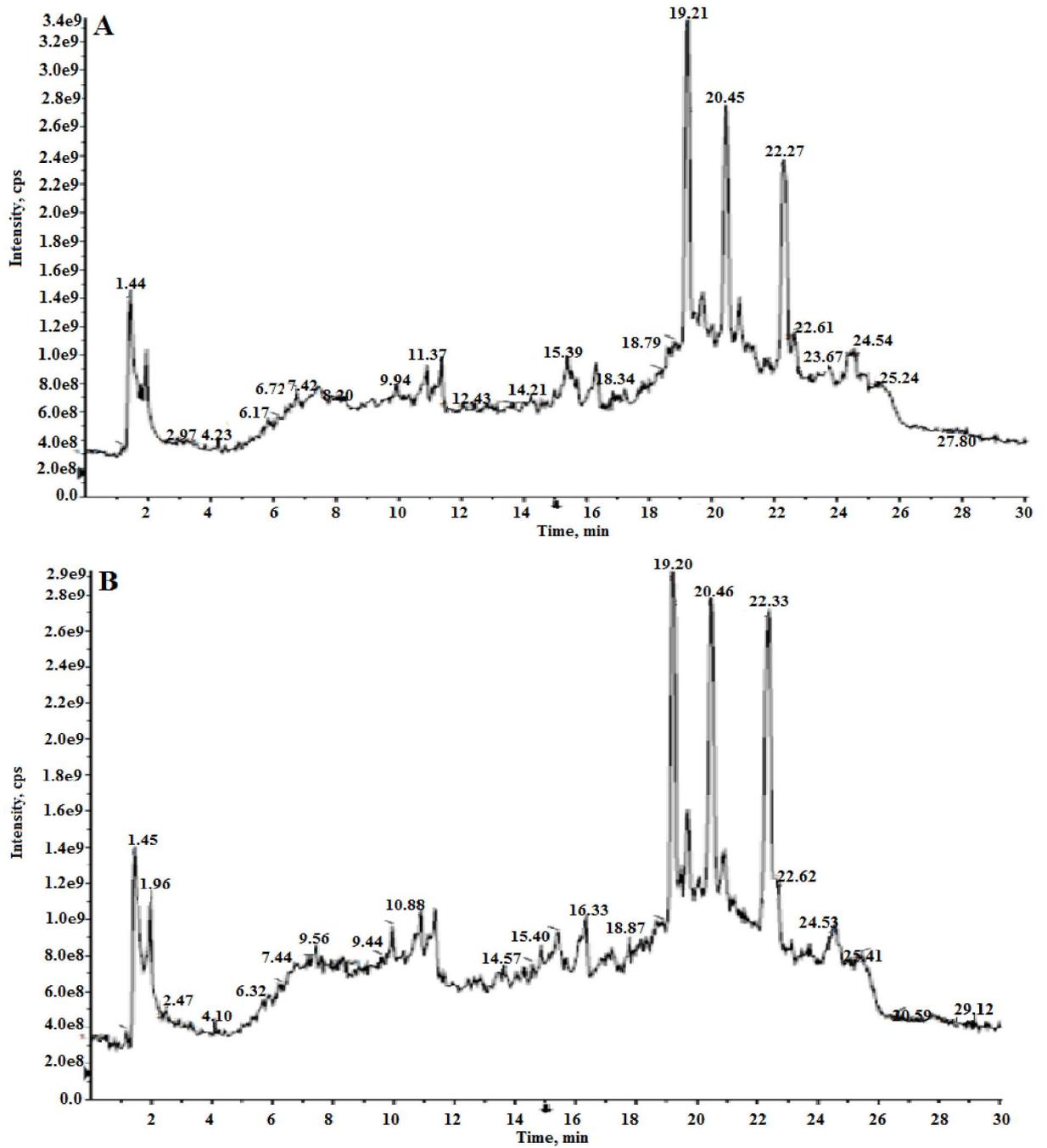
Le dosage par le réactif de Folin Ciocalteu donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007). Ce test, basé sur une réaction d'oxydoréduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (Prior *et al.*, 2005). De ce fait les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considéré comme les plus antioxydants.

Concernant les teneurs en flavonoïdes il apparaît que les feuilles de l'extrait méthanolique possèdent un taux élevé (42,2 mg ER/g) par rapport à celui de l'extrait aqueux (13,8 mg ER/g) de la MS. Par contre, les racines représentent la partie la plus pauvre. Selon Falleh *et al.* (2008) et Terblanche *et al.* (2017) une meilleure récupération de polyphénols et de flavonoïdes est obtenue avec le méthanol.

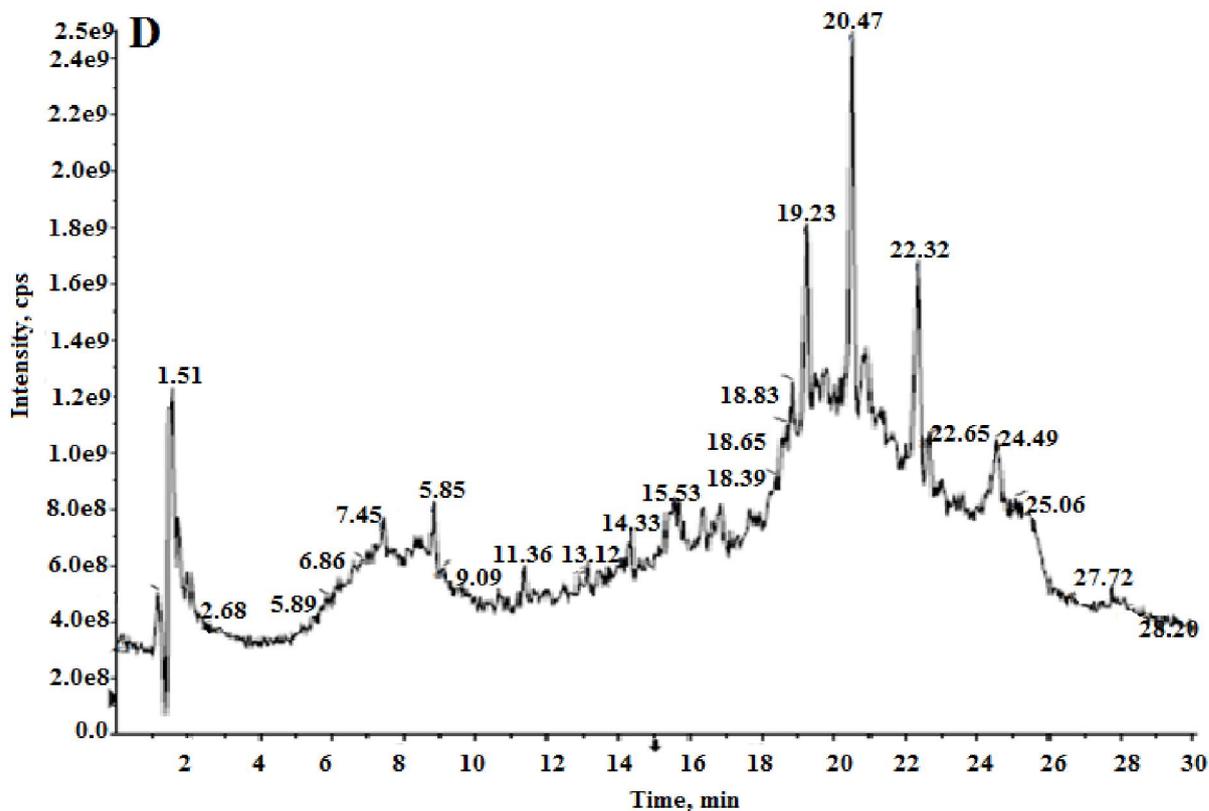
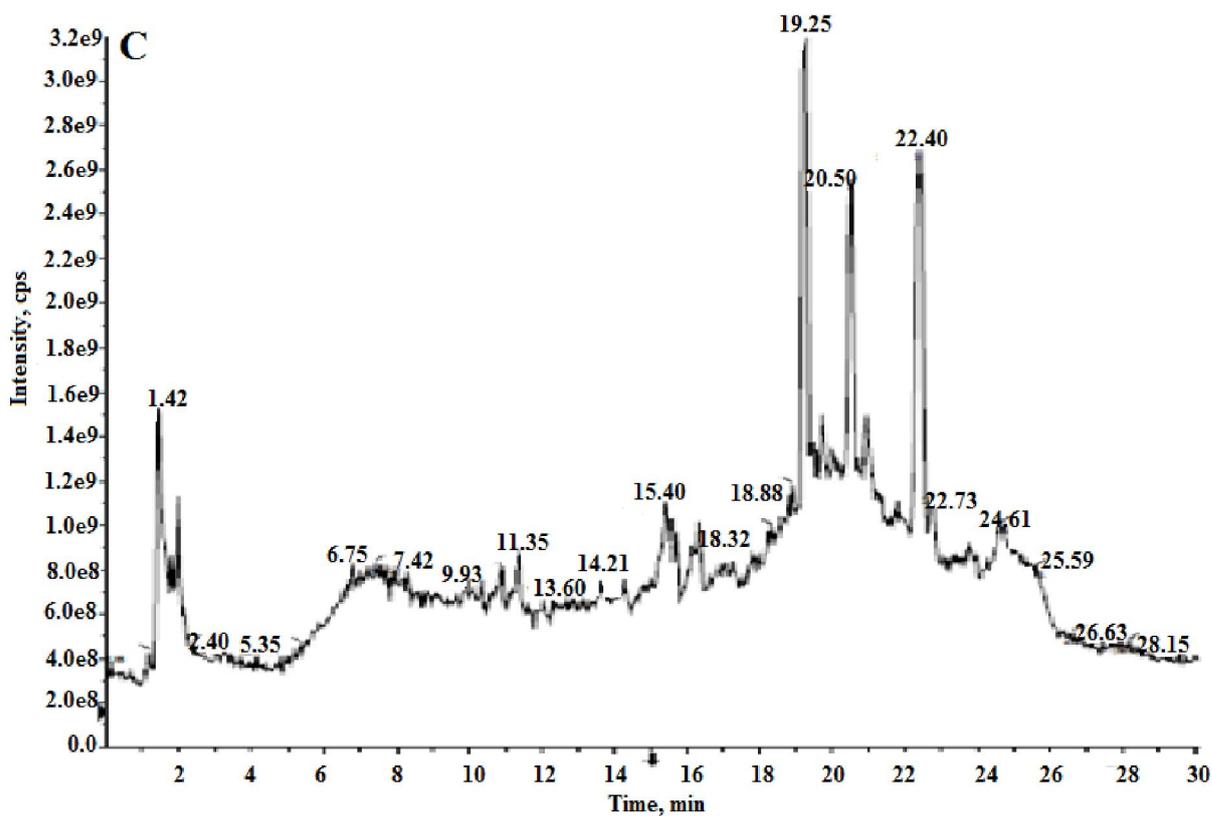
### 3. Caractérisation phytochimiques par HPLC/MS/MS

La comparaison des temps de rétention des composés des extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus* avec ceux des différents standards a permis de suspecter la présence de 19 composés phénoliques. Il s'agit de 11 acides phénols (acide gallique, acide chlorogénique, acide caféique, acide ellagique, acide férulique, acide hydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique, acide rosmarinique, acide sunergique, acide transinamylaldehyde et acide vanillique,) et 8 flavonoïdes (catecholé, rutine, scutellarine, quercétin-3-O-galactoside, lutéoléine, cyanine chloride, Myrtilline, quercétine et rutine), l'acide suergique n'est détecté que dans l'extrait méthanolique des tiges-fleurs. Le tableau 8 montre les différents composés rencontrés avec leurs concentrations respectives.

Les résultats de l'analyse des extraits méthanoliques révèlent la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes. Les conditions de séparation utilisées ont permis d'obtenir des chromatogrammes bien résolus (figure 12). Dix neuf (19) composés phénoliques sont identifiés. Les extraits méthanoliques des différentes parties de la plante renferment trois acides phénols (Acide chlorogénique, Acide férulique et acide P-coumarique) en grande quantité, tandis que l'acide sunergique a été détecté seulement dans la partie tige-fleurs. Parmi les flavonoïdes détectés dans les deux extraits (EMPA, EMTF) on trouve la quercétine, alors que dans les EMF et EMR la rutine a été détectée. Le catéchol n'est détecté que dans l'extrait méthanolique (EMTF), (tableau 8).



**Figure 12a.** Profils chromatographiques des extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* obtenus par HPLC/MS/MS. **A**= partie aérienne ; **B** : tiges-fleurs.



**Figure 12b.** Profils chromatographiques des extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* obtenus par HPLC/MS/MS. C : feuilles, D : racines.

**Tableau 8** : Composés phénoliques identifiés par HPLC/MS/ MS dans les extraits méthanoliques d'*A. microcarpus*.

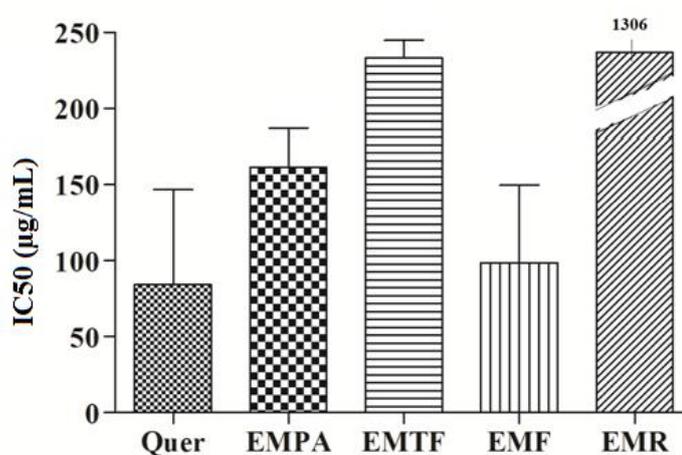
Composés phénoliques	TR	Concentration ng/mL				Q1	Q3	PMT
		TF	R	PA	F			
Acide gallique	1,53	/	101	55,2	67,1	169	124,6	170,12
Catechole	5,5	27,3	/	/	/	109	109	110,1
Acide chlorogénique	5,94	6260	2040	9140	11200	353,155	190,4/ 84,8 /93,1/ 168,2	354,31
Acide vanilique	6,38	135	222	92,2	25,7	166,66	107,8/151,2/ 151,7	168,15
Acide hydroxybenzoïque	6,48	33	61,3	72,1	39,2	134,779	88,4/106,8/ 89,1	135,12
Acide synergique	6,48	95,1	/	/	/	196,718	120,4/120,7/ 152,3	198,17
Acide caffeique	6,5	30,7	51,1	94	122	178,465	134,2/106,4 / 89,1	18,16
Rutine	6,84	/	36	/	23,2	300,604	299/299,9 / 270,9	610,52
Quercétine3-O-galactoside	7	52,1	5,83	70,2	79,1	463	301	464,379
Myrtilline	7,01	20,4	4,74	9,57	10,3	462,198	299,8/270,8/ 254,7	500,8
Acide-P coumarique	7,06	510	172	569	1170	162,756	118,8/118,1/ 92,7	164,16
Acide ferulique	7,2	272	379	249	575	192 ,807	133,9/133,4/ 177,8	194,18
Acide rosmarique	7,38	12,3	13,2	11,1	3,18	358,319	160,7/161/ 132,7	360,32
Acide transcinamaldehyde	7,95	1030	51,1	759	605	131,797	103,7/102,8/ 101,9	132,16
Luteoline	8	2140	85	1730	1690	285	217	286,24
Cyanine chloride	8	3120	136	2440	2310	286,198	133,4/132,8/ 150,6	287,1
Quercétine	8,01	3,95	/	2,06	/	462,178	150,4	302
Acide ellagique	8,01	11	3,22	4,76	/	300,703	149,7/150,6/ 149,9	302,197
Apigénine	8,4	135	2,64	66,9	23,9	269	151	270,12

**TR** : temps de rétention ; **TF** : tige fleur ; **R** : racine ; **PA** : partie aérienne ; **F** : feuille ; **Q1** : Poids moléculaire de composé, **Q3** : Poids moléculaire de fragment, **PMT** : poids moléculaire théorique.

## 4. Activités antioxydantes des extraits d'*Asphodelus microcarpus*

### 4.1. Piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits d'*Asphodelus microcarpus* vis-à-vis du radical DPPH est évaluée en suivant la réduction de ce radical. Les résultats montrent que les extraits aqueux et méthanolique ont une activité anti-radicalaire importante (figure 13 et 14).



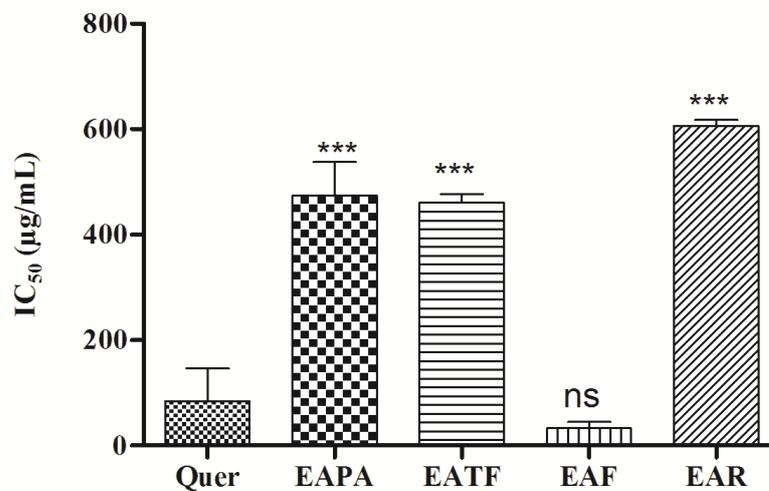
**Figure 13 :** Activité anti radicalaire des extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus*.

EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique des tiges et fleurs, EMF : extrait méthanolique des feuilles, EMR : extrait méthanolique des racines. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les extraits aqueux et méthanolique des feuilles d'*A. microcarpus* montrent l'activité antioxydante la plus forte avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 98,66 et 33,33 µg/mL, respectivement. D'après ces résultats, l'extrait qui présente une forte activité antioxydante est celui qui possède une teneur élevée en polyphénols. La différence dans l'activité peut être due à la teneur en composés phénoliques. Les extraits méthanoliques sont dotés d'une activité inhibitrice plus forte que celle des extraits aqueux. Cette différence est souvent attribuée au

fait que les extraits des solvants organiques sont plus riches en métabolites secondaires polaires, de moyenne et de faibles polarité (Kintzios *et al.*, 2010).

Les polyphénols sont des donneurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales. Des études ont prouvé que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres (Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014 ; Zhang et Zhao, 2016).

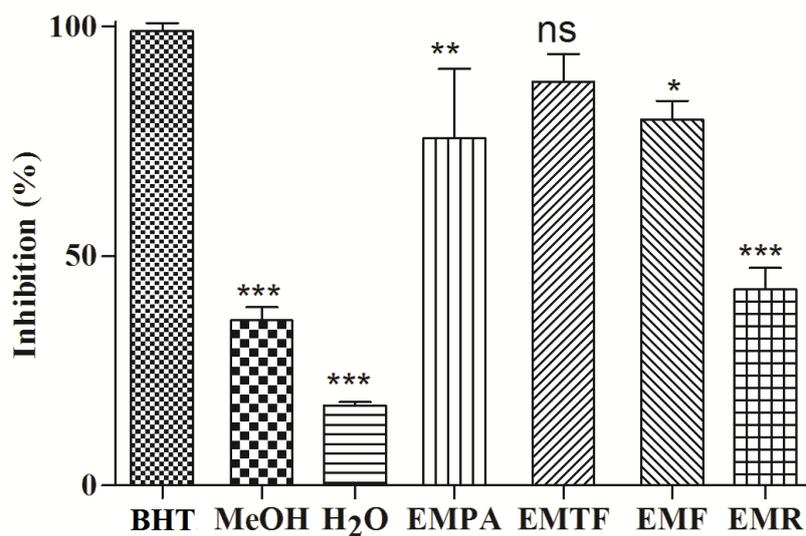


**Figure 14 :** Activité anti radicalaire des extraits aqueux *d'Asphodelus microcarpus*. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EAF : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3) ; ns: non significatif, \*\*\* p < 0.001, comparées avec la Quercétine.

#### 4.2. Effet sur l'oxydation du $\beta$ -carotène

La capacité antioxydant des extraits étudiés a été également évaluée par le test au  $\beta$ -carotène/acide linoléique. Les radicaux libres provenant de l'oxydation de l'acide linoléique attaquent la  $\beta$ -carotène et induisent sa décoloration. La présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de la  $\beta$ -carotène (Naidu *et al.*, 2011). La propriété de décoloration du  $\beta$ -

carotène est employée dans l'évaluation de l'activité antioxydants. Les résultats obtenus montrent les extraits d'*A. microcarpus* inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée du  $\beta$ -carotène/acide linoléique (figures 15 et 16). Tous les extraits expriment des activités antioxydantes significatives ( $p < 0,05$ ). L'extrait méthanolique des tiges-fleurs, feuilles et de la partie aérienne possèdent une importante activité antioxydante estimée à 88,02%, 79,72% et 75,71 %, respectivement. Ces dernières sont peu différentes de celle du contrôle positif (BHT) avec une activité inhibitrice de l'ordre de 99 %. L'extrait aqueux des feuilles montre une activité antioxydante de 99%, suivie par la partie aérienne (96,14%) et l'extrait tige-fleurs (94,6 %). Par contre, les extraits des racines sont les moins actifs.

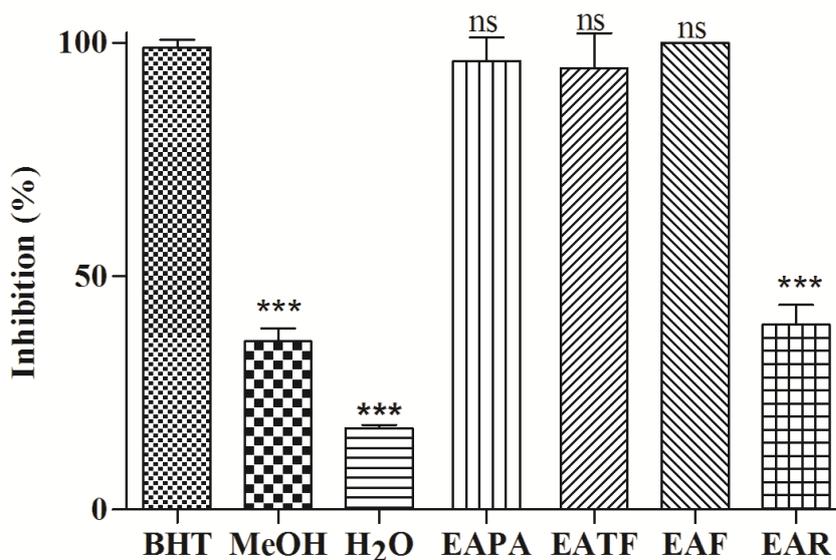


**Figure 15:** Pourcentage d'inhibition du blanchissement de  $\beta$ -carotène après 24 h par les extraits méthanoliques d'*Asphodelus microcarpus*. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EMF : extrait méthanolique feuilles, EMR : extrait méthanolique des racines, BHT : butyl hydroxytoluène. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ; ns: non significatif, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

D'après les résultats du test de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence des différents extraits d'*A. microcarpus* et du BHT, les extraits aqueux semblent inhiber d'une manière très

efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène. Cette activité antioxydante est suivie par celles des extraits méthanoliques. Ces résultats montrent une corrélation faible entre l'activité antioxydante et le contenu en polyphénols et flavonoïdes. Ceci peut être dû à la nature des antioxydants qui inhibent l'oxydation de l'acide linoléique, neutralisent les radicaux libres, ou les deux en même temps (Naidu *et al.*, 2011). Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Toutefois les extraits d'*A. microcarpus* ont une capacité de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. Les flavonoïdes et les polyphénols d'une manière générale ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Ayala *et al.*, 2014). Ils inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce en scavengant les radicaux peroxydes, comme ils peuvent interrompre la chaîne de réactions radicalaires en donnant de l'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011).

Selon Ferreria *et al.* (2006), le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques.



**Figure 16 :** Pourcentage d’inhibition du blanchissement de  $\beta$ -carotène après 24 h par les extraits aqueux *d’Asphodelus microcarpus*. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EAF : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines, BHT : butyl hydroxytoluène. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3) ; ns: non significatif, \*\*\* p < 0.001.

### 4.3. Effet chélateur du fer ferreux

Les résultats obtenus montrent que l’activité antioxydante la plus élevée est généralement obtenue avec les extraits aqueux (tableau 9). Par contre, l’IC<sub>50</sub> des extraits méthanoliques sont relativement élevée (activités plus faibles). Egalement, une grande différence est observée entre l’effet de l’extraits aqueux et méthanolique des feuilles. De plus, l’EAF à 2 mg/ml présente un bon effet chélateur avec une IC<sub>50</sub> = 60  $\pm$  30  $\mu$ g/ mL tandis que l’EMF même à 6 mg/mL présente une IC<sub>50</sub> = égale à 310  $\pm$  116  $\mu$ g/ mL.

**Tableau 9** : Pouvoir chélateur des ions ferreux, exprimé en IC<sub>50</sub> (µg/mL), des différents extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* et du standard de référence (EDTA).

Extraits/Standards	IC <sub>50</sub> Chélation de fer (µg/ mL)	
	Méthanoliques	Aqueux
<b>PA</b>	150 ± 130 <sup>ns</sup>	63 ± 5 <sup>ns</sup>
<b>TF</b>	76 ± 10.7 <sup>ns</sup>	60 ± 30 <sup>ns</sup>
<b>R</b>	160 ± 82 <sup>ns</sup>	79 ± 10 <sup>ns</sup>
<b>F</b>	310 ± 116 <sup>*</sup>	2840 ± 540 <sup>***</sup>
<b>EDTA</b>	6.16 ± 0.8	

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standards de déviation. PA : partie aérienne, TF : tige et fleurs, EMF : feuilles, EDTA : Ethylènediaminetétraacétique ; ns: non significatif, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001.

La présente étude montre que les extraits étudiés possèdent une activité chélatrice en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine, selon le principe de la technique. Toutefois, les extraits aqueux d'*A. microcarpus* sont meilleurs que les extraits méthanoliques. Ceci pourrait être attribué à la solubilité des agents chélateurs dans l'eau. En effet, Sahreen *et al.* (2010) ont montré que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs de manière directement liée à la polarité des solvants utilisés. Les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011). Les constituants aqueux sont plus capables d'inhiber la formation du complexe Fe<sup>2+</sup> - ferrozine en capturant les ions ferreux avant la ferrozine. Il a été rapporté que les agents chélateurs sont efficaces comme antioxydants secondaires car ils réduisent le

potentiel redox en stabilisant la forme oxydée des ions métalliques (Gülçin *et al.* 2007). De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas les groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice (Wong *et al.*, 2006).

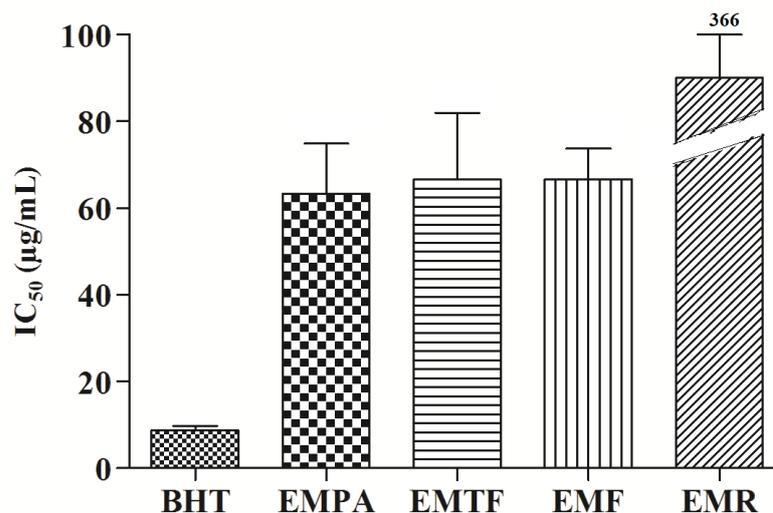
Contrairement aux résultats des tests précédents, l'extrait méthanolique des racines chélate les ions ferreux plus efficacement que les feuilles. Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques, d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer à la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006).

La chélation des ions métalliques mènent à bloquer la réaction de type Fenton génératrices de radicaux OH $\cdot$ . Parmi les espèces d'ions métalliques, les ions Fe $^{2+}$  sont les pro-oxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gulcin *et al.*, 2010). Ils catalysent la décomposition des hydroperoxyde en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemail *et al.*, 2002). De plus, les extraits ou les composés ayant l'activité de chélation sont censés empêcher la peroxydation de lipide en stabilisant les métaux de transition (Wu et Ng, 2008). Il a été montré que les agents chélateurs sont efficaces en tant qu'antioxydants secondaires, parce qu'ils réduisent le potentiel redox stabilisant de ce fait la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar *et al.*, 2008).

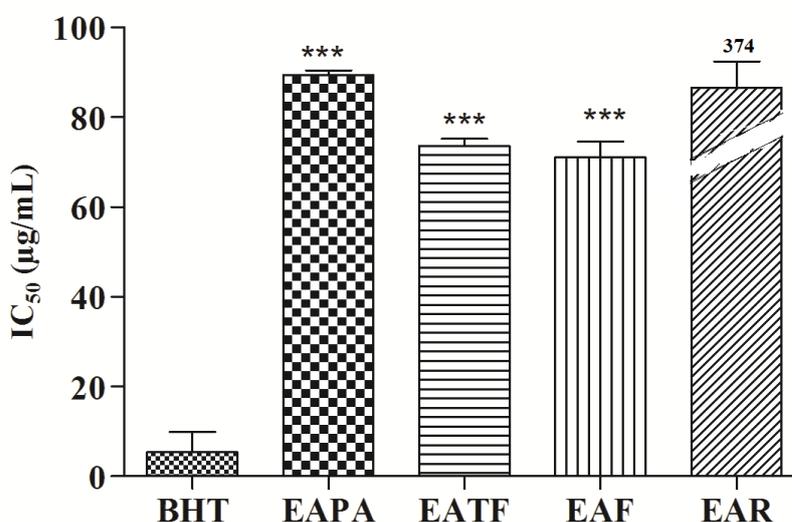
#### 4.4. Pouvoir réducteur

La réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  est utilisée comme indicateur de l'activité de donneur d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante des composés phénoliques et fortement corrélée avec d'autres propriétés antioxydantes. Le pouvoir réducteur est confirmé par le changement de la couleur verte de la solution d'essai à une couleur bleue en fonction de la concentration de l'antioxydant (Prasad *et al.*, 2010).

Les différents extraits méthanolique d'*A. microcarpus* ont exprimé un pouvoir réducteur largement élevé aux extraits aqueux. Cette réduction semble être due à nature des substances réductrices existantes dans ces échantillons. Les résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'EMPA, EMTF et EMF exprimé en  $\text{IC}_{50}$  sont de  $63 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ ,  $66 \pm 15 \mu\text{g/mL}$  et  $67 \pm 7,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivement à la dose test de 5 mg/mL. Les activités sont similaires à celles obtenues par l'EAF ( $71 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ), EATF ( $73,66 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ ) et EAPA ( $89,33 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ ). Le BHT utilisé comme antioxydant standard présente un pouvoir réducteur puissant avec une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de  $8,6 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ . Le pouvoir réducteur des racines de l'extrait méthanolique et aqueux d'*A. microcarpus* est plus faible ( $\text{IC}_{50} = 400 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ,  $374,33 \pm 25 \mu\text{g/mL}$ ), les résultats sont présentés dans les figures 17 et 18. Ce pouvoir est dû à la présence de composés donneurs d'électron ayant une capacité d'inhiber les réactions en chaînes déclenchées par les radicaux libres, et peuvent réduire les intermédiaires oxydées des processus de peroxydation des lipides (Chanda et Dave, 2009 ; Prasad *et al.*, 2010).



**Figure 17 :** Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques *d'Asphodelus microcarpus*. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EMF : extrait méthanolique feuilles, EMR : extrait méthanolique des racines, BHT : butyl hydroxytoluene. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

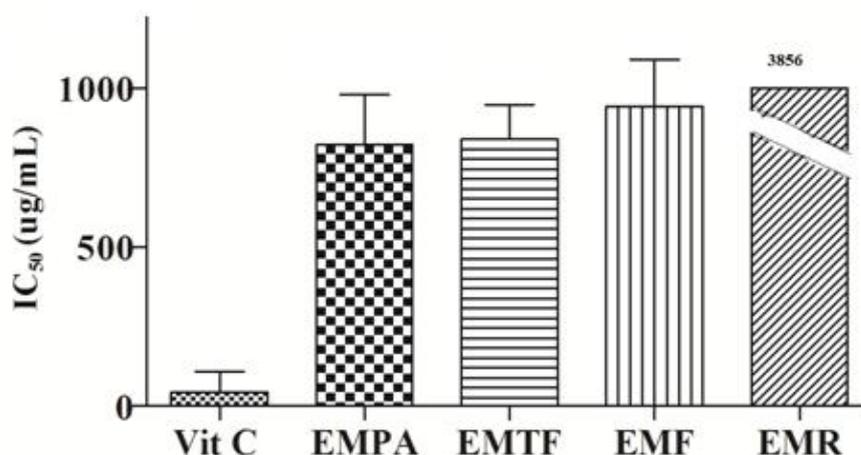


**Figure 18 :** Pouvoir réducteur des extraits aqueux *d'Asphodelus microcarpus*. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EA F : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines, BHT : butyl hydroxytoluene. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3), \*\*\* p < 0,001.

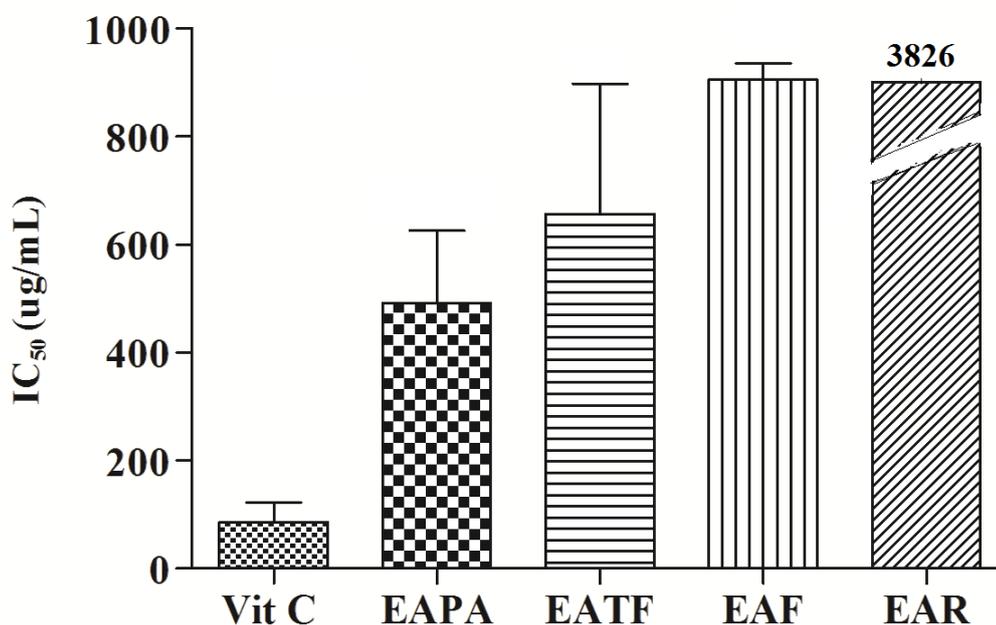
#### 4.5. Piégeage du radical hydroxyle

Dans ce test, l'activité antioxydante est déterminée sur la base que les extraits possèdent la capacité à piéger le radical hydroxyle. Selon les figures 19 et 20, les extraits d'*A. microcarpus* présentent des capacités à piéger le radical hydroxyle très variées d'un extrait à un autre. La meilleure activité inhibitrice d'OH est obtenue avec les extraits préparés par décoction. Donc les extraits d'*A. microcarpus* étaient capables de piéger le radical hydroxyle d'une manière dépendante de la concentration. A une concentration de 20 mg/mL, les extraits méthanoliques de la partie aérienne, tiges-fleurs et feuilles d'*A. microcarpus* révèlent une activité intéressante, comparable à celle du standard utilisé (Vit C), avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> : 822 ± 157 µg/mL ; 839 ± 108 µg/mL ; 943 ± 146 µg/mL et 80 ± 35 µg/mL respectivement. A une concentration plus élevée (30 mg/mL), les extraits aqueux de la partie aérienne, tiges-fleurs et feuilles montrent des activités nettement supérieures avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 490 ± 130 µg/mL, 650 ± 240 µg/mL et 943 ± 146 µg/mL, respectivement.

Le radical hydroxyle est l'une des puissantes espèces réactives de l'oxygène dans le système biologique qui réagit avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques ce qui conduit à la destruction de ces molécules et à la lyse des cellules. L'inhibition de ce radical est cruciale dans la prévention des maladies induites par le stress oxydant. Ce radical est généré de peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton ou par la réaction de Haber-Weiss (Nimse *et al.*, 2015).



**Figure 19:** La capacité des différents extraits méthanoliques *d'A. microcarpus* à piéger le radical hydroxyle. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EMF : extrait méthanolique feuilles, EMR: extrait méthanolique des racines. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3).



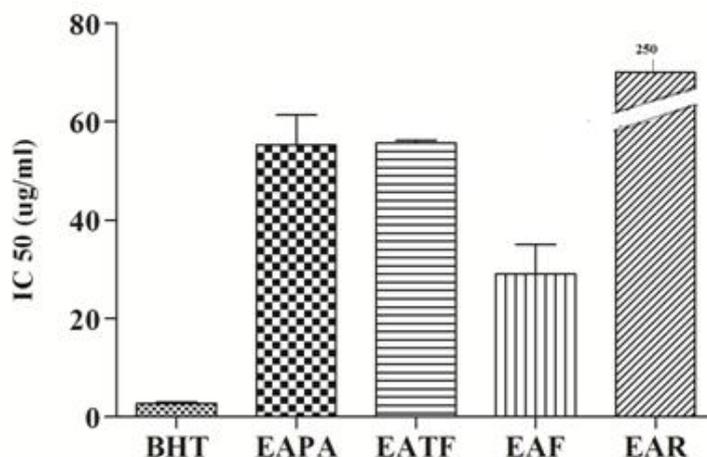
**Figure 20 :** La capacité des différents extraits aqueux *d'A. microcarpus* à piéger le radical hydroxyle. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EA F : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Le piégeage du radical hydroxyle est basé sur le transfert d'un atome d'hydrogène (Gupta, 2015). Il apparaît clairement que les différentes classes des composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénols et tannins hydrolysables) participent dans le piégeage du radical hydroxyle.

L'inhibition du radical hydroxyle par les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et les tanins est fortement liée à la structure de ces composés. La présence des groupements hydroxyles libres dans la structure des composés phénoliques permettent le transfert d'un proton vers le radical hydroxyle (Terml et Smejkal, 2016). Hagerman *et al.*, (1998) ont rapporté que les composés phénoliques de haut poids moléculaire ont plus la capacité à inhiber les radicaux libres et que leur efficacité dépend au poids moléculaire, au nombre des cycles aromatiques et au nombre des groupements hydroxyles. Cependant, Huang *et al.* (2005) indique que ce test peut aussi mesurer le pouvoir chélateur du fer au lieu de déterminer la capacité inhibitrice du radical hydroxyle puisque la plupart des antioxydants ont la propriété de chélater les métaux.

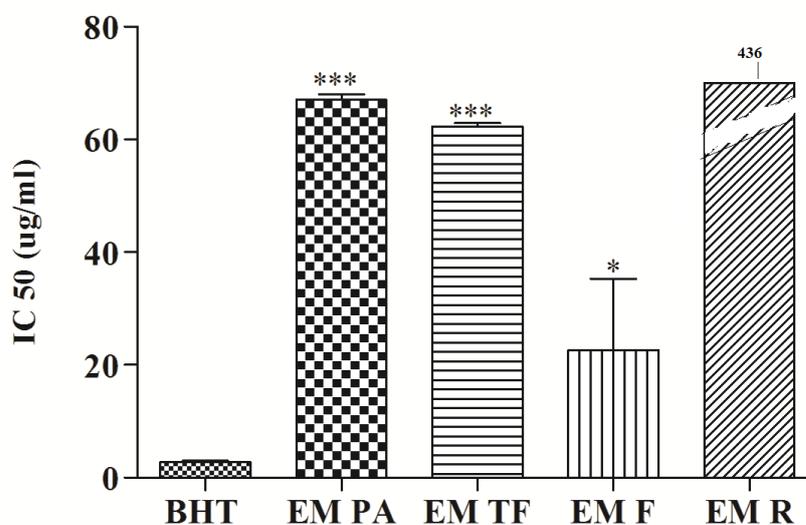
#### 4.6. Pouvoir antioxydant par ABTS

L'activité antioxydante des extraits de la plante *A. microcarpus* est mesurée et comparés avec BHT vis-à-vis le piégeage de radical libre ABTS. Les résultats sont présentés sur les figure 21, 22. Les résultats montrent que les extraits aqueux présentent un effet antioxydant remarquable vis à vis du radicale ABTS avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 55,3 ± 0,5 µg/mL, 55,6 ± 6 µg/mL et 320 ± 180 µg/mL, respectivement pour EAPA, EATF et EAR, par contre les capacités antiradicalaires des extraits méthanoliques sont faibles avec des IC<sub>50</sub> de 62 ± 0,5, 67 ± 1 et 430 ± 11 µg/mL pour EMTF, EMPA et EMR, respectivement.



**Figure 21 :** Activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> des extraits aqueux *d'Asphodelus microcarpus*. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EAF : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines, BHT : butyl hydroxytoluene. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

;



**Figure 22 :** Activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> des extraits méthanoliques *d'Asphodelus microcarpus*. EM PA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EM TF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EM F : extrait méthanolique feuilles, EM R : extrait méthanolique des racines, BHT : butyl hydroxytoluene. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3). \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001, comparées au BHT.

Les extraits méthanolique et aqueux des feuilles possèdent l'activité anti-radicalaire la plus importante ( $IC_{50} = 22 \pm 11 \mu\text{g/mL}$  et  $29 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ , respectivement). Le BHT utilisé comme antioxydant standard présente un pouvoir réducteur puissant avec une valeur d' $IC_{50}$  de  $4.3 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ . Ces résultats suggèrent que l'activité antioxydante de l'extraits méthanolique et aqueux de la plante étudiée peut être corrélée avec leurs teneurs en composés phénoliques. Ces composés sont des constituants des plantes très importants connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Kelly *et al.*, 2002) ou prévenir la décomposition des hydroperoxydes en radicaux libres. Bhourri et ses collaborateurs (2010) ont montré que les flavonoïdes ont une activité potentielle vis-à-vis du radical ABTS<sup>+</sup>. Ceci peut être expliqué par le fait que les flavonoïdes stabilisent les espèces réactives de l'oxygène en réagissant avec le composé réactif du radical.

La mesure de l'activité antioxydante avec les tests DPPH et ABTS sont rapides, sensibles et plus fréquemment appliquées pour l'évaluation préliminaire du potentiel antioxydant de diverses substances naturelles. Bien que les principes de base soient similaires, le test ABTS est préférable pour évaluer l'activité antioxydante des antioxydants lipophiles et hydrophiles (Dobravalskyte *et al.*, 2012 ; Gulcin, 2012). En revanche, le DPPH est plus sélectif car il ne réagit pas avec les flavonoïdes qui ne contiennent pas de groupes hydroxyles dans le cycle B (Yokozawa *et al.*, 1998), ainsi que les acides aromatiques comportant un seul groupe hydroxyle (Von Gadov *et al.* 1997). Ces observations corroborent avec les travaux de Samaniego Sanchez *et al.* (2007), qui ont montré que la meilleure méthode pour la détermination de la capacité antioxydante de l'huile d'olive vierge est le test ABTS qui donne une haute reproductibilité et des coefficients de corrélation acceptables.

## **5. Activités anti-inflammatoires et antiarthritique *in vivo***

### **5.1. Test de toxicité des extraits d'*A. microcarpus***

Avant d'entamer les études *in vivo* pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits, une évaluation de la toxicité de ces derniers est indispensable. Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë des différents extraits aqueux et méthanoliques d'*A. microcarpus* étudiées par voie orale, n'ont montré aucun décès et aucun signe clinique de toxicité (changement de comportement, respiration, consommation d'eau et de nourriture, chute de poils...etc.), et ce après l'administration des doses de 2000 mg/Kg p.c aux souris. Toutes les souris ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation. Par conséquent, ces différents extraits semblent être non ou modérément toxiques jusqu'à la dose de 2000 mg/Kg. Ces extraits peuvent donc être utilisés avec un minimum de risques de toxicité.

### **5.2. Activités anti-inflammatoires *in vivo***

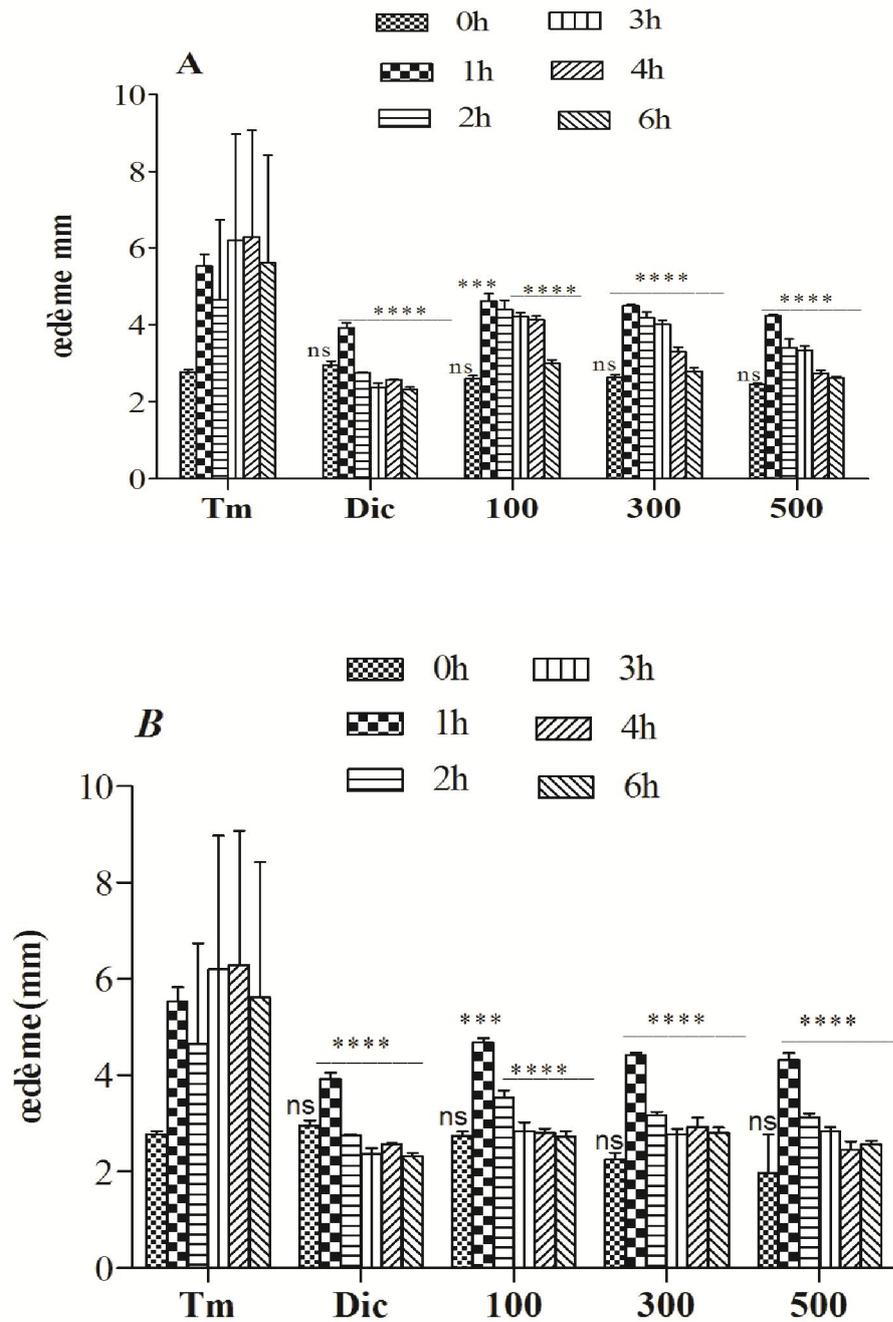
L'œdème de l'oreille induit par l'xylène chez la souris et de la patte induit par la carragénine chez le rat sont deux modèles expérimentaux largement utilisés pour le criblage des anti-inflammatoires naturels ou de synthèse qui agissent à différents niveaux de l'inflammation (Ouédraogo *et al.*, 2012 ; Ishola *et al.*, 2015). Ces deux modèles d'inflammation aiguë sont choisis dans notre étude.

#### **5.2.1. Effet sur l'œdème induit par la carragénine**

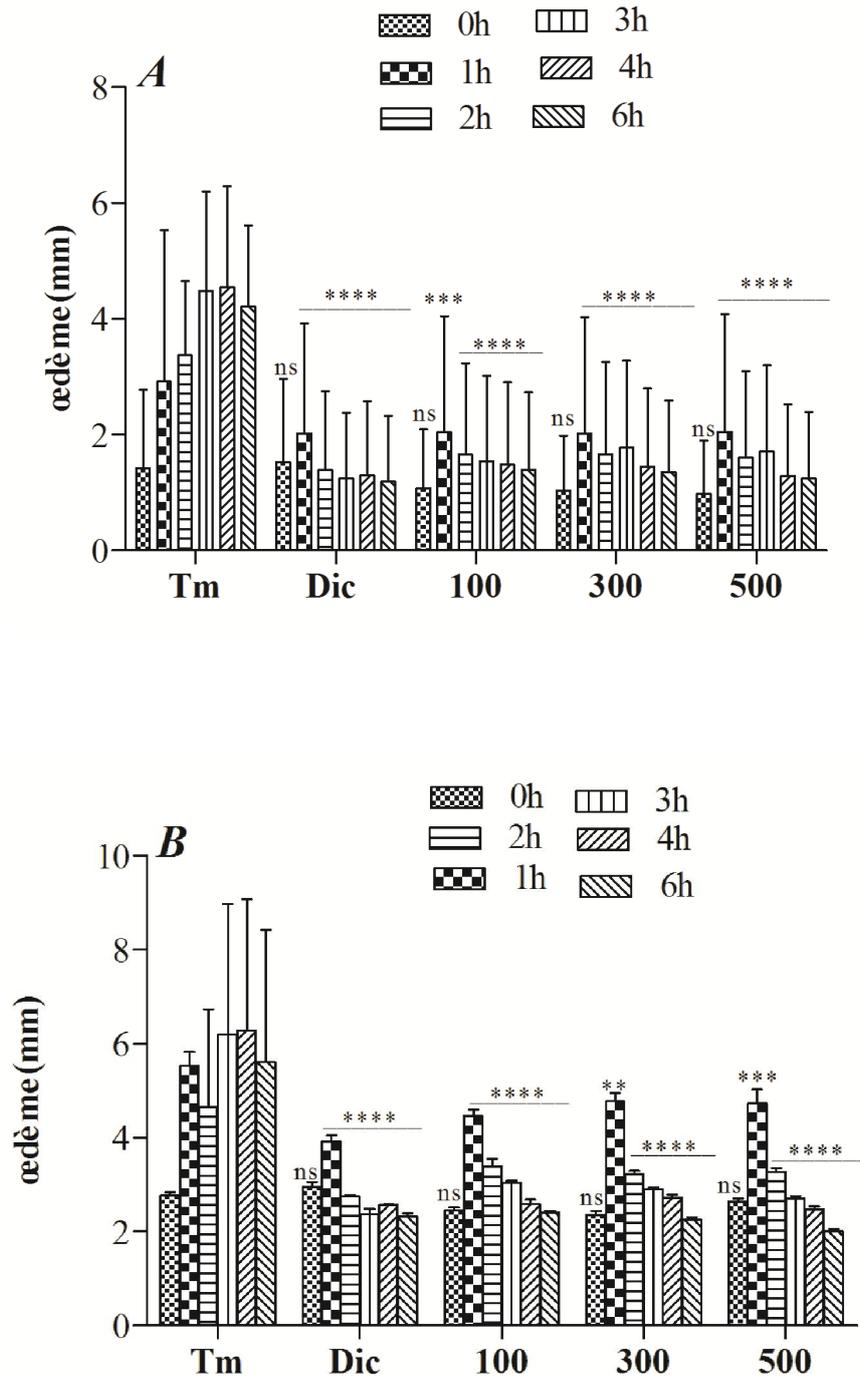
L'étude de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits méthanoliques et aqueux de la plante *A. microcarpus* est réalisée par la mesure de l'épaisseur de l'œdème induit par la carragénine chez les différents groupes (témoin, essai et standard) en absence et en présence d'un traitement anti-inflammatoire. Cet agent pathogène induit au niveau de la patte droite du

rat un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Banerjee *et al.*, 2000). Le diamètre de la patte mesuré par le pied à coulisse a donné les résultats reportés sur les figures 23 et 24 (A et B) montrant l'augmentation du diamètre de la patte en fonction du temps. Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de notre extrait, les % d'inhibition de l'œdème en fonction du temps (heures) ont été calculés et les résultats sont présentés dans les tableaux (10 et 11).

Les résultats obtenus montrent que l'injection de la carragénine provoque une augmentation de l'épaisseur de l'œdème chez tous les lots traités. De plus, l'administration orale du diclofénac à une dose de (20 mg/kg p.c) entraîne une diminution significative de l'œdème avec un pourcentage d'inhibition atteignant 63.05 % après 6 heures. En effet, la dose de 300 mg/kg des extraits méthanoliques et aqueux manifeste son effet inhibiteur dès la première heure qui suit l'injection de la carragénine, puis cet effet augmente progressivement jusqu'à la sixième heure. La dose de 500 mg/kg inhibe la formation de l'œdème de manière plus considérable.



**Figure 23 :** Effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques sur l'œdème de la patte induit par la carragénine. A : extrait méthanolique de la partie aérienne (EMPA), B : extrait méthanolique des racines (EMR). Tm : Témoin ; Dic : Diclofenac. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5), ns: non significatif, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\*, \*\*\*\* p < 0.0001.



**Figure 24 :** Effet anti-inflammatoire des extraits aqueux sur l'œdème de la patte induit par la carragénine. C : extrait aqueux de la partie aérienne (EAPA) et D : extrait aqueux des racines (EAR). Tm : Témoin ; Dic : Diclofenac. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5), ns: non significatif, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

**Tableau 10** : Inhibition de l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats (en %) par l'extrait méthanolique de la partie aérienne (EMPA) et racinaire (EMR) d'*A. microcarpus*

t (h)	Diclofénac (20 mg/Kg)	EMPA d' <i>A. microcarpus</i> (mg/Kg)			EMR d' <i>A. microcarpus</i> (mg/kg)		
		100	300	500	100	300	500
1	29.08 ± 0.13****	16.35 ± 0.18****	18.7 ± 0.04****	23.37 ± 0.04****	15.37 ± 0.08***	29 ± 0.05****	21.88±0.14****
2	40.96 ± 0.02****	25 ± 0.24****	20 ± 0.15****	27 ± 0.23****	23.95 ± 0.14****	31.98 ± 0.07****	32.80±0.08****
3	61.62 ± 0.1****	31.98 ± 0.1****	35.11± 0.09****	46.15 ± 0.12****	34 ± 0.19****	50 ± 0.12****	40 ± 0.08****
4	58.45 ± 0.01****	34.4 ± 0.11****	47.44 ± 0.12****	56.43 ± 0.08****	44 ± 0.08****	53.44 ± 0.19****	50 ± 0.16****
6	63.05 ± 0.06****	46.54 ± 0.1****	55.12 ± 0.08****	58.04 ± 0.04****	50.83 ± 0.1****	55.03 ± 0.11****	58.75± .05****

Valeurs exprimées en moyennes ± SEM (n = 6), \*\*\*\* p < 0.0001.

**Tableau 11** : Inhibition de l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats (en %) par l'extrait aqueux de la partie aérienne (EAPA) et racinaire (EAR) d'*A. microcarpus*

t (h)	Diclofénac (20 mg/Kg)	EAPA d' <i>A. microcarpus</i> (mg/Kg)			EAR d' <i>A. microcarpus</i> (mg/Kg)		
		100	300	500	100	300	500
1	29.08 ± 0.13****	26.88 ± 0.04****	27.09 ± 0.02****	26.23 ± 0.02****	9.28 ± 0.06****	23.49 ± 0.16**	14.39 ± 0.03***
2	40.96 ± 0.02****	30.61 ± 0.08****	30.01 ± 0.07****	33.44 ± 0.11****	27.30 ± 0.14****	30.69 ± 0.07****	29.62 ± 0.08****
3	61.62 ± 0.1****	31.25 ± 0.07****	47.06 ± 0.27****	48.38± 0.22****	50.77 ± 0.17****	52.93 ± 0.02****	56.19 ± 0.04****
4	58.45 ± 0.01****	40.65 ± 0.07****	55.51 ± 0.11****	59.84 ± 0.05****	58.91 ± 0.03****	56.62± 0.07****	60.57 ± 0.06****
6	63.05 ± 0.06****	50.57 ± 0.06****	56.73 ± 0.09****	61.69 ± 0.09****	60.64 ± 0.04****	63.78± 0.05****	64.93 ± 0.05****

Valeurs exprimées en Moyenne ± S.E.M (n = 6), \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

La carragénine, un polysaccharide sulfaté linéaire induit un œdème local qui atteint son maximum après 4 h. Le mécanisme moléculaire de cette inflammation est caractérisé par la libération de plusieurs médiateurs qui sont à l'origine du processus inflammatoire (Ouedraogo *et al.*, 2012). Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale d'environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, alors qu'au cours de la deuxième phase (1 h 30 min - 3 h) la bradykinine est libérée. La biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Alam *et al.*, 2011 ; Sharififar *et al.*, 2012).

Dans la présente étude, les extraits méthanoliques et aqueux dans les doses (100, 300 et 500 mg/kg) sont à l'origine d'effets anti-inflammatoires se traduisant par une réduction très significative de l'œdème de la patte induit par la carragénine à partir de la deuxième heure jusqu'à la sixième heure de l'expérimentation. Ces résultats peuvent traduire la présence de substances actives sur les médiateurs communs à l'inflammation et au processus douloureux comme l'histamine, les prostaglandines (Iwalewa *et al.*, 2007). Sachant toutefois que la plupart des anti-inflammatoires sont cliniquement efficaces dans la deuxième phase de l'inflammation (Olajide *et al.*, 2000 ; Mehmood *et al.*, 2016). En effet, Il est noté que l'effet des extraits est plus prononcé après 4 h quelque soit la dose utilisée. La richesse des extraits méthanoliques et aqueux en constituants phénoliques pourraient en partie expliquer ces activités. Les tanins et les flavonoïdes contribuent à cet effet anti-inflammatoire en inhibant la production de médiateurs pro-inflammatoires tel que les leucotriènes, et les prostaglandines (Silva *et al.*, 2007).

En fait, *Asphodelus microcarpus* contient des flavonoïdes aglycones (Kaempferol, quercétine, myricétine), des flavonoïdes glycosylés, des stéroïdes aglycones ( $\beta$ -sitostérol) et des stéroïdes glycosylés (Perihan *et al.*, 2015). Selon Kim et ses collaborateurs (2006), l'acide

gallique et ses dérivés sont responsables de l'inhibition de l'activation du p38 MAPK, et de la fixation du NF- $\kappa$ B, essentiels pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6. En plus, les tannins ont la capacité d'inhiber la phospholipase A2, conduisant à l'inhibition des leucotriènes et des prostaglandines (Glaser *et al.*, 1995; Chandra *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

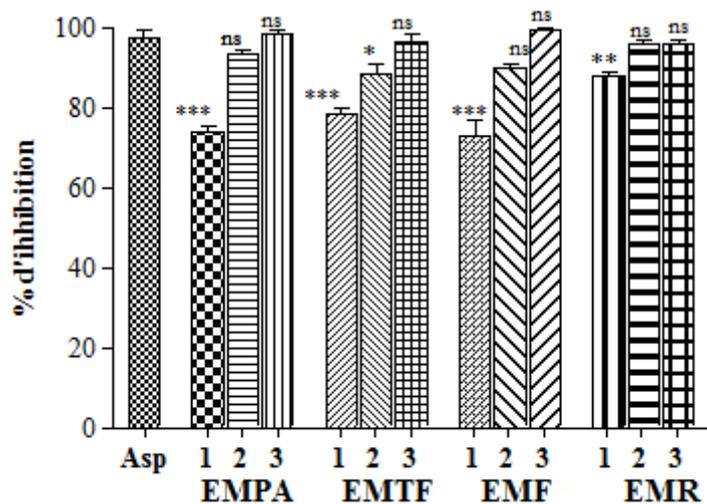
Baiju et ses collaborateurs (2015), ont découvert que l'extrait méthanolique de *Punica granatum* inhibait de manière significative la formation d'œdème de manière dose-dépendante. La dose de 500 mg/kg montrait un effet inhibiteur de 70,7 % pour le modèle induit par la carragénine (Ajaikumar *et al.*, 2003). En outre, nos résultats rejoignent ceux de Razik *et al.* (2016) qui indiquent que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des racines d'*Asphodelus microcarpus* peut s'expliquer en partie par la présence des polyphénols. De plus, de nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables de l'inflammation, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (Gallego *et al.*, 2007). De plus, Kim *et al.*, 2006 ont montré que les flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine et les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine possèdent une activité inhibitrice forte de la cyclooxygénase (COX 2) et à un degré plus faible de la COX-1 (Qa'dan *et al.*, 2011).

### **5.2.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène**

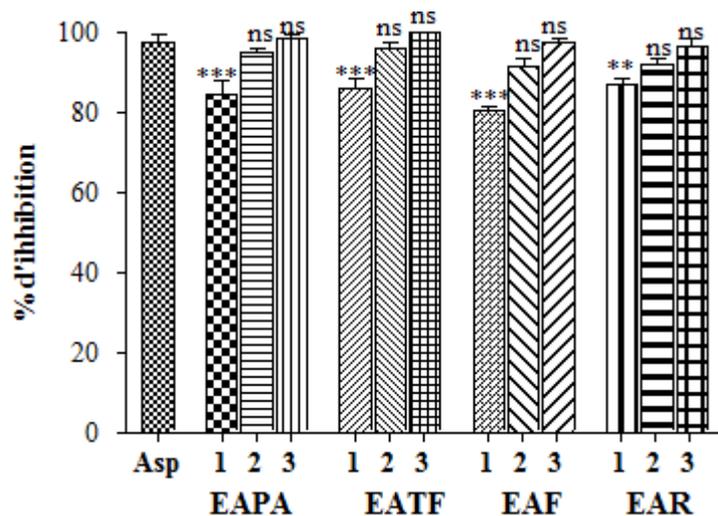
L'effet anti-œdémateux des extraits méthanoliques et aqueux a été investigué en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Les signes de

l'inflammation qui comportent une rougeur et un gonflement, sont apparus chez tous les groupes qui ont subi l'application de xylène sur l'oreille droit après quelques minutes.

Le traitement par 100 mg/Kg, des extraits aqueux (EAR, EATF, EAF et EATF) a induit une atténuation très significative de l'œdème. Les taux d'inhibition sont très proches (87%, 87%, 84 et 82%) respectivement. De même, les extraits méthanoliques ont exercé des inhibitions similaires. Les pourcentages d'inhibitions sont proches à celui obtenu avec l'aspirine utilisé comme anti-inflammatoire de référence (88,74%). Une diminution significative de l'œdème est observée chez les souris du groupe traité par 500 mg/Kg des extraits méthanoliques et aqueux par rapport aux souris traité par la dose 300 mg/Kg (figures 25, 26). Cette diminution correspond à 99, 98, 96 et 96% par les extraits EMF, EMPA, EMTF et EMR, respectivement et à 99, 98, 97 et 96% par les extraits EATF, EAPA, EAF et EAR, respectivement.



**Figure 25:** Effet des extraits méthanoliques (EM) d'*A.microcarpus* sur l'œdème de l'oreille induit par l'xylène chez les souris par rapport à l'aspirine à 100 mg/kg. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EMF : extrait méthanolique feuilles, EMR : extrait méthanolique des racines, Asp : Aspirine, 1: 100 mg/kg, 2: 300 mg/kg, 3: 500 mg/kg, ns : non significatif, \* p < 0.05. \*\* P < 0,01. \*\*\* P < 0,001.



**Figure 26:** Effet des extraits aqueux (EA) d'*A. microcarpus* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris. L'aspirine à 100 mg/kg. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EAF : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines. ASP : Aspirine, **1**: 100 mg/kg, **2**: 300 mg/kg, **3**: 500 mg/kg, Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n=6), **ns**: non significatif, \*\* P < 0,01. \*\*\* : p < 0.001.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un modèle expérimental reproductible et présente une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lu *et al.*, 2006). L'application du xylène sur l'oreille induit une accumulation de liquide conduisant à la formation d'un œdème qui est caractéristique de l'inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007). Dans ce modèle d'inflammation aiguë, la réponse induite par le xylène est caractérisée par un œdème provoqué par une vasodilatation et une infiltration de leucocytes, et plusieurs médiateurs inflammatoires sont libérés (Chen *et al.*, 2012 ; Chibli *et al.*, 2014). L'étude réalisée par Birari et ses collaborateurs (2009) a montré que dans les 30 premières minutes, des amines vasoactives (histamine et sérotonine) sont libérées et sont responsables de la formation de l'œdème. Cependant, la migration des neutrophiles est mise en évidence environ 1 h après l'irritation (Calder, 2006; Nicolaou *et al.*, 2011). La présente étude montre que l'œdème a été inhibé de manière dose-dépendante par les extraits

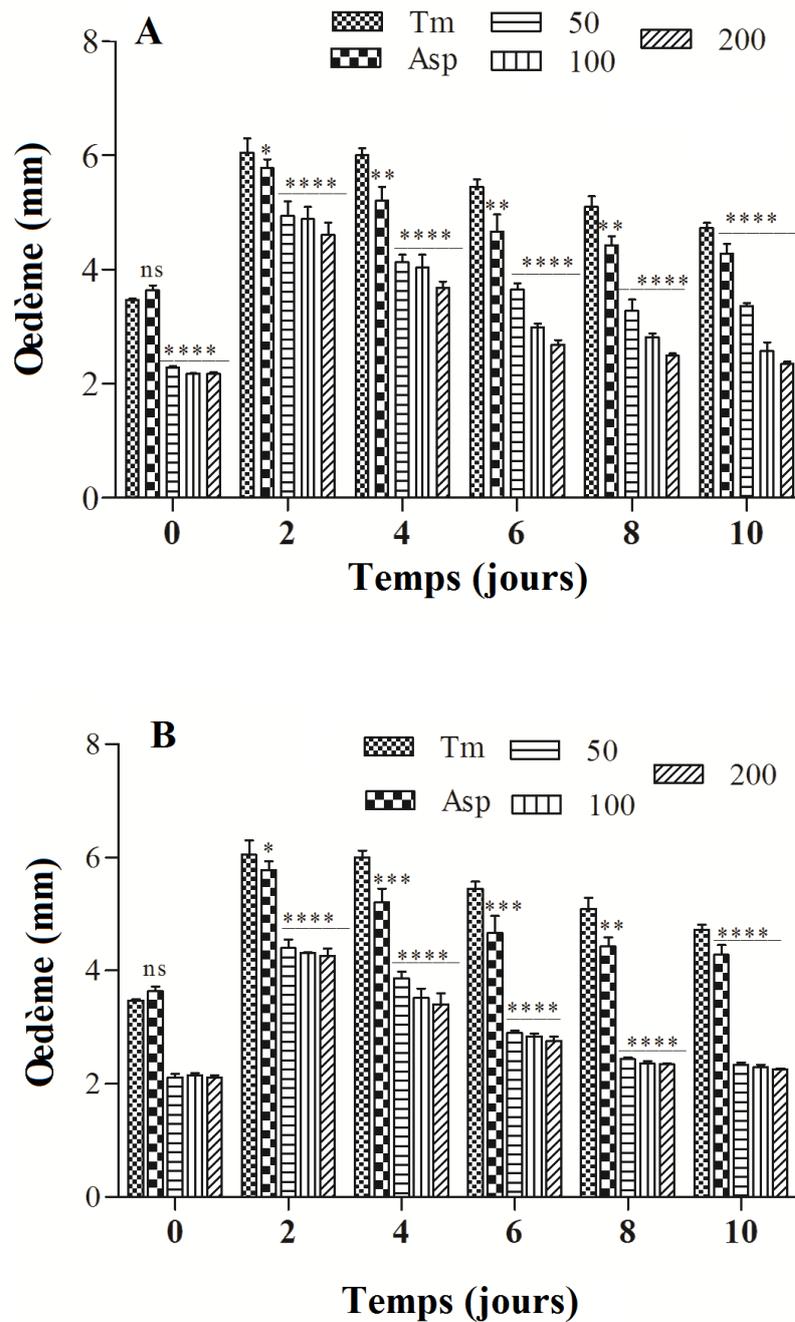
Le mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel le xylène induit l'inflammation met en jeu les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine qui suite à une stimulation, libèrent un nombre de médiateurs qui peuvent initier la réaction inflammatoire. Ce phénomène est connu sous le nom de l'inflammation neurogénique. La substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine sont les principaux initiateurs de l'inflammation neurogénique. Ils induisent une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales (Rotelli *et al.*, 2003), comme ils peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et Vasko, 2003). Les travaux de Shale et ses collaborateurs (1999), rapportent que les extraits aqueux, méthanolique et hexanique des feuilles de *Malva parviflora* inhibent significativement la synthèse des prostaglandines *in vitro*. Dans une autre étude, Shale et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que des fractions de l'extrait dichlorométhanique possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de la cyclooxygénase 2 responsable de la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires. D'une autre part, Afolayan et ses collaborateurs (2008) ont rapporté que la richesse en flavonoïdes joue un rôle dans l'inhibition de l'activité de la COX-2 en plus de leur effet comme inhibiteurs de la transcription du NFκB en inhibant les kinases impliquées dans la transduction du signal (González-Gallego *et al.* 2007).

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux obtenus par Bitencourt *et al.* (2011) qui ont montré que les extraits méthanolique et aqueux de *Caulerpa mexicana* diminuent significativement l'épaisseur de l'oreille induit par le xylène. Une autre étude réalisée par Zhao *et al.* (2018), a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Juniperus Sabina* diminue significativement l'œdème induit par le xylène.

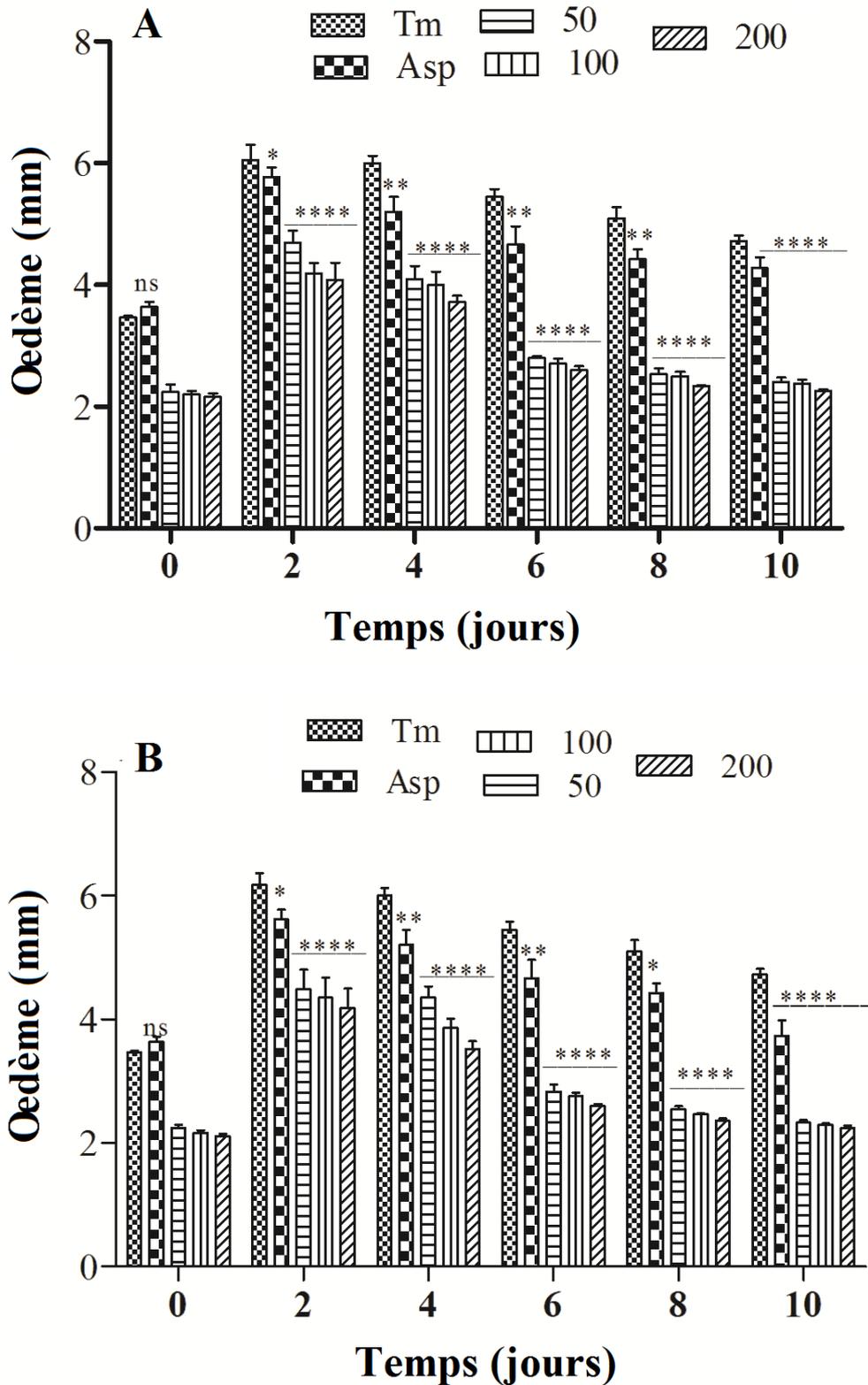
### 5.3. Activité antiarthritique

Les propriétés anti-inflammatoires des extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* ont été évaluées dans un modèle d'inflammation articulaire. L'arthrite induite par le formaldéhyde (2%) chez les rats *Wistar albino* a été choisie. L'œdème des pattes a été induit par une seule injection 100 µL de formaldéhyde, suivi par un rappel au 3<sup>ème</sup> jour. Les signes d'arthrite sont apparus après l'induction de l'inflammation. Les résultats obtenus montrent que l'épaisseur de la patte droite du groupe témoin ont développé après un jour de l'induction de l'œdème, ce dernier caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de la patte de  $6,052 \pm 0,248$  mm. Les autres symptômes de l'inflammation (une rougeur, un gonflement de la patte) étaient moins marqués dans le cas des groupes traités par EMPA, EMR, EAPA et EAR. Le médicament standard (aspirine) utilisée comme anti-inflammatoire de référence montre également une arthrite modérée avec une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de l'œdème de la patte comparé à celui du groupe non traité. La différence de l'épaisseur un jour après l'induction de l'inflammation est de  $5,78 \pm 0,15$  mm. La présence d'effet inhibiteur de ce traitement peut être expliqué par une absorption ou une biodisponibilité rapide des molécules actives des extraits méthanoliques et aqueux.

Les signes arthritiques ont été réduits jour après jour pendant la période expérimentale jusqu'au 10 jour comme le montre les figure 27 et 28. L'épaisseur de la patte enflammée aux jours 2, 4, 6, 8 et 10 et au cours de la période d'expérience ont montré qu'après l'injection de la formaldéhyde une diminution de l'œdème est observée dans tous les groupes même en absence de tout traitement. Cependant, une diminution plus importante est constatée chez les groupes traités par les extraits méthanoliques et aqueux.



**Figure 27:** Effet anti-inflammatoire des extraits EMPA (A), EMR (B) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la formaline. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMR : extrait méthanolique des racines ; Asp: Aspirine, Tm: Témoin. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6), ns: non significatif, \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 ; \*\*\*\* p < 0,0001.



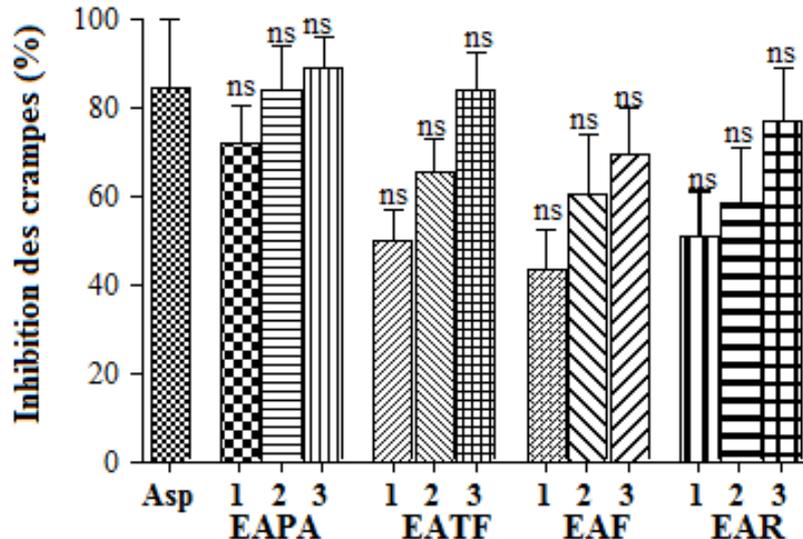
**Figure 28:** Effet anti-inflammatoire des extraits EPA (A), EAR (B) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la formaline. Asp: Aspirine ; Tm: Témoin ; Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6), ns: non significatif, \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 ; \*\*\*\* p < 0,0001.

Le traitement des rats avec les extraits méthanoliques et aqueux a permis de provoquer une diminution significative des signes arthritiques, en comparaison avec celui du groupe arthritique, cette diminution était dose-dépendante. Les traitements avec 100 et 200 mg/kg p.c de EMPA, EMR, EAPA et EAR ont réduit significativement la taille des pattes des rats ( $p \leq 0,0001$ ) à la fin de l'expérience. Ces résultats révèlent l'efficacité des extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* dans la thérapie du modèle de l'arthrite induite par le formaline.

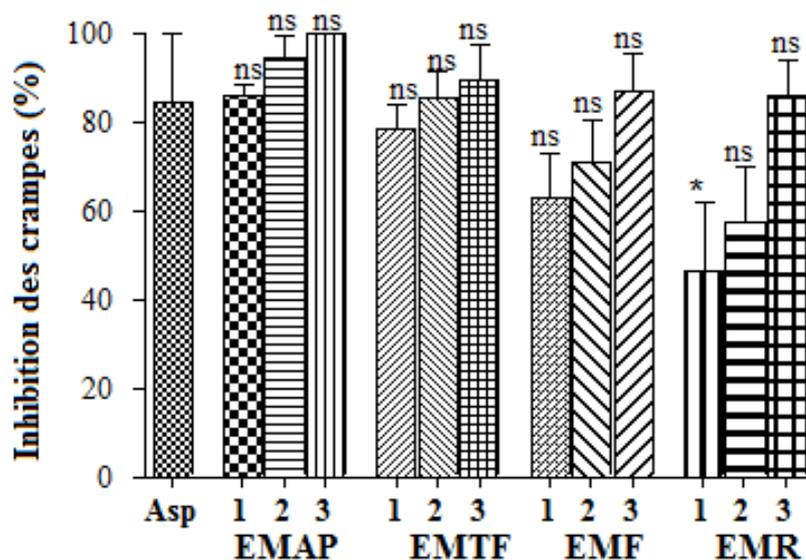
L'augmentation de l'épaisseur de la patte chez le groupe témoin non traité a été plus importante que les groupes traités. Ceci prouve que la formaline a induit une réaction inflammatoire générant un œdème. En effet, l'injection de la formaline provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire induite est bi phasique dont la phase initiale ( $\approx 1$  heure) est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5–3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient après la troisième heure (Reanmongkol *et al.*, 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire facilitant un exsudat de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel, cause de l'œdème localisé et la sensation de la douleur (Mansour, 2015).

## 6. Activité analgésique in vivo

Ce test a été réalisé chez les souris pour étudier l'effet des extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* sur la sensibilité nociceptive périphérique. L'injection intrapéritoniale de l'acide acétique 6% provoque chez la souris une réaction typique de crampes, réaction caractérisée par des vagues de contractions et d'élongation de la musculature abdominale suivies d'une extension des pattes postérieures. Le mécanisme d'apparition de la douleur résulte d'une lésion tissulaire responsable de la libération de nombreux médiateurs chimiques tels que : l'histamine, la prostaglandine et la sérotonine, dans le liquide intrapéritonéal, qui vont stimuler les récepteurs nociceptifs situés au niveau péritonéal (Kouakou *et al.*, 2010). Les résultats du test de Koster représentant le nombre des crampes et les % d'inhibition sont regroupés dans les figures 29 et 30



**Figure 29:** Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* par rapport à l'aspirine à 100 mg/kg. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMTF : extrait méthanolique de tige et fleurs, EMF : extrait méthanolique feuilles, EMR : extrait méthanolique des racines, Asp : Aspirine, 1: 100 mg/kg, 2: 300 mg/kg, 3: 500 mg/kg) ns: non significatif, \*  $p < 0,05$ .



**Figure 30:** Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* par rapport à l'aspirine à 100 mg/kg. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EATF : extrait aqueux de tige et fleurs, EAF : extrait aqueux feuilles, EAR : aqueux des racines. Asp. : Aspirine, 1: 100 mg/kg, 2: 300 mg/kg, 3: 500 mg/kg ; ns: non significatif.

D'après les résultats, on trouve que l'acide acétique induit une moyenne de 130 crampes comptabilisés au bout de 30 minutes chez le lot témoin non traité et de  $5,8 \pm 10,9$  chez les témoins traités par l'aspirine. Le nombre de crampes induites par l'acide acétique a été significativement réduit par les extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* administrés par voie orale. A la dose de 100 mg/kg, les extraits montrent une importante activité analgésique avec un pourcentage d'inhibition de 71, 52, 51 et 40% pour les extraits aqueux (EAPA, EAF, EATF et EAR) et de 83, 78, 63 et 41% ) pour les extraits méthanoliques (EMPA, EMTF, EMF et EMR) largement comparable à l' action de la substance de référence (84,50%). A plus fortes doses (500 mg/kg), l'extrait méthanolique et aqueux de la partie aérienne ont réduit significativement le réflexe des crampes induit par l'AA avec un pourcentage de 100% et 88,61 % respectivement.

Les extraits aqueux et méthanoliques d'*A. microcarpus* aux différentes doses, exerce des effets protecteur vis à vis de la douleur chimique. Les effets analgésiques obtenus avec les différentes doses, sont comparables aux effets analgésiques périphériques de l'Aspirine testé à la dose de 100 mg/kg. Ces résultats sont similaires à ceux obtenu par Hosni *et al* (2019), qui rapportent que l'administration de 25 et 50 mg/kg des extrais méthanoliques des feuilles d'*A.microcarpus* et 200 mg/kg d'aspirine ont exercés un effet protecteur vis-à-vis la douleur provoquée par l'acide acétique. Le puissant effet inhibiteur des contractions abdominales est enregistré avec à la dose plus élevée (63.81%). L'effet analgésique des extraits sont dose dépendant, ceci est en accord avec plusieurs études (Olugbenga *et al.*, 2001 ; Halmi *et al.*, 2016 ; Zeghad *et al.*, 2016). Elisabetsky et ses collaborateurs (1995) rapportent que ces contractions provoquées par l'acide acétique sont dues à la production et à la libération des médiateurs algogènes via les cyclooxygénases (COX) et la biosynthèse des prostaglandines, notamment la PGE2 produite par la COX-1. Ces derniers excitent par la suite les terminaisons nerveuses de la douleur étant donné que la contraction abdominale est liée à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs aux prostaglandines (Chen., 1993). L'administration de l'acide acétylsalicylique (100mg/kg) en traitement préventif aux rats a inhibé de façon significative l'action algogène de l'acide acétique, en inhibant la formation des médiateurs de la douleur dans les tissus périphériques, car elle inhibe l'activité de la COX-1 et de la COX-2 (Hirose *et al.*, 1984). A partir des résultats obtenus, on peut conclure que l'extrait de *C.arabica* possède une activité analgésique. On peut postuler que cette activité pourrait être attribuée à différents constituants présents dans l'extrait, qui pourrait exercer leur effet analgésique au niveau central et/ou périphérique.

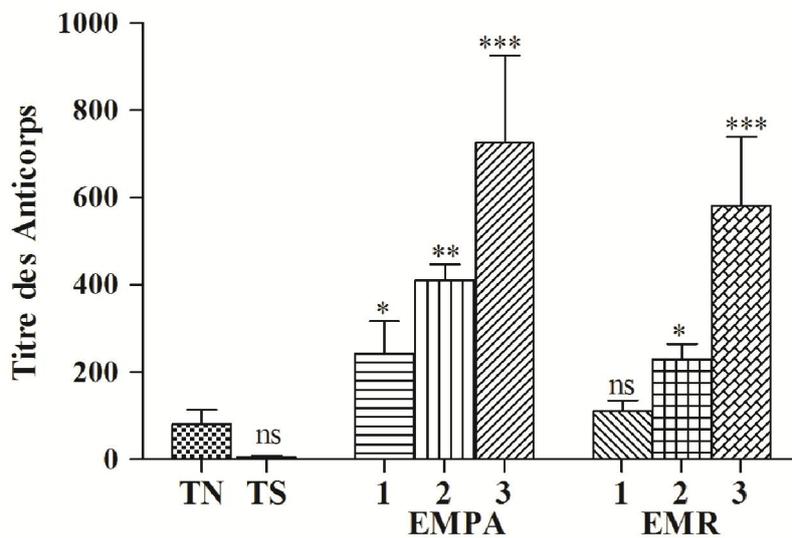
Des études précédentes utilisant des souris *Swiss Albinos* ont rapporté que des extraits hydroalcooliques (100 à 400 mg/Kg, p.c) des espèces du genre *Cleome*, en l'occurrence de *Cleome viscosa*, et *Cleome rutidosperma*, possèdent un effet analgésique (Parimala Devi *et*

*al.*, 2003 ; Bose *et al.*, 2007,). Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique de *Cleome arabica* a révélé la présence de phytoconstituants, comme les alcaloïdes, flavonoïdes (quercétine, apigénine, kaempférol), et triterpènes (Ajaiyeoba *et al.*, 2008, Nsonde-Ntandou *et al.*, 2010). Ces constituants sont susceptibles d'être responsables de l'effet analgésique observé à travers les trois tests de l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica*.

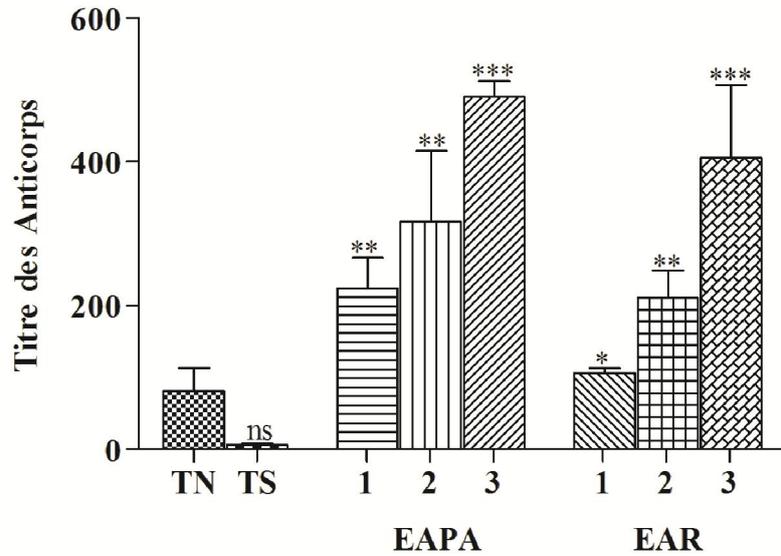
Ces résultats indiquent que *A. microcarpus* exerce un effet protecteur (analgésique) *vis-à-vis* de la douleur chimique. Les extraits méthanoliques seraient un bon analgésique surtout périphérique en agissant sur la synthèse des prostaglandines pour la voie périphérique (Michèle *et al.*, 1976 ). Ceci confirme les résultats obtenus par Liu *et al.* (2014). L'activité analgésique périphérique des différents extraits serait due à la présence des composés phénoliques et des alcaloïdes. Ces composés sont en effet connus, comme doués de propriétés analgésiques dans d'autres plantes médicinales comme *Jasminum amplexicaule* et *Elephantopus tomentosus* (Jia *et al.*, 2008; Yam *et al.*, 2009). Le mécanisme de l'action analgésique pourrait être basé sur l'inhibition des cyclo-oxygénases, les lipo-oxygénases et la production des deux prostaglandines (PGE<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub>α) et médiateurs inflammatoires (Dou *et al.*, 2004; Chavan *et al.*, 2010).

## 7. Effets immunomodulateurs *in vivo*

Le titre des anticorps dirigés contre des globules rouges des moutons (SRBC) déterminé par hémagglutination (HA) est utilisé pour évaluer la réponse immunitaire humorale. Les résultats (figure 31 et 32) ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux de la plante *A. microcarpus* augmentent significativement le titre des anticorps chez les souris traitées avec 200 mg/ml de EM PA (725  $p < 0.001$ ), EMR (581  $p < 0.001$ ), EAPA (490  $p < 0.001$ ) et EAR (405  $p < 0.001$ ) en comparaisant avec le titre du groupe contrôle négatif (81).



**Figure 31:** Effet des extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* sur le titre des anticorps chez les souris. EMPA : extrait méthanolique de la partie aérienne, EMR : extrait méthanolique des racines, TN : Temoin non traité ; TS : Temoin sain (non immunisé) ; 1: 50 mg/kg, 2: 100 mg/kg, 3: 200 mg/kg, Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). ns: non significatif, \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 32:** Effet des extraits aqueux d'*A. microcarpus* sur le titre des anticorps chez les souris. EAPA : extrait aqueux de la partie aérienne, EAR : aqueux des racines, TN : Temoin non traité ; TS : Temoin sain (non immunisé) ; 1: 50 mg/kg, 2: 100 mg/kg, 3: 200 mg/kg) ns: non significatif .Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*\* P <0,001, \*\* P <0,01.

Ce travail met en évidence pour la première fois certaines applications thérapeutiques de l'espèce *Asphodelus microcarpus*. Cette étude a porté sur l'évaluation de deux modes d'extractions, aqueux et méthanolic, dans le but de démontrer l'efficacité optimale de ces extraits sur le plan immunitaire. Nos résultats ont démontré de très intéressants effets immunomodulateurs des extraits aqueux et méthanoliques (EAPA, EAR, EMPA et EMR) d'*A.microcarpus*, particulièrement à 100 et 200 mg/kg. Nous avons noté un effet immunostimulateurs dose dépendant. Les valeurs élevées du titre d'anticorps hémagglutinants obtenu par les différents extraits de la plante ont indiqué que l'immunostimulation a été obtenue par immunité humorale. Dans ce système, lorsque les lymphocytes B se lient à l'antigène étranger, ils se multiplient par mitose, puis se transforment et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps. Ces anticorps sont impliqués dans les mécanismes

d'élimination de l'antigène à savoir; l'activation du complément, l'opsonisation, la neutralisation des toxines, etc. (Miller *et al.*, 1991). Dans la présente étude, les extraits de la plante peut être capables d'influencer l'activation des macrophages et de LT et LB sous-ensembles de lymphocytes impliqués dans la synthèse d'anticorps (Benacerraf, 1978) qui donnent le titre d'agglutination plus élevé contre le SRBC. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Vaghasiya et ses collaborateurs (2010), qui rapportent que l'extraits methanolic et aqueux d'*Ocimum sanctum* ont la capacité de stimuler la réponse humorale a la dose 200mg/kg. Anarthe *et al.*, (2014), ont démontré la capacité de l'extrait méthanolique de *Trigonella foenum graecum* à produire d'anticorps hémagglutinants contre le SRBC , ont indiqué que l'immunostimulation a été obtenue par immunité humorale. Par conséquent. Les agents immunomodulateurs d'origine végétale renforcent la réactivité immunitaire de l'organisme contre pathogène en activant le système immunitaire (Vaghasiya *et al.*, 2010).

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales fréquemment utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, se sont vues reconnaître un effet thérapeutique au cours des siècles. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'isolement et à l'identification de principes actifs. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire une étude ethnobotanique qui a abouti au choix d'*Asphodelus microcarpus* pour la réalisation de l'étude. Ce travail rentre dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel de la région de Tebessa. Après extraction l'analyse quantitative et qualitative des composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique est effectuée. Les activités antioxydante, anti-inflammatoire et immunomodulatrices sont évaluées.

Une enquête ethnobotanique réalisée auprès des herboristes et des tradipraticiens a permis d'inventorier les plantes médicinales utilisées dans la région de Tebessa. Cette enquête a permis de connaître les différents usages populaires de ces plantes. *Asphodelus microcarpus* représente l'une des plantes largement utilisées dans la région.

L'analyse phytochimique a montré que les extraits méthanoliques d'*A. microcarpus* renferment les teneurs les plus élevées en polyphénols et flavonoïdes. Leurs profils chromatographiques ont révélé une grande diversité des molécules détectées.

Plusieurs techniques *in vitro* ont révélé que les extraits méthanoliques et aqueux présentent un intérêt potentiel par leurs activités antioxydantes.

L'étude de la toxicité aiguë de cette plante a permis de conclure que les extraits méthanoliques et aqueux d'*A. microcarpus* ne présentent aucune toxicité à la dose de 2 g/kg du poids corporel.

L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été examinée sur différents modèles. L'inhibition du développement de l'œdème de l'oreille induit par le xylène a montré que les

extraits administrés par voie orale de 500 mg/kg d'EMPA et EMF ont montré une inhibition significative de 99%. Cet effet était d'ailleurs confirmé sur le modèle de l'œdème de la patte induit par la carragénine avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 61,69 et 64,93 % d'EAPA et d'EAR, respectivement. De plus, les extraits d'*A. microcarpus* ont montré un effet antiarthritique non négligeable dans l'étude *in vivo* chez les rats avec arthrite expérimentale induite par le formaldéhyde. Une activité immunomodulatrice considérable sur la production des anticorps était observée chez les souris traités avec 200 mg/mL où EMPA a donné un effet meilleur ( $p < 0.001$ ).

D'autre part, *A. microcarpus* a montré une activité analgésique périphérique intéressante à la dose 500 mg/kg avec des pourcentages d'inhibition de 88% et 100% pour EAPA et EMPA, respectivement

Ces résultats supportent l'utilisation d'*Asphodelus microcarpus* en médecine populaire algérienne. La multitude des effets pharmacologiques établis au cours de ce travail, ainsi que l'absence de toxicité du moins aiguë de la plante et l'identification phytochimiques ouvrent des perspectives pour une utilisation thérapeutique rationnelle voir industrielle, et constitue une base pour d'autres études visant à investiguer les mécanismes d'action.

A l'issue de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, et étudier les mécanismes d'action sur les médiateurs inflammatoires, les enzymes impliquées dans la production des ROS et sur les systèmes antioxydants *in vivo*. Le mécanisme par lequel les extraits de la plantes induisent l'immunomodulation est inconnu et nécessite des études plus approfondies si ceux-ci doivent être inclus dans la liste d'agents thérapeutiques. L'effet antiarthritique sur d'autres modèles mimant l'arthrite rhumatoïde humaine, comme l'arthrite induite par le collagène type II, serait d'une grande importance.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Afolayan AJ, Aboyade OM, Sofidiya MO, (2008). Total phenolic content and free radical scavenging activity of *Malva parviflora* L (malvaceae). *Journal of Biological Sciences*, 8: 945-949.
- Aichour R, Benzidane N, Arrar L, Charef N, Baghiani A, (2018). Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of Algerian *Capparis spinosa*. L. *Annual Research & Review in Biology*, 25(3): 1-12.
- Aichour R, Charef N, Baghiani A, Arrar L, (2016). Immunomodulatory effects of Algerian caper. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2): 51-54.
- Ait El cadi M, Makram S, Ansar M, Khabbal Y, Alaoui K, Faouzi MA, Cherrah Y, Taoufik J, (2012). Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 70(2):113-116.
- Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Baiju EC, Padikkala J, ( 2003) .The inhibition of gastric mucosal injury induced by aspirin and ethanol by *Punica granatum* Linn (Pomegranate) methanolic extract Amala. *Reseach Bulletin*, 23: 153-161.
- Ajaiyeoba EO, Ashidi JS, Okpako LC, Houghton PJ, Wright CW, (2008). Antiplasmodial compound from *Cassia siamea* stem bark extract. *Phytotherapy Research*, 22:254–255.
- Al Kayali R, Kitaz A, Haroun M, (2016). Antibacterial activity of *Asphodelin lutea* and *Asphodelus microcarpus* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 8(12): 1964–1968.
- Alam K, Pathak D, Ansari SH, (2011). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Ammomum subulatum* fruit extracts. *International Journal of Pharmaceutical Science Drug Research*, 3: 35-37.
- Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS, Vale MR, (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57: 919-922.
- Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI, (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42: 665–672.
- Amessis-Ouchemoukh N, Abou-reidah IM, Quirantes-Piné R, Rodriguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, (2014) .Tentative characterisation of Iridoid, phenylithanoid glucosides and flavonides derivatives from *Globularia alypum* L (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS .*Phytochemical Analysis*, 25(5):389-98.

- Amić D, Amić DD, Bešlo D, Trinajstić N, (2003). Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica. Chemica Acta*, 76 (1): 55-61.
- Anarthe S J, Sunitha D, Sandhya R, Ganga Raju M, (2014). Immunomodulatory Activity for Methanolic Extract of *Trigonella foenum graecum* Whole Plant in Wistar Albino Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(9): 1081-1092.
- ANAT (Agence nationale d'aménagement du territoire wilaya de Tébessa), 2003.
- Antony S, Kuttan R, Kuttan G, (1999). Immunomodulatory activity of *curcumin*. *Immunology Investigations*, 28:291-303.
- Arrar L, Benzidane N, Krache I, Charef N, KhennoufS, Baghiani A, (2013). Comparison between Polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis Spinosa L.* *Pharmacognosy Communication*, 3(2): 70–74.
- Ashley NT, Weil Zachary M, Nelson Randy J, (2012). Inflammation: mechanisms, costs a natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution and systematic*, 43:385-406.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S, (2014). Lipid peroxidation: Production, Metabolism and signalling mechanisms of malondialdéhyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal Oxid. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014: 1-41.
- Baghiani A, Ameni D, Boumerfeg S, Adjadj M, Djarmouni M, Charef N, Seddik Khennouf S, Arrar L, (2012). Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis Spinosa L.* *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(1): 25-32.
- Bahorum T, (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentially. *Food and Agricultural Research council Mauritas*, 83-94.
- Baiju EC, Jeslin T, Padikkala J, (2015). Free radical scavenging and anti-inflammatory activities of *Punica granatum* Linn Fruit rind Research & Reviews: *Journal of Biology*, 3 (4): 12-15.
- Banerjee S, Sur TP, Mandal S, Das PC, Sikdar S, (2000). Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 32: 21-24.
- Barouki R, (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine Sciences*, 3(22): 266-272.
- Beckman KB, Ames BN, (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 :547-581.
- Bellakhdar J, (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Revue d'histoire de la Pharmacies*, 320 : 465-466.

- Benacerraf B, (1978) .A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of region specific genes in macrophages and B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 120: 1809-1812.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA, (2008). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4505–4515.
- Benbrook C M, (2005). Accroitre la teneur antioxydants des aliments grâce à l’agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed.The organic center for education & promotion: 6-8
- Benzidane N, Charef N, Krache I, Baghiani A, Arrar L, (2013). *In Vitro* Broncho relaxant Effects of *Capparis Spinosa* Aqueous Extracts on Rat Trachea. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (09): 085-088.
- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD, (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82:390-393.
- Bhourri W, Derbel S, Skandrani I, Boubaker J, Bouhlel I, Sghaier MB , Kilani S, Mariotte AM, Dijoux-Franca MG, Ghedira K , Ghedira LC, ( 2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia Lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*, 24: 509-515.
- Bidaut-Russell M, (2001). Adverse gastrointestinal effects of nsaid: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15:739-753.
- Bigendako-polygenis MJ, Lejoly J, (1990). La Pharmacopée Traditionnelle au Burundi In : Ansay M, Thill G, (eds) Pesticides et médicaments en santé animale Rencontre interdisciplinaire Nord-Sud de technologies Presses Univiversitaires de Namur : 425- 442.
- Birari RB, Jalapure SS, Changrani SR, Shid SL, Tote MV, Habade BM, (2009). Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic effect of *Hibiscus Rosa sinesis* linn flower. *Pharmacology online*, 3: 737-747.
- Bose A, Mondal S, Gupta J-K, Ghosh T, Dash GK, Si S, (2007). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome ruidosperma*. *Fitoterapia*, 78:515–520.
- Bouabida H, Djebbar F, Soltani N, (2012). Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: *Culicidae*) dans la région de Tébessa (Algérie). *Entomologie faunistique*, 65: 99-103.
- Bouaziz A, Khennouf S, Abu Zarga M, Abdalla S, Baghiani A, Charef N, (2015). Phytochemical analysis, hypertensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Research journal of Pharmaceutical, Biological and chemical Sciences*, 5 (1): 19–28.

- Bouden I, Aimene W, Elder R, Arrar L, (2017). In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Matricaria pubescens*. *Advances in Environmental Biology*, 11(11): 11-19.
- Boussoualim N, Baghiani A, Krache I, Trabsa H, Khennouf S, Arrar L, (2015). Inhibitory effects of *Anchusa azurea* extracts on xanthine oxidase activity and its hypouricemic effects on mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8): 195-199.
- Bovy A, (2004). Modification of flavonoids biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65: 2631-2648.
- Bruneton J, (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Ed Tec & Doc, pp: 1120.
- Bursal E, Gülçin I, (2001) .Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44(5): 1482-1489.
- Calde P C, Newsholme E A, (1993). *Influence of Antioxidant Vitamins on Fatty Acid Inhibition of Lymphocyte Proliferation*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 29(1): 175-183.
- Calder PC, (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(3):197-202.
- Catelan SC, Belentani RM, Marques LC, Silva ER, Silva MA, Caparroz-Assef SM, Cuman R K N, Bersani-Amado CA, (2006). The role of adrenal corticosteroids in the antiinflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats. *Phytomedicine*, 13(6): 446-451.
- Cetkovic G, Canadanovic-Brunet J, Djilas S, Savatovic S, Mandic A, Tumbas V, (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109(2):340-347.
- Chanda S, Dave R, (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: *An overview in African Journal of Microbiology Research*, 3(13): 981-996.
- Chandra J, Ponnappa K, Sadashiva C, Priya B, Nanda B, Gowda T, Vishwanath B, Rangappa K, (2007). Chemistry and structural evaluation of different phospholipase a2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Curr Topics in Medicina Chemistry*, 7(8): 787-800.
- Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB, (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L bark. *Phytomedicine*, 17(2): 149-151.

- Bendjeddou D, Lalaoui K, Satta D, (2003). Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3) 155-160.
- Chen BT, Li WX, He RR, Li YF, Tsoi B, Zhai YJ, Kurihara H, (2012). Anti-inflammatory effects of polyphénols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012:1-7.
- Chen Q, (1993). Methodology in pharmacological study on Chinese materia medica: 7 People's Medical Publishing House, Beijing, pp 360.
- Chermat S, Gharzouli R, (2015). Ethnobotanical study of medicinal flora in the north east of Algeria - an empirical knowledge in Djebel Zdim (Setif). *Journal of Material Science and Engineering*, 5(1-2): 50–59.
- Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC, (2003). Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Medica*, 69(7): 600-604.
- Chibli LA, Rodrigues KC, Gasparetto CM, Pinto NC, Fabri RL, Scio E, Alves MS, Del-Vechio-Vieira G, Souza OV, (2014). Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethno pharmacology*, 154: 330-338.
- Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F, (1970). Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature*, 225: 943-944.
- Choi S, Chung M-H, (2003). A review of the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, 1: 53-62.
- Comhair SAA, Erzurum SC, (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American journal of Physiology lung Cellular and Molecular Physiology*, 283: 246-255.
- Conforti F, Silvio S, Mariangela M, Federica M, Giancarlo AS, Dimitar U, Aurelia T, Francesco M, Roberto DL, (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 144–151.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D, (2001). Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological Reviews*, 53 (1): 135-159.
- Da Silva S, Calgarotto A, Chaar J, Marangoni S, (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia Sylvestris Sw* aqueous extract with antipla2 activity. *Toxicon*, 52:655-666.

- Das NU, (2011). Inflammation. Chapitre 3. *In: Molecular Basis of Health and Disease*. Springer. New Work. pp. 15-100.
- De Medina F, Sanchez F, Posadas O, Lopez R, Romero-Calvo C, Mascaraque G, Daddaoua A, Perez R, Gonzalez Herrera MM, Gonzalez GH, Martinez-Plata E, Ortega M, Suarez Zarzuelo A , Martinez-Augustin O, (2009). The intestinal anti-inflammatory activity of the flavonoid rutin requires oral administration and may involve effects on mucosal lymphocytes. *Clinical Nutrition Supplements*, 4(2):49.
- Di Petrillo A, Fais A, Pintus F, Buelga CS, Params AMG, Piras V, Orru G, Mameli A, Tramontano E, Frau A, (2017). Broad-range potential of *Asphodelus microcarpus* leaves extract for drug development. *BMC Microbiology*, 17 (159): 1–9.
- Dobravalskyte D, Venskutonis PR and Talou T, (2012). Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. *Food Chemistry*, 135:1539-1546.
- Dorward DA, AG, Lucas CD, Rossi Haslett C, Dhaliwal K, (2012). Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics*, 135: 182-199.
- Dou W, Jiao Y, Goorha S, (2004). Nociception and 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 Other Lipid Mediat*, 74: 29-43.
- Dröge W, (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review*, 82 (1): 47-95.
- Duwiejua M, Zeitlin I J, (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In : *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni). pp: 153.
- El-Ghaly ESM, (2017). Phytochemical and biological activities of *Asphodelus microcarpus* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (2): 259–264.
- Elisabetsky E, Tânia AA, Albuquerque RR, Nunes DS, CavalhoA, (1995). Analgesic activity of *Psychotria colorata* Muell Arg alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(2): 77-83.
- El rhaffari I, Zaid A, (2002). Pratique de la phytothérapie dans le Sud-est du Maroc (Tafilalet) : un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. *In : Fleurentin J, Pelt JM, Mazars G, Lejosne JC, Cabalion P, (eds) Des sources du savoir aux médicaments du futur : Actes du 4<sup>ème</sup> Congrès Européen d'Ethnopharmacologie, Paris, 293-318.*
- El-kadi A, Kandil O,(1987). The black seed (*Nigella sativa*) and immunity: its effect on human T cell subset. *Federation Proceedings*, 46, 12: 22.

- Evans WJ, (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 647-652.
- Fakchich J, Elachouri M, (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(1):76-87.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C, (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologie*, 331: 372-379.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z, 1986. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 64(2) : 159- 164.
- Favier A, (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 270:108-115.
- Ferreria A, Proenca C, Serralheiro MLM, Araujo MEM, (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 31-37.
- Finaud J, Lac G, Filaire E, (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Médecine*, 36 (4) :327-358.
- Flipo RM, Hatron PY, Devulder B, (1993). Maladies inflammatoires. Masson, Paris. pp 150-165.
- Fontaine E, (2007). Radicaux libres. *In: Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer-Verlag France. pp 251-257.
- Fournier P, (1947). Livre des plantes médicinales et veneneuses de France. Tournon, Paris, p 79.
- Franco D, Sineiro J, Rubilar M, Sánchez M, Jerez M, Pinelo M, Costoya N, Núñez MJ, (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power Electron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7: 3210–3216.
- Ganju L, Karan D, Chanda S, Srivastava KK, Sawhney RC, Selvamurthy W, (2003). Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomedicine. Pharmacotherapy*, 57: 296-300.
- Geng M, Ren M, Liu Z, Shang X, (2012). Free radical scavenging activities of pigment extract from *Hibiscus syriacus L.* petals *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 429- 435.
- Ghedira K, (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Ghaleb GM, (1987). Les plantes dans la médecine traditionnelle Maghébine. Dip. Etudes Comp. *De phytothérapie, Tunis*. pp 8-78.

- Glaser KB Sung MI, Hartman D, Lock YW, Bauer J, Walter T, Carlson RP, (1995). Cellular and topical in vivo inflammatory murine models in the evaluation of inhibitors of phospholipase A2. *Skin Pharmacology*, 8:300-308.
- Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA, Kuby J, (2003). Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed. W. H. Freeman and Company. New York. pp. 382-386.
- Gomes Silva MI, Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moure B A, Amaral J F, Sousa DP, MendesVasconcelosa S M, Sousa FC, (2007). Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 88: 141-147
- González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón M J, (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, 22(3): 287–293.
- Gulcin I, (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3): 345-391.
- Gülçin I, Elmastat M, Aboul-Enein HY, (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21:354 - 361.
- Gupta B, Ghosh B, (1999). Curcuma longa inhibits TNF- $\alpha$  induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Immunopharmacology*, 21:745-757.
- Hale AL, (2003). Screening Potato Genotype for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University-Genetics. pp: 260.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier O, Chapelle JP, (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62 (10): 628- 638.
- Hall Ih, Lee KH, Starnea CO, Sumida Y, Wu RY, Waddeil TG, Cochran JW, Gerhart K G, (1979). Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *Journal of pharmaceutical Sciences*, 68(5): 537-542.
- Halliwell B, (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, 9(1): 1-32.
- Halmi S, Madi A, Zaghed N, Berouel K, Lemoui R, Benlakssira B and Hamdi Pacha Y, (2016). Phytochemical screening and analgesic activity of *Opuntia ficus indica* cladods extract in Wistar rats International. *Journal of Phytomedicine*, 8(2): 282-286.

- Hammouda FM, Rizk AM, Abdelgawad MM, (1971). "Alkaloids of *Asphodelus microcarpus*. Salzm and Viv. *Current Science*, 40(23): 631-632.
- Harborne, JB, Williams CA, (2000). Advances in flavonoids research since 1992. *PhytoChemistry*, 55: 481-504.
- Havsteen BH, (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology, Therapeutics*. 96 : 67– 202.
- Henzen C, (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum Medical Suisse*, 3 (9): 442-446.
- Hergman A E, Riedl KM , Jones GA, Sovik K N , Ritchard NT , Hartzfeld P, Richel TL, (1998 ). Hight molecular weight plant polyphénolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 1887-1892.
- Hirose K, Jyoama H, Kojima Y, Eigyi M, Hatakeyama H, (1984). Pharmacological properties of a new anti-inflammatory agent drug. *Neuroscience Research*, 34: 280-286.
- Hosni H, Taghzouti K, Bounihi A, Bounihi Y, Alaoui K, (2019). Analgesic activity of *Asphodelus microcarpus* leaves extract. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 8 (1) : 297-306.
- Hosseinzadeh H, Ramezani M, Fadishei M, Mahmoudi M, (2002). Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine*, 9(2): 135–141.
- Huang D, Ou B, Prior RL, (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841-1856.
- Igbe F, ChingFP, Eromon A,( 2010). Anti–inflammatory activity of aqueous fruit pulp extract of *Huntera umbellate* K Schum in acute and chronic inflammation. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67:81–85.
- Iwalewa EO, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff GN, (2007). Inflammation: The foundation of diseases and disorders: a review of Phytomedicine of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6 (25): 2868-85.
- Jayathirtha MG, Mishra SH, (2004). Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, 11: 361-365.
- Jia Q, Su W, Peng W, (2008). Anti diarrhoea and analgesic activities of the methanol extract and its fractions of *Jasminum amplexicaule* Buch-Ham (Oleaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 299-304.

- Jia Y, Zhao G, Jia J, (2008). Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing». *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 181-189.
- Jones WP, Kinghorn AD, (2005). Extraction of plant secondary metabolites *In: Natural products isolation. Humana Press* (Totowa), 20(2): 323-351.
- Joseph MM, Aravind SR, George SK, Varghese S, Sreelekha TT, (2013). A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1466-75.
- Julies A, Christin M, (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-44.
- Juyal PD, Singla LD, (2001). Herbal immunomodulatory and therapeutic approaches to control parasitic infections in livestock. India: Department of Veterinary Parasitology. College of Veterinary Science. Punjab Agricultural University. pp 1.
- Kaddem SE, (1990). Les plantes medicinales en Algerie. In: Bouchene, Oued Zenati (Ed.) Kerarho J, Adam JG, (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Vigot frères Ed, Paris, P.138.
- Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB, (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, (2013) .Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.
- Kim HP, Lim H, Kwon YS, (2017). Therapeutic potential of medicinal plants and their constituents on lung inflammatory disorders. *Bio molecules and Therapeutics*, 25( 2 ):91–104 .
- Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Ho Lee S, Shin HY, Kim DK and Shin TY, (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences*, 91 (1): 123-131.
- King A, Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99:213-218.
- Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baricevic D, Kusar A, (2010) .Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53:773-776.
- Kitaz A, (2017). Comparison of the total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of methanolic roots extracts of *Asphodelus microcarpus* and *Asphodeline lutea* growing in Syria. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry Research*, 9 (2):159–164.

- Koehler RC, (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition chimique et métabolisme*, 20(4) :165-177.
- Kohen R, Nyska A, (2002). Oxidation of Biological Systems. Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6): 620-650.
- Kone D, Diop B, Diallo D, Djilani A, Dicko A, (2012). Identification, Quantitative Determination, and Antioxidant Properties of Polyphenols of Some Malian Medicinal Plant Parts Used in Folk Medicine. *Macro to Nano Spectroscopy*, 8 :132-142.
- Koster R, Anderson M, De Beer J, (1959). Acetic acid for analgesic screening, *Federal Proceeding*, 8:412–417.
- Kouakou S, Kouakou G, Laba ID, Brou J, (2010). Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (*Rubiaceae*), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(2):
- Krache I, Boussoulim N, Trabsa H, Ouhida S, Baghiani A, Arrar L, (2018). Antioxidant, Antihemolytic, Antihyperuricemic, Antiinflammatory Activity of Algerian Germander Methanolic Extract. *Annual Research & Review in Biology*, 23(5): 1-14.
- Kumar V, Abul K A, Nelson F, Richard M, (2007). Robbins Basic Pathology, 8<sup>th</sup> Edition, Elsevier, Philadelphia, 20-60.
- Laroche F, (2014). Douleur chronique. Thérapies comportementales et cognitives. *Annales Médico-Psychologiques*, 172 : 132-135.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW, (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53: 597-652.
- Le K, Chiu F, Ng K, (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105(1):353-363.
- Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY, (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6516–6520.
- Lin JK, Weng MS, (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In: *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, Springer, Pp: 217.
- Lin M, Chen CS, Chen CT, Liang Y, Lin J (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 167-172.
- Lin W-W, Karin M, (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer *Journal of Clinical Investigation*, 117:1175–1183.

- Liyana-Pathirana CM, Shahidi F, (2006). Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 477-485.
- Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, Wu XJ, (2006). Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 245–249.
- Madden K, Flowers L, Salani R, Horowitz I, Logan S, Kowalski K, Xie J, Mohammed SI, (2009). Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. Prostaglandins. *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80: 9-18.
- Maïga A, Diallo D, Fané S, Sanogo R, Paulsen BS, Cissé B, (2005). A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 : 183-193.
- Male D, Roitt Y, Brostoff J, Roth DB, (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: Immunologie. Eds, Masson, Paris, p: 155.
- Malešev D et Kuntić V, (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10): 921-939.
- Malmir M, Serrano R, Canica M, Silva B, Lima BS, Silva O, (2018). A comprehensive review on the medicinal plants from the genus *Asphodelus*: a review. *Plants*, 7(20): 1-17.
- Markham KR, (1982) .Techniques of flavonoid identification Academic press, London Chap1 and 2, 1-113.
- Mathy M, Sanchez C, Priem F, Henrotin Y, (2007). La curcumine inhibe la synthèse d'interleukine-6, d'interleukine-8, de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 par les chondrocytes bovins. *Revue du Rhumatisme*, 74: 10-11.
- Mc Carver BM, (2001). Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 3(6): 269.
- Mehmood A, Hamid I, Sharif A, Akhtar MF, Akhtar B, Saleem A, Iqbal J, Shabbir M, Ali S, (2016). Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of aqueous and ethanolic extracts of seeds of *Buchanania Lanza* Spreng, in animal models. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 73: 1601-1608.
- Middleton EJ, (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmacology*, 34 (5): 344-348.

- Mika A, Minibayeva F Beckett R, Lüthje S,(2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, (3):173-193.
- Miller LE, Ludke HR, Peacock JE, Tomar RH, (1991). Manual of Laboratory Immunology, Lea and Febeiger, London pp 1-18.
- Miwa S, Muller FL, Beckman KB, (2008). The Basics of Oxidative Biochemistry. *In: Oxidative Stress in Aging, Aging Medicine*. Ed. S. Miwa, K.B. Beckman, and F.L. Muller, Humana Press, Totowa, Ney Jersey, p. 11.
- Morebisea O, Awe EO, Makind JM, Olajided OA, (2001). Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chasmanthera dependens* leaf methanol extracts. *Fitoterapia*, 72(5): 497-502.
- Mukhopadhyay D, Dasgupta P, Roy DS, Palchoudhuri S, Chatterjee I, Ali C, Dastidar SG, (2016). A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1, 10-Phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*, 6:124-132.
- Nagar A, Sharma V, Chhipa AS, (2017). Role of antioxidants in biological system mintage. *Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*. 6: 7-12.
- Nagarathna PKM, Reena K, Reddy S, Wesley J, (2013). Review on Immunomodilation and Immunomodulatory Activity of Some Herbal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 22: 223-230.
- Naidu MM, Shyamala BN, Naik JP, Sulochanamma G, Srinivas P, (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* , 44: 451-456.
- Narui T, Takahashi K, Kobayashi M, Shfbata S, (1980). A polysacchahde produced by laboratory cultivation of *Poria cocos* Wolf. *Carbohydrate Research*, 87: 161-163.
- Newman DJ, Cragg G M, (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70: 461–477.
- Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE, (2011). Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chemistry and Physics of lipids*. 164:535-543.
- Nimse S B, Pal D,( 2015 ).Free radical, natural antioxidants and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5: 27986–2800.
- Nsonde-Ntandou GF, Banzouz JT, Mbatchi B, Elion-Itou RDG, Etou-Ossibi AW, Ramos S, Benoit-Vical F, Abena AA, Ouamba JM, (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam Stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127:108–111.

- Odette KM, Simplicite MR, Christopher T, Marcel DY, Roger KJ, (2013). Evaluation of the immunomodulatory activity of the methanol extract of *alchemilla kiwuensis* engl. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 4(5): 349-355.
- Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O, (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* CD Adams. *Journal of Ethnopharmacology* , 109: 219–225.
- Olajide OA, Awe SO, Makinde JM, Ekhelar AI, Olusola A, Morebise O, Okpako DT, (2000 ). Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2): 179-186
- Orban JC, Sibon S, Ichai C, (2007). Ischémie/reperfusion, stress oxydant, pré conditionnement et insuffisance rénale aiguë. Dans: L'insuffisance rénale aiguë, Springer-Verlag France, pp. 85-105.
- Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J, Dijoux MG, Guissou IP, (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir (Fabaceae), *Phytotherapy*. 10:286-292.
- Ozen T, Demirtas I, Aksit H, (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp *skorpilii* var *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124: 58-64.
- Parimala devi B, Boominathan R, Mandal SC, (2003) . Studies on analgesic activity of *Cleome viscosa* in mice. *Fitoterapia*, 74:262–26.
- Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee M G, kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH , Kim SH ,(2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, 31(10):1303-11.
- Pastre J, Priymenko N, (2007). Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158(4): 180-189.
- Patwardhan B, Gautam M. (2005). Botanical immunodrugs: Scope and opportunities. *Drug Discovery Today*. 10: 495–502.
- Payne DNR, Adcock IM, (2001). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2: 145-150.
- Pereira RLC, Ibrahim T, Luchetti L, Da Silva AJR, De Moraes VL, (1999). Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa*. Mc Carver, *Immunopharmacology*. 43: 31-37.

- Perihan G, Lütfiye OD, Zühal G, Ayşe K, Cavit K, (2015). Isolation and Structure Elucidation of Uncommon Secondary Metabolites from *Cistus salvifolius* L. *Record of Natural Products*, 9(2): 175-183.
- Perrot S, Poulain P, Serrie A, Eschalier A, Mick G, Langley P, Pomerantz D, Ganry H, (2013). Description des prescriptions de traitements pharmacologiques à visée antalgique et de leur observance en France : résultats de l'étude épidémiologique *National Health and Wellness Survey* réalisée auprès de 15 000 personnes adultes, *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement*, 14(3) : 119-130
- Pietta PG, (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO, (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 :233-239.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, (2001). Antioxydants in food 1<sup>st</sup> edition Practical Applications , Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 400 .
- Portenoy RK, (2000). Current pharmacotherapy of chronic pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 19: 16-20.
- Prasad KN, Xie H, Hao J, Yang B, Qiu S, Wei X, Chen F, Jiang Y, (2010) . Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour) Skeels] peel. *Food Chemistry*, 118: 62-66.
- Prior RL, Wu X, Schaich K, (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4290-302.
- Psotová J, Lasovsky J, Vicar J, (2003). Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging and Cytoprotective Activities of Six Natural Phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2):147 -153.
- Qian F, Pang HI, Xu XR , ZOU ZY , Dong PC , Xiao X, Wang X , Sun TT, Dou HL, Lin XM, (2012). Effect of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age related macular degeneration. *Ophthalmology*, 119:2290-2297.
- Rahmani S, belboukhari N, cheriti, A, (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles limoniastrum feei (plumbaginacea). *Algerian journal of arid environment "ajae"*, 6(1): 80-86.
- Rang H.P, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, (2012). Pharmacology. 7<sup>th</sup> Ed. Edinburgh. Churchill, Livingstone. pp. 503-511.

- Rankin JA, (2004). Biological mediators of acute inflammation. *Advanced Practice in Acute and Critical Care*, 15(1): 3 -17.
- Rao RR, Nair TB, (1970). Investigations on induction of neutrophilic granulocytosis and toxicity of Cleistanthin-CIBA Go.4350—a new glycoside from *Cleistanthus collinus* (Roxb). *Pharmacology*, 4(6): 347-358.
- Rastelli G, Costantino L, Albasini A, (1997). A model of the interaction of substrates and inhibitors with xanthine oxidase. *Journal of American Chemical Society*, 119(13) :3007-3016.
- Reanmongkol W, Noppapan T, Subhadhirasakul S, (2009) . Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of putranjiva roxburghii wall Leaf extract in experimental animals. *Journal of Natural Medicines*, 63(3), 290-296.
- Rebaya A ,Igueld Belghith S, Cherif Jk , Trabelsi-Ayadi M ,(2016) .Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Rokrose (*Cistus salviifolius*) Leaves and Flowers Grown in Tunisia. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, (2): 327–331.
- Renaud J, Martinoli MG, (2011). Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol dans les neurones dopaminergiques. *Médecine Sciences Amérique*, 1(1): 1–14.
- Richardson J D, Vasko M R, (2003) .Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation Perspectives in Pharmacology, 3(302):839–845.
- Rodrigues E, (2007). Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology*, 111:295–302.
- Rossiter D, (2012). South African medicines formulary (SAMF). 10<sup>th</sup> Ed. Health and Medical Publishing Group. Cape Town, pp. 389-395.
- Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE, (2003) .Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 48:601-606.
- Sagrawat H, Khan Y, (2007). Immunomodulatory Plants: *A Phytopharmacological Review*. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 248-260.
- Sahreen S, Khan MR, Khan RA, (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122: 1205 - 1211.
- Saija A , Scalese M , Lanza M , Marzullo D , Bonina F , Castelli F,(1995). Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes *.Free radical biology & medicine*, 19:481-486.
- Salem M, (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5(13-14):1749-1770.

- Salem M, Hossain M, (2000). Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International Journal of Immunopharmacology*, 22(9) : 729-740.
- Sanchez Samaniego C, Troncoso gonzalez AM, garcia- parrilla MC, quesada granados JJ, Lopez garcia de la serrana H, Lopez martinez MC, (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593 (1): 103-107.
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P, (2011) .A Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *International journal of Pharmaceutical Sciences*, 1: 25-41.
- Sarni-Manchad P, Cheynier V, (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Lavoisier Medecine Sciences, Paris. 2-10.
- Sarri M, Mouyet FZ, Benziane M, Cheriet A, (2014). Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'Sila, Algeria). *Journal of pharmacy and Pharmacognosy Research*, 2 (2):31–35.
- Scartezzini P, Speroni E, (2000). Medicine with antioxidant activity Review on some plants of Indian traditional. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 23–43.
- Schepetkin IA, Quinn MT, (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 6(3): 317-33.
- Schnackenberg CG , (2002). Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282 (2): 335-342.
- Seidel V, (2005) .Initial and Bulk Extraction In: natural products isolation Sarker S D, Latif Z, Gray A I Eds *Humana Press (Totowa)*.
- Sereme A, Millogo-Rasolodimby J, Guinko S, Nacro M, (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des Sciences*, 10 (2): 24-32.
- Setty AR, Sigal LH, (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34: 773-784.
- Shahbazi S, Bolhassani A, (2016). Immunostimulants: Types and Functions. *Journal of Medical Microbiology and Infection Diseases*, 4 (3-4): 45-51.
- Shaikh RU, Pund M, Gacche RN, (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4): 355-361.

- Shale TL, Stirk W A, Staden J, (2005). Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 325–330.
- Shale TL, Stirk WA, Staden J, (1999). Screening of medicinal plants used in Lesotho for antibacterial and anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 347– 354.
- Sharififar F, Khazaeli P, Alli N, Talebian E, Zarehshahi R, Amiri S, ( 2012). Study of antinociceptive and anti-inflammatory activities of certain Iranian medicinal plants. *Journal of International Ethnopharmacology*, 1(1): 19-24 .
- She QB, Ng TB, Liu WK, (1998). A novel lectin with potent immunomodulatory Activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research*, 247(1):106-111.
- Silva MI, d'Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, do Amaral JF, de Sousa DP, Vasconcelos SM, de Sousa FC, (2007). Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 88: 141-147.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I, (2005). Vitamin E, Oxidative Stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25: 151-175.
- Sokol-Letowska A, Oszmianski J, Wojdylo A, (2007).Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, 103:853-859.
- Soro TY, Néné-bi AS, Zahoui OS, Yapi A, Traoré F, (2015). Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(3): 3802– 3813.
- Stocker RS, Keaney JF Jr, (2004). Role of Oxidative Modifications in the rosclerosis. *Physiological Reviews*, 84:1381-1478.
- Strehl A, Spies CM, Buttgerit F, (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clinical and Experimental Rheumatology*,5 (68): 13-18.
- Su X, Duan J, Jiang Y, Shi J, Kakuda Y, (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4): 348-353.
- Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J, (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*, 105: 1268–1275.
- Tawaha F, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T, (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4): 1372-1378.

- Terblanche U, Semakalu CC, Mtunzi F, Pillay M, (2017). Screening of Variables Influencing Extraction Yield of *Cotyledon orbiculata*: 23 Full Factorial Design. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Research*, 9 (3): 303-312.
- Terml J, Smejkal K, (2016). Flavonoids as potent scavenger of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in food science and food safety* , 15:720-738.
- Tiqwari A K, (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*. 81 (9): 1179-1181.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. (2011). *Phytochemical screening and Extraction: Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1):98–106.
- Tréchet P, Jouzeau JY, (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des AINS: Revue Française d'Allergologie, 54 (3) : 212–217.
- Tsang WM, Weyman C, Smith AD, (1977). Effect of Fatty Acid Mixtures on Phytohaemagglutinin-Stimulated Lymphocytes of Different Species. *Biochemical Society Transactions*, 5(1): 153-154.
- Vaghasiya J, Datani M, Nandkumar K, Malaviya S, Jivani N, (2010). Comparative evaluation of alcoholic and aqueous extracts of *ocimum sanctum* for immunomodulatory activity. *International Journal on Pharmaceutical and Biological Research*, 1:25-29.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J, (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M, (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*: 160 : 1–40.
- Van Acker SABE, Van Den Berg DJ, TrompMNL, Griffioen DH, Bennenkom WPV, Van Der Vijgh WJF, Bast A, (1996) .Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids .*Free radical biology & medicine*, 20: 331-342.
- Van Tunen AJ, Mur LA, Brouns GS, Rientra JD, Koes RE, Mol JNM, (1990). Pollen and specific CHI promoters from *Petunia*: Tandem promote regulator of the CHI A gene. *Plant Cell*, 2: 393–401.
- Verlengia R, Gorjao R, Kanunfrec C, Bordin S, De Limat M, Curi R, (2003). Effect of Arachidonic Acid on Proliferation, Cytokines Production and Pleiotropic Genes Expression in Jurkat Cells--a Comparison with Oleic Acid. *Life Science*, 73(23): 2939-2951.
- Verlengia R, Gorjao R, Kanunfrec C, Bordin S, Martins de lima T, Martins EF, Curi R, (2004). Comparative Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Proliferation,

- Cytokine Production, and Pleiotropic Gene Expression in Jurkat Cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 15(11): 657-665.
- Vermerris W, Nicholson R, (2006) .Phenolic compound biochemistry. *Springer*. pp. 69
- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC, (2007). Free radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230-235.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Štefan M B, Alegro A, Kőszegi T , Petrik J (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from. *Croatia. Molecules*,16: 1454- 1470
- Vogt T, (2009). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3: 2–20.
- Von gadow A, Joubert E, Hansmann CF, (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *Agricultural and Food Chemistry*, 45 (3): 632- 638.
- Wagner H, Proksch A, Vollmar A, Kreutzkamp B, Bauer J, (1985). *In vitro* phagocytosis stimulation by isolated plant materials in a chemoluminescence-phagocytosis model. *Planta Medica*, 1: 39-44.
- Waiser SP, Weis AL, (1999).Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 19(1): 65-96.
- Wasser, SP, (2002). Médicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258-274.
- Webster RA, Jordan C, (1989). Neurotransmitters, drugs and disease.1<sup>st</sup> Ed. Blackwell Scientific Publications. Lodon. pp. 301-344.
- Weill B, Batteux F, (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Supérieur, Paris. 12-23.
- Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F, ( 2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705-711.
- Wong SP, Leong LP, William Koh JH, (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Chemistry*, 99: 775-783 .
- Wu SJ, LT Ng, (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn var *abbreviata* Ser) in Taiwan. *LWT-Food Science Technology*, 41: 323– 330.

- Yam MF, Ang LF, Ameer OZ, (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Elephantopus tomentosus* ethanolic extract. *Journal of Acupuncture & Meridian Studies*, 2(4): 280–287.
- Yang X, Zhao Y, Wang H, Mei Q, (2007). Macrophage Activation by an Acidic Polysaccharide Isolated from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 636-643.
- Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka, I (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56 (2): 213- 222.
- Yvan T, (1997). Pharmacologie. 8<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris-Milan-Barcelone, 388 p.
- Zeghad N, Madi A, Helmi S, Belkhiri A, (2016). In vivo analgesic activity and safety assessment of *Vitis vinifera* L and *Punica granatum* L fruits extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9): 1915-1921.
- Zelek L, Latino-Martel P, Pecollo N, Barrandon E, Czernichow S, Galan P, Hercberg S, (2010). Vitamines et micronutriments. In: Aider á vivre après un cancer Oncologie pratique. Springer-Verlag, Paris, 277-282.
- Zellagui A, Gherraf N, Rhouati S, (2013). A Germacrene–D, characteristic essential oil from *A. microcarpus* Salzm and Viv. Flowers growing in Algeria. *International Journal of Biodiversity Science and Management*, 3(1): 108–110.
- Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khennouf S, Arrar L, Musa Abu Zarga MH, Mubarak MS, (2015). Antioxidant and Enzyme Inhibition of *Tamus communis* Furanocoumarins. *Medicinal Chemistry*, 11: 506 -5013.
- Zhang BB, Zhao K, (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant anti-inflammatory effects. *Curr Opin. Food Science*, 8: 33-42.
- Zhang L, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Bailey T, Longvah T, (2013). Immunomodulatory activities of polysaccharides isolated from *Taxillus chinensis* and *Uncaria rhynchophylla*. *Carbohydrate Polymers*, 98(2):1458-65.
- Zhao J, Maitituersun A, Li C, Li Q, Xu F, Liu T, (2018). Evaluation on Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Total Flavonoids from *Juniperus Sabina* Evidence. *Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 1-9.

# **Annexe**

## Annexe 1

### QUESTIONNAIRE D'ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

Fiche N°.....

Date : .....

Nom (herboriste, tradipraticiens).....

Age : .....

Sexe : M / F

Lieu.....

Quelle sont les plantes les plus utilisées pour le traitement des douleurs arthritiques, Eczéma, douleur de l'oreille, maladies de la peau.

PLANTE : Nom Locale .....

- ✓ Quelles utilisations faites-vous de cette plante ?
- ✓ Quelles maladies soigne-t-elle ?
- ✓ Quelles parties récolter (partie aérienne, feuilles, tige fleurs, fleures, écorces de tronc Racines .....)?
- ✓ Quand doit-on récolter ?
- ✓ Faut-il l'utiliser à l'état frais ou sec ?
- Comment procède ton au séchage ?
- Comment se fait la préparation ?
- Quelle quantité de drogue faut-il prendre et dans quel volume d'eau?
- En cas de décoction ou d'infusion quelle est la durée correspondante ?
- Comment utilise-t-on la préparation ?

## المخلص

يهدف العمل الحالي إلى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والمسكنات للألم والمنظمة للمناعة للمستخلصات الميثانولية (EM) المائية (EA) للأجزاء المختلفة من نبتة البرواق *Asphodelus microcarpus*. أظهر تحديد كميات عديدة الفينول والفلافونويدات أن الـ EM أكثر ثراءً بعديدات الفينول والفلافونويدات من EA ، وأجريت ستة اختبارات لدراسة النشاطات المضادة للأكسدة: DPPH ، ABTS ، OH<sup>\*</sup> ، التقاط أيونات الحديد الثنائي، خلاصة الحديد الحديدية و تثبيط الأكسدة المزوجة لحمض لينوليك و β كاروتين، تمت دراسة الآثار المضادة للالتهابات والمنظمة للمناعة في الجسم الحي في نماذج حيوانية، أظهر اختبارا الالتهاب المحرض "Carrageenan Induced Paw Edema: CIPE" و "Xylen Induced Ear Edema: XIEE" أن مستخلصات APME و RME سببت تأثيرًا مهمًا مضادًا للوذمة. أظهر APME ، LME ، SFME و RME تثبيطًا كبيرًا للوذمة في حالة XIEE ، في التهاب المفاصل الناجم عن الفورمالين في رجل الفئران، كشف العلاج تثبيطًا كبيرًا للتورم. أدى التأثير المناعي للمستخلصات إلى التحفيز المناعي لإنتاج الأجسام المضادة في الفئران الممنعة بواسطة خلايا الدم الحمراء للغنم، وأظهرت الدراسة في الجسم الحي تأثيرًا مسكنًا للألم. في الختام، تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذا النبات لعلاج بعض الاضطرابات ذات الصلة بالالتهابات ويمكن أن تكون أساسًا دوائيًا للاستخدام العلاجي للـ *Asphodelus microcarpus* في حالات الالتهاب ونقص المناعة.

**الكلمات المفتاحية:** التنظيم المناعي، مضادات للالتهابات، *Asphodelus microcarpus* ، المستخلصات النباتية، مضادات الأكسدة، مسكنات الألم.

## Résumé

Le travail de la présente thèse vise à évaluer les activités antioxydantes, anti-inflammatoires analgésiques et immunomodulatrices des extraits méthanoliques (EM) et aqueux (EA) des différentes parties d'*Asphodelus microcarpus*. L'estimation des quantités des polyphénols et des flavonoïdes a montré que les EM sont plus riches en polyphénols et flavonoïdes que les EA. Six tests ont été réalisés pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits : DPPH, ABTS, OH<sup>\*</sup> scavenging, chélation du fer ferreux, pouvoir réducteur et β-carotène/acide linoléique. Les effets anti-inflammatoires, antiarthritiques et immunomodulateurs ont été étudiés *in vivo* sur des modèles animaux. Les deux tests d'inflammation induite, 'Carrageenan Induced Paw Edema : CIPE' et 'Xylen Induced Ear Edema : XIEE' ont montré que les extraits APME et RME ont produit un effet anti-œdémogène. Les extraits APME, LME SFME et RME ont montré une inhibition significative de l'œdème dans le XIEE. Dans l'arthrite induite par le formaldéhyde au niveau de la patte des rats, le traitement par les EM et des EA a révélé une inhibition significative du gonflement des pattes. L'effet immunomodulateurs des extraits ont provoqué une immunostimulation significative de la production des anticorps chez les souris immunisées par les globules rouges de mouton. L'étude *in vivo* a montré un effet analgésique périphérique significatif. En conclusion, cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certains désordres liés à l'inflammation et pourrait constituer une base pharmacologique pour l'utilisation thérapeutique d'*Asphodelus microcarpus* dans les cas d'inflammation et d'immunodéficiences

**Mots clés :** Immunomodulation, effets anti-inflammatoires, *Asphodelus microcarpus*, extraits de plante, antioxydants, analgésique.

## Abstract

The present work aims to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and immunomodulatory activities of the methanolic (EM) and aqueous (EA) extracts of the different parts of *Asphodelus microcarpus*, a plant of the Liliaceae family. The determination of the amounts of polyphenols and flavonoids has shown that EM are richer in polyphenols and flavonoids than EA. Six tests were carried out for the study of the antioxidant activity of the extracts: DPPH, ABTS, OH<sup>\*</sup> scavenging, ferrous iron chelation, reducing power and β-carotene / linoleic acid. The anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been studied *in vivo* in animal models. The two induced inflammation tests, 'Carrageenan Induced Paw Edema: CIPE' and 'Xylen Induced Ear Edema: XIEE' showed that APME and RME extracts produced a significant anti-edematogenic effect. APME, LME SFME and RME showed significant inhibition of edema for XIEE. Formaldehyde-induced arthritis in the rat paw revealed that extracts possess significant inhibition of paw swelling. The immunomodulatory treatment by the extracts resulted in significant immunostimulation of antibody production in mice immunized with sheep red blood cells. The *in vivo* study showed a significant peripheral analgesic effect. In conclusion, this study supports the traditional use of this plant for the treatment of certain inflammation-related disorders and could provide a pharmacological basis for the therapeutic use of *Asphodelus microcarpus* in cases of inflammation and immunodeficiency.

**Key words:** Immunomodulation, anti-inflammatory effects, *Asphodelus microcarpus*, plant extracts, antioxidants, analgesic.