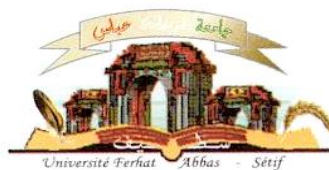


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2020

THÈSE

Présentée par

FERDJIOUI Siham

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

Activités biologiques de deux plantes médicinales *Mentha rotundifolia* L. et *Lamium amplexicaule* L.

Soutenue publiquement le/...../2020

DEVANT LE JURY

Présidente	Sobhi Widad	MCA. UFA Sétif 1
Directeur	Belhattab Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Akkal Salah	Pr. Univ constantine-1
	Zellagui Ammar	Pr. Univ OEB
	Mosbah Asma	MCA. Univ constantine-1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Remerciements

Premièrement, je remercie Allah, qui m'a donné l'ambition, la force, la santé et le courage pour terminer cette thèse. Sans sa providence cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

*Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon promoteur, Professeur **Belhattab Rachid** qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail.*

*Je remercie vivement Mme le **Docteur Sobhi Widad**, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ma thèse et de présider le jury.*

*Ma vive reconnaissance va au **Professeur Akkal Salah**, **Professeur Zellagui Ammar** et **Docteur Mosbah Asma** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Raed M. Al-Zoubi** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au Département de chimie, Université des sciences et de technologie, Jordanie.*

*Il ne me serait pas possible de présenter cette thèse sans témoigner ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à monsieur le Docteur **Luay Abuquatouseh** de l'université El Batraa, Jordanie, et tous les membres de l'équipe de son laboratoire tout particulièrement **Dr Mohammed Malkawy** et son épouse **Dr Shirine, Susan EL wawi, Hamzah S. Issa, Aseel khaled**...pour leur gentillesse et leur aide précieuse.*

*Je n'oublierais pas de remercier Monsieur **Israr Sabri** de l'université Birzeit, Palestine qui a bien éclairé ma lanterne sur les cultures cellulaire et la biologie moléculaire.*

*Je tiens à remercier également le **Professeur Julio Galvez** du département de pharmacologie, université Granada (Espagne) qui m'a permis d'effectuer les analyses de la cytotoxicité dans son laboratoire.*

*Je voudrais également adresser mes remerciements aux docteurs **Ouhida Souria** et **Amrane M.** et à toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie Pathologique et le laboratoire de Biochimie du Centre anti-cancer. CHU. Sétif, et à tous qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.*

Dédicaces

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

*A ma sœur, mes frères, leurs épouses et leurs enfants pour les
sympathiques moments qu'on passe ensemble.*

*A mon mari ZOUHIR pour son soutien sa tendresse et ses nombreux
encouragements.*

A ma belle mère et mes belles sœurs pour leur respect et amour.

*Ainsi qu'à toutes mes amies en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le
réconfort.*

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التركيب الكيميائي ودراسة السمية، النشاط المضاد للأكسدة، التأثير الواقي من التسمم الكبدي و المقاومة للإلتهاب للمستخلصين المائي و الأستوني للنببتين *Mentha rotundifolia* و *Lamium amplexicaule*. أظهرت دراسة التركيب الكيميائي النباتي أن محتوى المستخلص المائي لكلتا النباتين من حيث عديدات الفينول والفلافونويدات أكثر غنى من مستخلص الأسيون، كما كشف التحليل الكيميائي النباتي بواسطة LC-MS/MS أن المركبين الرئيسيين هما: حمض الروزمارنيك و حمض الكلوروجنيك بالنسبة ل *M. rotundifolia* و *L. amplexicaule* على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في الزجاج باستخدام عدة اختبارات: التأثير الإزاحي لجذور ABTS، DPPH، OH⁻، استخلاص أيونات الحديد، اختبار بيتا كاروتين- حمض اللينولييك، اختبار القدرة الإرجاعية. أظهرت النتائج امتلاك المستخلصات الأربعة لنشاط مضاد للأكسدة مهم. كما تم اختبار سمية الهستخلصين المائين على الفئران. لم يظهر كلا المستخلصين أي آثار للسمية بعد 14 يوم من إعطاء جرعات 2 و 5 مغ/كغ. تم تأكيد الدراسة باختبار السمية الخلوية على خلايا Caco2. قيم النشاط الواقي للكبد باختبار السمية المحرصة برباعي كلوريد الكربون، سببت المعالجة الوقائية للفئران بالمستخلصين EAQl و EAQm تحسناً ملحوظاً للمؤشرات البيوكيميائية للبلانزما بالإضافة إلى خفض ملحوظ لإصابات الكبد الناتجة عن سمية رباعي كلوريد الكربون، تم كذلك تقييم النشاط المضاد للإلتهاب حيويًا و في الزجاج بعدة اختبارات. فيما يخص اختبار تخريب البروتينات أظهرت المستخلصات قدرة عالية على حماية ألبيمن المصل. كذلك فيما يخص اختبار وذمة الأذن المحرصة ب Xylène و اختبار انتفاخ الرجل المحفزة ب λ- كراجنين، انخفاض ملحوظ في حجم التورم لوحظ عند العينات المعالجة بالمستخلصين المائين، بينت دراسة النشاط المضاد للألم المحفز بالأستون عند الفئران قدرة عالية للمستخلصات. تم كذلك دراسة تأثير المستخلصات على النشاط المناعي باستعمال الخلايا البالعة حيث لم يتم تسجيل أي تأثير سواء على تكاثر البالعات أو على إنتاجها لحمض النتريك. في الختام، أظهرت نتائج هذه الدراسة غنى النباتين *M. rotundifolia* و *L. amplexicaule* بالمركبات النشطة و التي يمكن استخدامها في تطوير أدوية جديدة لمعالجة أمراض الكبد و الأمراض الالتهابية.

الكلمات المفتاحية: *Lamium amplexicaule*، *Mentha rotundifolia*، عديدات الفينول، LC-MS/MS، مضادات الأكسدة، تسمم الكبد، مضادات الإلتهاب.

Résumé

La présente étude a pour objectifs l'évaluation de la composition phytochimique, la toxicité, les activités antioxydante, hépatoprotectrice et anti-inflammatoire des extraits aqueux et acétonique des plantes *Mentha rotundifolia* et *Lamium amplexicaule*. L'étude phytochimique a montré que les extraits aqueux des deux plantes sont plus riches en polyphénols et flavonoïdes que les extraits acétoniques. L'analyse phytochimique par LC-MS/MS a révélé la présence de l'acide rosmarinique et l'acide chlorogénique comme composés majoritaires chez *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par l'utilisation des tests de scavenging du DPPH, ABTS, l'inhibition du radical hydroxyle, chélation du fer ferreux, blanchissement du β -carotène/acide linoléique, test du pouvoir réducteur. Les résultats obtenus montrent que les quatre extraits sont dotés d'un effet antioxydant important. L'évaluation de la toxicité des extraits aqueux EAqM et EAqL a été conduite sur des souris. Les deux extraits n'ont manifesté aucun signe de toxicité après 14 jours de l'administration des doses de 2 et 5 g/Kg. L'étude *in vivo* est confirmée par le test de cytotoxicité mené sur des cellules Caco2. L'activité hépatoprotectrice est évaluée par le test d'hépatotoxicité induit par le CCl₄ chez le rat. L'administration des extraits EAqM et EAqL a montré une amélioration significative des marqueurs biochimiques plasmatiques ainsi qu'une diminution des signes d'affection hépatique résultant de l'intoxication au CCl₄. L'activité anti-inflammatoire est évaluée *in vitro* et *in vivo* par plusieurs tests. Concernant le test d'inhibition de la dénaturation des protéines, les extraits ont pu protéger significativement la BSA. De même pour le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte induit par la λ -carragénane, une réduction remarquable de l'épaisseur de l'œdème a été observée. L'activité analgésique conduite sur des souris, par le test de torsion induit par l'acide acétique, était appréciable. L'effet immunomodulateur des extraits utilisant la lignée cellulaire de macrophages RAW 264, n'a manifesté aucun effet sur la prolifération ou la production d'oxyde nitrique. En conclusion, les résultats révèlent que les plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* pourraient être exploitées comme source potentielle de composés bioactifs pour développer de nouveaux médicaments naturels pour le traitement de certains troubles hépatiques et inflammatoires.

Mots-clés: *Mentha rotundifolia*, *Lamium amplexicaule*, polyphénols, LC-MS/MS, antioxydants, hépatotoxicité, anti-inflammatoires.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the phytochemical composition, toxicity, antioxidant, hepatoprotective and anti-inflammatory activities of aqueous and acetonic extracts from two plants *Mentha rotundifolia* and *Lamium amplexicaule*. The phytochemical study has shown that the aqueous extracts of the two plants are richer in polyphenols and flavonoids than the acetonic extracts. Phytochemical analysis by LC-MS/MS revealed the presence of rosmarinic acid and chlorogenic acid as major compounds in *M. rotundifolia* and *L. amplexicaule* respectively. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* by different tests, DPPH, ABTS, inhibition of hydroxyl radical, chelation of ferrous iron, β -carotene/linoleic acid- bleaching test and reducing power. The results obtained show that the four extracts have a significant antioxidant effect. The toxicity of aqueous extracts EAqM and EAqL was evaluated in mice. The two extracts did not show any sign of toxicity following 14 days after administration of 2 and 5 g / Kg doses. The *in vivo* study was confirmed by the cytotoxicity test carried out on Caco2 cells. The hepatoprotective activity was evaluated by CCl₄ induced hepatotoxicity test in rats. Administration of EAqM and EAqL extracts has shown a significant improvement in biochemical markers of plasma as well as a decrease in signs of liver alteration resulting from CCl₄. The anti-inflammatory activity was evaluated *in vitro* and *in vivo* by several tests. Concerning the inhibition of protein denaturation test, the extracts were able to significantly protect BSA. Similarly for the xylene-induced ear edema test and λ -carraginan-induced paw edema, a remarkable reduction in the thickness of edema was observed. The analgesic activity carried out on mice by the torsion test induced by acetic acid was appreciable. The immunomodulatory effect of extracts using the RAW 264 macrophage cell line did not show any effect on the proliferation or production of nitric oxide. In conclusion, the results reveal that *M. rotundifolia* and *L. amplexicaule* plants could be exploited as a potential source of bioactive compounds to develop new natural drugs for the treatment of certain liver and inflammatory disorders.

Keywords: *Mentha rotundifolia*, *Lamium amplexicaule*, polyphenols, LC-MS/MS, antioxidants, hepatotoxicity, anti-inflammatories.

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2, 2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS: Anti-inflammatoires stéroïdiens

ALAT: Alanine aminotransférase

ALP: phosphatase alcaline

ASAT: Aspartate transaminase

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: Butylatedhydroxytoluene

Caco-2: Human colon epithelial cancer cell line

COX: Cyclooxygenase

DL₅₀: Dose létale à 50%

DMSO: Diméthyle sulfoxyde

DPPH: 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG: Equivalent d'acide gallique

EAcM: Extrait acétonique de la plante *Mentha rotundifolia*

EAcL: Extrait acétonique de la plante *Lamium amplexicaule*

EAL: Extrait aqueux de la plante *Lamium amplexicaule*

EAM: Extrait aqueux de la plante *Mentha rotundifolia*

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

EQ: Equivalent de quercétine

ERN: Espèce réactive d'azote

ERO: Espèce réactive d'oxygène

CCl₄: Tétracchlorure de carbone

CI₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

LPS : Lipopolysaccharide

Liste des Figures

Figure 1	Sources cellulaires des radicaux libres	03
Figure 2	Classification des antioxydants.....	05
Figure 3	Cytokines inflammatoires, leurs principales sources et cellules cibles.....	18
Figure 4	Photographie de <i>M. rotundifolia</i> récoltée au mois d'Juin 2016 de la région de Djemila Wilaya de Sétif.....	22
Figure 5	Photographie de la plante <i>Lamium amplexicaule</i> récoltée au mois d'Avril 2016 de la région de Djemila Wilaya de Sétif.....	24
Figure 6	Droite d'étalonnage des absorbances relatives en fonction des concentrations d'acide gallique (A) et de quercétine (B).....	38
Figure 7	Chromatogramme des extraits des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> obtenus par HPLC-UV.....	41
Figure 8	Effet piègeur des radicaux DPPH, ABTS et OH [•] par les extraits aqueux et acétoniques des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i>	44
Figure 9	Activités antioxydantes des extraits aqueux et acétoniques des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i>	46
Figure 10	Coupes histologiques du foie de souris traitées par les extraits aqueux des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> et du groupe normaux.....	50
Figure 11	Coupes histologiques du rein de souris traitées par les extraits aqueux des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> et du groupe normaux	51
Figure 12	Effet des extraits EAqM, EAqL, EAqM, EAqL sur la viabilité et la prolifération des cellules Caco-2.....	52
Figure 13	Effet des extraits aqueux de <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> sur quelques paramètres biochimiques des rats intoxiqués par le CCL ₄	55
Figure 14	Coupes histologiques du foie et de rein des rats traités par les extraits aqueux des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i>	57
Figure 15	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA.....	59
Figure 16	Evaluation de l'activité analgésique de l'aspirine et les extraits aqueux de <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> testées par la méthode des torsions abdominales induites par l'acide acétique chez les souris.....	61
Figure 17	Prolifération des macrophages par les extraits aqueux et acétonique des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i> en présence de LPS.....	62
Figure 18	Effet des extraits sur la production d'oxyde nitrique dans les macrophages RAW 264.....	63

Liste des tableaux

Tableau 01	Demi-vie des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène d'intérêt biologique.....	04
Tableau 02	Les médiateurs qui régulent la réponse inflammatoire aigue	14
Tableau 03	Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) selon leur structure.....	20
Tableau 04	Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	39
Tableau 05	Composés phénoliques identifiés par HPLC- UV/MS dans les extraits aqueux et acétoniques des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i>	40
Tableau 06	Variation du poids corporel (mg) des souris traitées avec les extraits des deux plantes.....	48
Tableau 07	Poids relatifs (%) des organes des souris traitées avec les extraits des deux plantes.....	49
Tableau 08	Bilan hépatique et rénale des groupes des souris traitées par les extraits des plantes et le groupe control.....	49
Tableau 09	Effets inhibiteurs des extraits EAqM et EAqL et de l'aspirine sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris.....	60
Tableau 10	changement de l'épaisseur de la patte des rats	60
Tableau 11	Effet inhibiteurs des extraits EAqM et EAqL et l'aspirine sur les contorsions induites par l'acide acétique chez les souris.....	61

SOMMAIRE

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

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Système oxydant, antioxydants et stress oxydant.....	3
I.1. Radicaux libres.....	3
I.2. Source des radicaux libres.....	3
I.3. Types de radicaux libres.....	4
I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	4
I.3.4. Espèces réactives de l'azote (ERN).....	4
I.4. Antioxydants.....	5
I.5. Types d'antioxydants.....	5
I.6. Stress oxydant	6
I.6.1. Conséquences du stress oxydant.....	6
I.6.2. Maladies liées au stress oxydatif.....	6
II. Hépatotoxicité	7
II.1. Généralités.....	7
II.2. Grandes fonctions.....	7
II.3. Principales lésions hépatiques.....	7
II.3.1. Cholestase.....	7
II.3.2. Stéatose.....	8
II.3.3. Nécrose.....	8
II.3.4. Cirrhose.....	8

II.4. Marqueurs hépatiques.....	8
II.4.1. Aminotransférases.....	9
II.4. 2. Phosphatase alcaline.....	10
II.4. 3. Gamma glutamyl transférase.....	10
II.4.4. 5' nucléotidases.....	11
II.4.5. Bilirubine totale.....	10
II.5. Hépatotoxicité induite par le CCl ₄	11
II.6. Rôle du stress oxydant dans le développement des maladies du foie.....	12
III. Inflammation.....	13
III.1. Inflammation aiguë.....	13
III.2. Inflammation chronique.....	14
III.3. Principales cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation.....	15
III.3.1. Neutrophiles.....	15
III.3.2. Macrophages.....	15
III.3.3. Cellules tueuses naturelles (NK).....	15
III.3.4. Lymphocytes.....	16
III.4. Principaux médiateurs de l'inflammation.....	17
III.5. Anti-inflammatoires.....	19
III.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	19
III.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	20
III.6. Inflammation et stress oxydatif.....	21
IV. Plantes étudiées.....	21

IV.1. Généralités.....	21
IV.2. <i>Mentha rotundifolia</i>	22
IV.2.1. Description.....	22
IV.2.2. Nomenclature.....	22
IV.2.3. Classification botanique.....	23
IV.2.4. Composition chimique	23
IV.2.5. Usage traditionnel et activités biologiques/ Activités biologiques	23
IV.2.6. Activités biologiques.....	23
IV.3. <i>Lamium amplexicaule</i>	24
IV.3.1. Description	24
IV.3.2. Classification botanique.....	25
IV.3.3. Composition chimique.....	25
IV.3.4. Activités biologiques	25

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	26
II. Méthodes.....	26
II.1. Préparation des extraits.....	26
II.1.1. Extraits aqueux.....	27
II.1.2. Extraits acétoniques.....	27
II.2. Analyse phytochimique des extraits.....	27
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	27
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	27

II.2.3. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC- MS/ MS).....	27
II.3. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	28
II.3.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	28
II.3.2. Effet scavenger du radical OH [•]	29
II.3.3. Effet scavenger du radical ABTS ^{•+}	29
II.3.4. Chélation du fer ferreux.....	29
II.3.5. Pouvoir réducteur.....	30
II.3.6. Test de blanchissement du β-carotène/acide linoléique.....	30
II.4. Etude de la toxicité.....	30
II.4.1. Test de toxicité aiguë.....	30
II.4.2. Test de cytotoxicité <i>in vitro</i>	32
II.5. Activité hépatoprotectrice <i>in vivo</i>	33
II.5.1. Induction de l'hépatotoxicité par le tétrachlorure de carbone (CCl ₄).....	33
II.5.2. Analyses biochimiques.....	33
II.5.3. Etude histologique.....	34
II.6. Activité anti-inflammatoire.....	34
II.6.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	34
II.6.2. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	34
II.6.3. Activité Analgésique.....	36
II.6.4. Propriétés immunomodulatrices <i>in vitro</i>	36
II.7. Analyse statistique.....	37

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Extraction.....	38
2. Etude phytochimique.....	38
2. 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	38
2.2. Identification des constituants chimiques des extraits par LC-MS/MS.....	39
3. Activité antioxydante.....	43
3.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	43
3.2. Effet scavenger du radical ABTS ⁺⁺	43
3.3. Effet scavenger du radical OH [*]	44
3.4. Chélation du fer ferreux.....	45
3.5. Test du pouvoir réducteur.....	45
3.6. Test du blanchissement du β-carotène/acide linoléique.....	45
4. Evaluation de la toxicité des plantes <i>M. rotundifolia</i> et <i>L. amplexicaule</i>.....	48
4.1. Toxicité aigue <i>in vivo</i>	48
4.1.1. Mortalité et observations des comportements.....	48
4.1.2. Evolution du poids corporel.....	48
4.1.3. Poids relatifs des organes.....	48
4.1.4. Paramètres biochimiques.....	49
4.1.5. Étude histologique.....	49
4.2. Etude de la cytotoxicité.....	52
5. Effet hépatoprotecteur.....	53
5.1. Paramètres biologiques.....	54

5.2. Etude histologique.....	54
6. Activité anti-inflammatoire.....	59
6.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	59
6.2. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris.....	59
6.3. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la λ -carraginanane chez les rats.....	60
6.4. Activité analgésique.....	61
6.5. Activité immunomodulatrices <i>in vitro</i>	62
6.5.1. Effet des extraits sur la prolifération des cellules macrophages RAW 264.....	62
6.5.2. Effet des extraits sur la production d'oxyde nitrique dans les macrophages RAW 264	63
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques.....	68

Introduction

Malgré le développement que le monde a connu au XXI^e siècle dans les différents domaines, la vie et la santé des gens sont toujours menacées par de nombreuses maladies à savoir le cancer, le diabète, les maladies inflammatoires et l'hépatotoxicité...

L'inflammation est une réponse de défense locale pour maintenir l'homéostasie dans les organismes vivants en éliminant les corps étrangers tels que les agents pathogènes microbiens et les cellules anormales. Cependant, un état inflammatoire continu causé par une surproduction des substances inflammatoires entraîne des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (Ishida *et al.*, 2019). Bien que de nombreux médicaments anti-inflammatoires soient utilisés en clinique, y compris les médicaments stéroïdiens et non stéroïdiens, ils sont tous susceptibles de provoquer des effets secondaires indésirables et parfois graves. Par conséquent, le dépistage continu et le développement de nouveaux anti-inflammatoires efficaces sans effets indésirables sont encore nécessaires (Jin-Yao *et al.*; 2016).

Les agents microbiens aussi bien que les xénobiotiques peuvent être à l'origine de l'hépatotoxicité, qui peut être déclenchée d'une manière directe ou via leurs métabolites voire même suite à une réponse à médiation immunologique, comme ils peuvent affecter l'équilibre homéostatique des divers marqueurs biologiques dans les fluides et les tissus corporels (Arika., 2016).

Dans certaines conditions physiologiques, l'équilibre de la balance antioxydants/pro-oxydants peut être perturbé ce qui engendre un stress oxydatif responsable de diverses affections telles que le cancer, pathologies oculaires, maladies neurodégénératives...

Dans un souci de prévention, il convient donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydatif, afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser les défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les espèces réactifs d'oxygène (Zbadi *et al.*, 2018).

La recherche de nouveaux médicaments plus efficaces et sans effets secondaires pour combattre le stress oxydatif et les différentes maladies est devenue un défi majeur des chercheurs. Les plantes ont toujours suscité l'intérêt des chercheurs eu égard à leur richesse en molécules thérapeutiques, propagation dans le monde, diversité, accessibilité, disponibilité en quantités importantes et les informations prises de l'usage traditionnels. C'est pourquoi, le présent travail a été entrepris afin de mettre en évidence les propriétés phytochimiques et

thérapeutiques de deux plantes largement distribuées en Algérie: *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*.

Pour cela, nous avons structuré notre travail comme suit:

- Préparation des extraits et quantification de certains groupes des composés phénoliques.
- Identification des constituants chimiques des extraits par LC-MS/MS.
- Evaluation croisée de l'activité antioxydante *in vitro* par plusieurs tests.
- Evaluation de la toxicité des extraits *in vitro* et *in vivo*.
- Evaluation de l'effet hépato-protecteur à travers quelques paramètres biochimiques et histologiques.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par plusieurs tests.

Partie

Bibliographique

I. Système oxydant / antioxydants et stress oxydant

I.1. Radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme toute espèce chimique (atome, molécule ou ion) qui contient un électron non apparié dans une orbite. Il peut donner ou accepter un électron d'autres molécules, se comportant donc comme des oxydants ou des réducteurs (Lobo *et al.*, 2010).

I.2. Source des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits d'une manière continue dans les cellules au niveau de plusieurs organites cellulaires comme: la mitochondrie, qui représente la source la plus importante, le peroxydosome (au cours de la dégradation des acides gras) et chez les plantes par les chloroplastes (photosynthèse) ... Les réactions de la chaîne respiratoire, l'inflammation, la phagocytose, les voies arachidonates, l'ischémie et l'exercice physique... représentent les principales sources physiologiques. D'autres facteurs externes aident à promouvoir la production des radicaux libres comme : tabagisme, polluants environnementaux, radiations, certains médicaments, pesticides, solvants industriels et ozone... (Lobo *et al.*, 2010; Van den En de *et al.*, 2011) (**figure 1**).

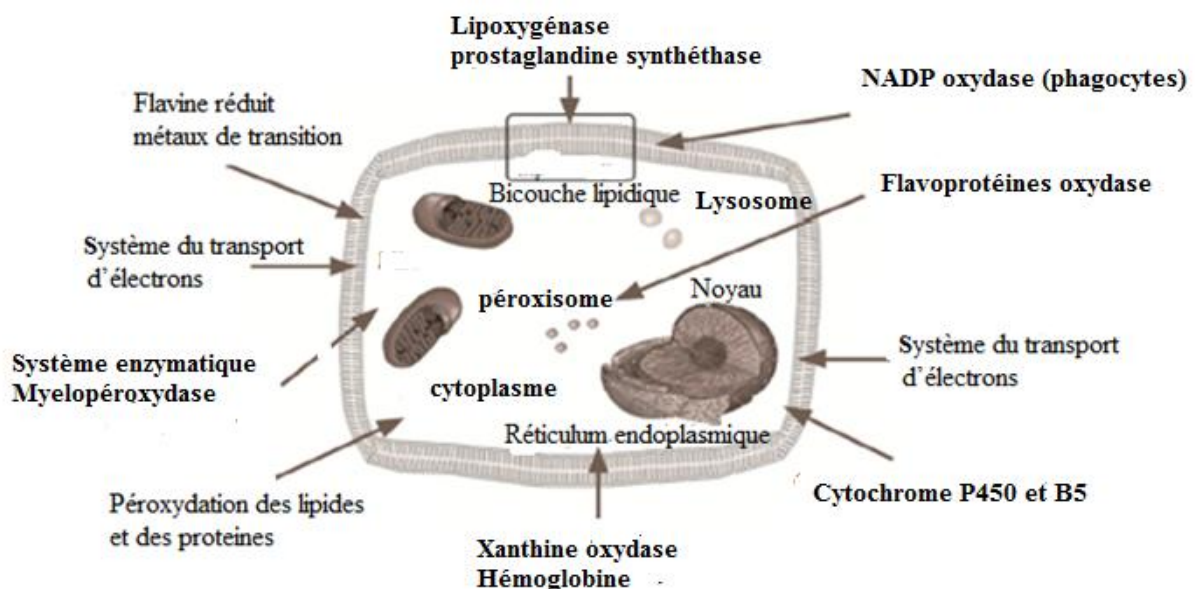


Figure 1: Sources cellulaires des radicaux libres (Perrone *et al.*, 2018).

I.3. Types de radicaux libres

I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Elles comprennent des radicaux dérivés de l'oxygène appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que : le radical hydroxyle (OH \cdot) (le radical le plus réactif), l'anion superoxyde (O $_2^{\cdot-}$), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H $_2\text{O}_2$) et le radical peroxyde (RCOO \cdot)... (Ifeanyi, 2018).

I.3.4. Espèces réactives de l'azote (ERN)

Le radical NO \cdot est produit dans les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes d'azote de L-arginine. Ce processus est catalysé par l'enzyme NO \cdot synthase. Selon le microenvironnement, le NO \cdot peut être converti en diverses autres espèces réactives d'azote (ERN) telles que le cation nitrosonium (NO $^+$), l'anion nitroxyle (NO $^-$), dioxyde de nitrogen (NO $_2$) ou peroxydinitrite (ONOO $^-$) (**tableau 1**) (Droge, 2012).

Tableau 1. Demi-vie des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène d'intérêt biologique (Phaniendra *et al.*, 2015).

L'espèce réactive	Symbole	Demi-vie biologique (seconde)
Les espèces réactives de l'oxygène		
anion superoxyde	O $_2^{\cdot-}$	10 $^{-6}$ s
radical hydroxyle	OH \cdot	10 $^{-9}$ s
peroxyde d'hydrogène	H $_2\text{O}_2$	Stable
radical pyroxyde	ROO \cdot	Seconde
Hydroperoxyde	ROOH	Stable
oxygène singulet	$^1\text{O}_2$	10 $^{-6}$ s
Ozone	O $_3$	Seconde
Les espèces réactives d'azote		
oxyde nitrique	NO \cdot	Seconde
peroxydinitrite	ONOO $^-$	10 $^{-3}$ s
acide peroxydinitrique	ONOOH	stable
dioxyde de nitrogen	NO $_2$	seconde

I.4. Antioxydants

Les antioxydants aident à empêcher la production excessive des «espèces réactives d'oxygène et d'azote» (effet préventif) ou les neutraliser avant qu'ils ne puissent endommager les cellules. Les antioxydants agissent par plusieurs mécanismes, ils peuvent agir comme des piègeurs des ERO, chélateurs de métaux de transition, inhibiteurs des enzymes productrices des ERO ou cofacteurs des enzymes antioxydants...(Gupta, 2015)

I.5. Types d'antioxydants

Les antioxydants peuvent être divisés en deux classes: les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Certains de ces antioxydants sont produits de manière endogène, ils comprennent des enzymes (Catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...), et des molécules de faible poids moléculaire et des cofacteurs enzymatiques. Parmi les antioxydants non enzymatiques, beaucoup sont obtenus à partir de l'alimentation et peuvent être classés en différentes classes dont les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes...) qui représentent la classe la plus importante, les vitamines (E, C...), les caroténoïdes, et les minéraux (zinc, sélénium...) (figure 2) (Moharram et Youssef, 2014).

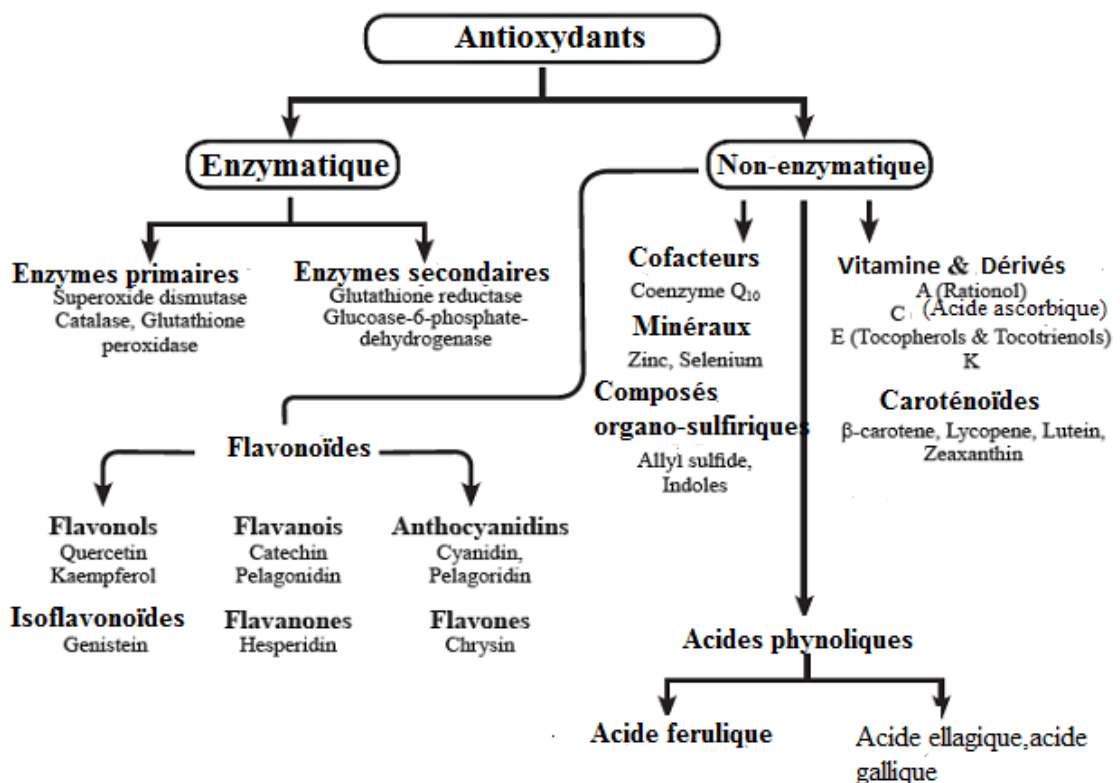


Figure 2: Classification des antioxydants (Carocho et Ferreira, 2013)

I.6. Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des radicaux libres et les antioxydants en faveur des premiers; que ce soit par déficit en antioxydants ou par une surproduction des radicaux libres (Gupta, 2015).

I.6.1. Conséquences du stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides, glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Favier; 2003)

I.6.2. Maladies liées au stress oxydatif

Les radicaux libres sont impliqués dans le processus d'initiation ou de développement de plusieurs maladies dont le cancer, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et même les maladies cardiovasculaires, diabète et le processus normal de vieillissement ... (Liu *et al.*, 1999).

Pour l'athérosclérose, les ERO sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome. De même, dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important dans la survenue des complications diabétiques. Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, pourrait être liée à l'apoptose impliquant les radicaux libres. La maladie de Parkinson s'accompagne elle aussi d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéosome. Enfin, les ERO jouent un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Gardès-Albert *et al.*, 2003). les dommages associés au vieillissement ou de façon intéressante associés aux maladies dégénératives qui viennent avec l'âge, pourraient être dues aux effets néfastes des radicaux libres sur les constituants cellulaires (Vina *et al.*, 2019).

II. Hépatotoxicité

II.1. Généralités

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain qui effectue de multiples fonctions vitales. Le foie est situé légèrement sous le diaphragme et antérieur de l'estomac (Arika *et al.*, 2016). Il représente environ 2% du poids corporel qui s'élève à environ 1400 g chez les femelles et 1800 g chez les males (Sibulesky, 2013).

II.2. Grandes fonctions

Le foie assure plusieurs fonctions vitales pour l'organisme, il est impliqué presque dans toutes les voies biochimiques, la lutte contre les maladies, la croissance, la fourniture de l'énergie, la reproduction, le maintien de l'homéostasie du corps, le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides, la désintoxication, la sécrétion de la bile et le stockage des vitamines (Pandit *et al.*, 2011). Ainsi, le foie est la glande digestive la plus importante qui métabolise les médicaments par oxydation, réduction, hydratation, hydrolyse, condensation, conjugaison ou isomérisation (Thompson *et al.*, 2017).

II.3. Principales lésions hépatiques

A cause de son grand nombre de fonctions métaboliques et sécrétoires, organisation structurelle, localisation stratégique et exposition importante à différents toxines et agents infectieux... le foie est extrêmement vulnérable à de nombreuses pathologies, associées principalement à certain nombre de mécanismes tels que les dommages directs, la stimulation de la réponse immunitaire contre les cellules hépatiques, formation de réactifs intermédiaires, lésions du cytosquelette, perturbation du métabolisme cellulaire, le déclenchement de l'apoptose et de l'hypoxie... (Farzaei *et al.*, 2018).

II.3.1. Cholestase

La cholestase est caractérisée par une altération de la capacité à sécréter de la bile. Elle peut affecter la fonction intrahépatique ou extrahépatique, les voies biliaires, ou les deux (Woreta et Alqahtani, 2014). Ce syndrome inclut de nombreux signes clinico-biologiques différents, entre autres l'augmentation des acides biliaires, l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline, de la gamma-glutamyl transpeptidase, de la 5' nucléotidase et des transaminases, l'ALAT et l'ASAT (Valla, 2013).

II.3.2. Stéatose

La stéatose (surcharge de lipides dans le foie) est caractérisée en microscopie optique par la présence de grosses vésicules contenant des lipides envahissant une grande partie de l'hépatocyte et refoulant le noyau en périphérie. Les causes de la stéatose sont multiples à savoirs: les médicaments (corticostéroïdes, méthotrexate, asparaginase...), l'alimentation parentérale, obésité, diabète, agents toxiques (huiles toxiques, diméthylformamide...) (Larrey, 2003).

II.3.3. Nécrose

La nécrose, également appelée mort cellulaire, est un processus dans lequel les cellules perdent leur viabilité, suite à la dégradation du contenu cellulaire. Dans des conditions physiologiques, ce processus conduit au remplacement des cellules mortes. Cependant, dans des conditions pathologiques, la nécrose est souvent le résultat final de diverses formes de lésions tissulaires. Les causes de la nécrose hépatique sont nombreuses et variées entre autre: hépatite virale aiguë, rejet de greffe, auto-immunité, une grande variété de toxines et médicaments (isoniazide, kétoconazole, nitrofurantoïne et fluoroquinolones ...) (Krishna, 2017).

II.3.4. Cirrhose

La cirrhose est caractérisée par la formation de nodules régénératifs dans le parenchyme hépatique en raison d'une lésion hépatique chronique. La cirrhose est un processus irréversible, survient sous l'effet de la nécrose des cellules hépatiques suivie d'une fibrose et de la formation des nodules. La structure du foie devient anormale. En plus de la fibrose, les complications de la cirrhose comprennent l'hypertension portale, ascite, syndrome hépatorénal. La progression des lésions hépatiques vers la cirrhose peut survenir après des semaines à des années (Suva, 2014).

II.4. Marqueurs hépatiques

L'utilisation de tests biochimiques sériques joue un rôle important dans le diagnostic et la gestion des maladies hépatiques. Le foie contient une multitude d'enzymes à forte concentration, dont certaines sont présentes dans le sérum à de très faibles concentrations. La lésion de la membrane hépatocytaire conduit à la fuite de ces enzymes dans le sérum, ce qui entraîne une augmentation de leurs concentrations. Les tests des enzymes sériques peuvent

être classés en deux catégories: enzymes dont l'élévation reflète des dommages généralisés aux hépatocytes (aminotransférases) et des enzymes dont l'élévation reflète principalement la cholestase (PA, γ -glutamyltransférase [GGT], 5' nucléotidases [5'-NT]) (Woreta et Alqahtani, 2014).

II.4.1. Aminotransférases

Les aminotransférases (anciennement transaminases) sont les indicateurs les plus fréquemment utilisés pour le diagnostic d'une nécrose hépatocellulaire. Ces enzymes-aspartate aminotransférase (ASAT, anciennement dénommée Sérum Glutamo- Oxaloacétate Transférase -SGOT) et alanine amino transférase (ALAT, anciennement dénommée Sérum Glutamo Pyruvique Transférase SGPT) catalysent le transfert du groupement aminé (NH_2) des acides aminés aspartate et alanine respectivement sur l'acide α -cétoglutarique (Thapa et Walia; 2007).

ASAT: aspartate + α -cétoglutarate = oxaloacétate + glutamate.

ALAT: alanine + α -cétoglutarate = pyruvate + glutamate.

a. Alanine aminotransférase

Cette enzyme joue un rôle important dans le métabolisme des acides aminés et la néoglucogénèse, le niveau de l'activité de l'alanine aminotransférase sérique (ALAT) est considéré comme biomarqueur sensible de l'hépatotoxicité. Généralement, l'augmentation de son activité dans le sérum reflète des dommages hépatocytaires. Cependant, en absence d'une altération histomorphologique corrélative du foie, son augmentation est associée à la toxicité d'autres organes (cœur, muscle) (Ozer *et al.*, 2008).

b. Aspartate aminotransférase

L'ASAT se trouve dans plusieurs organes à savoir le cœur, le foie, les muscles squelettiques et les reins. Il existe deux formes différentes d'isoenzymes d'ASAT qui sont génétiquement distinctes, la forme mitochondriale et cytoplasmique. Une activité élevée de l'ASAT mitochondriale est observée au cas d'une nécrose tissulaire étendue au cours d'une atteinte hépatique comme la dégénérescence des tissus hépatiques et la nécrose et également à infarctus du myocarde (Gowda *et al.*, 2009).

c. Rapport ASAT/ ALAT

Le rapport de l'ASAT à l'ALAT a plus d'utilité clinique que l'évaluation des niveaux individuels. Un ratio supérieur à 1,17 a été trouvé en survie à un an chez les patients atteints de cirrhose de cause virale. Un rapport supérieur à 1 indique à une fibrose hépatique avancée et une hépatite C chronique. Cependant, un rapport ASAT / ALAT supérieur à 2 est typiquement présent dans l'hépatite alcoolique. La maladie de Wilson peut entraîner un rapport supérieur à 4,5 et un rapport similaire est trouvé même dans l'hyperthyroïdie. L'activité sérique de l'ASAT est considérée comme un biomarqueur moins spécifique à la fonction hépatique par rapport à l'activité de l'ALAT (Ozer *et al.*, 2008; Gowda *et al.*, 2009).

II.4. 2. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme localisée à la membrane plasmique des cellules hépatiques, os, placenta et intestin et catalyse plusieurs réactions chimiques spécifiques dans le corps en particulier le clivage d'un groupement phosphate d'une molécule organique à un pH alcalin. Cependant, l'augmentation de l'activité de l'ALP dans le sérum est l'élément clé du syndrome de choléstase, elle peut se lier aussi à une atteinte d'os ou de foie ou une tumeur dans ces organes. Un foie sain évacue continuellement le liquide contenant de l'ALP et d'autres substances par le canal biliaire, mais en cas d'une atteinte hépatique ou biliaire, le canal biliaire est souvent bloqué en accumulant ce liquide et l'orientant vers la circulation sanguine (Arika *et al.*, 2016).

II.4. 3. Gamma glutamyl transférase

Le GGT est une glycoprotéine membranaire qui catalyse le transfert d'un résidu gamma-glutamyl à d'autres peptides, acides aminés ou eau. De grandes quantités de cette enzyme sont localisées dans la membrane des cellules de plusieurs tissus incluant les reins, le pancréas, le foie, les intestins et la prostate. Au cours des atteintes hépatiques l'élévation de l'activité du GGT est corrélée avec celle du ALP; d'autres conditions provoquent des niveaux élevés de γ -glutamyl transférase comprend le diabète, la pancréatite aiguë et l'infarctus du myocarde. Des drogues comme la phénobarbitone, phénytoïne, paracétamol, et les antidépresseurs tricycliques peuvent aussi augmenter les niveaux de GGT (Thapa et Walia, 2007).

II.4.4.5' nucléotidases

5'NT catalyse l'hydrolyse des nucléotides, tels que l'adénosine 5' phosphate et l'inosine 5' phosphate, ce qui entraîne la libération du phosphate inorganique. 5'NT se trouve dans le foie, l'intestin, le cerveau, le cœur, les vaisseaux sanguins et le pancréas. Son activité est parallèle à celle de l'ALP. La plupart des études montrent que 5'NT et ALP ont une utilisation clinique égale dans la détection des maladies hépatobiliaires (Woreta et Alqahtani, 2014).

II.4.5. Bilirubine totale

La bilirubine produite par la dégradation de l'hème est, en pratique, principalement issue des globules rouges en raison du fort taux de renouvellement de ces cellules comparée aux autres tissus également riches en hème (muscles pour la myoglobine, foie pour les cytochromes, par exemple). La bilirubine non conjuguée, liposoluble, est liée de façon équimolaire à l'albumine dans le sang. Elle franchit la membrane sinusoidale des hépatocytes par simple diffusion. La bilirubine est conjuguée à l'acide glucuronique par l'UDP glucuronyl bilirubine transférase (ou UGT1A1) du réticulum endoplasmique. Une fois conjuguée, la bilirubine, hydrosoluble, peut être sécrétée dans le canalicule, prenant en charge les anions organiques conjuguées (comme la bilirubine conjuguée, le glutathion, ou certains acides biliaires conjugués, mais aussi des xénobiotiques). La bilirubine conjuguée de l'hépatocyte peut aussi être sécrétée dans la sinusoïde, l'hyperbilirubinémie conjuguée est quasiment synonyme d'une cholestase (Valla, 2013).

II.5. Hépatotoxicité induite par le CCl₄

Le modèle d'hépatotoxicité induit par le CCl₄ *in vivo* est largement utilisé dans l'évaluation des effets antioxydants des médicaments et des extraits de plantes. Le CCl₄ est métabolisé par le système monooxygénase du cytochrome P450 pour produire le radical trichlorométhyle, qui réagit ensuite avec l'oxygène pour former le radical trichlorométhyl- peroxy (Zhou *et al.*, 2013). Les dommages cellulaires induits par le CCl₄ peuvent résulter soit de liaison covalente de leur intermédiaires réactifs aux composants cellulaires ou d'une peroxydation lipidique déclenchée par l'interaction de ces radicaux libres avec de l'oxygène qui à son tour attaque les acides gras insaturés. Cela donne lieu à la destruction des lipides, en particulier les phospholipides

insaturés, entraînant des dommages aux membranes plasmiques et aux molécules intracellulaires telles que les protéines et les lipides (Boll *et al.*, 2001).

Les métabolites du CCl₄ peuvent aussi réagir avec les enzymes antioxydants la CAT et la SOD en provoquant l'altération de leur structure et la diminution de leur capacité antioxydante. Différentes lésions rénales sont aussi bien documentées après l'administration du CCl₄; l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par les radicaux du CCl₄ et le stress oxydatif peut favoriser la vasoconstriction rénale qui affecte la fonction rénale et également augmenter la teneur en nitrite dans l'urine et le sérum. Les nitrites peuvent se transformer en oxyde nitrique (NO) à pH acide. Les anions peroxy-nitrite sont générés par la réaction des anions de l'oxyde nitrique et le superoxyde. Ces anions peroxy-nitrites oxydent les biomolécules, ce qui conduit finalement à une peroxydation lipidique et à des dommages tubulaires (Khan *et al.*, 2010).

II.6. Rôle du stress oxydant dans le développement des maladies du foie

Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogenèse du foie à travers l'altération des constituants cellulaires comme: les lipides, les protéines et l'ADN des cellules hépatocytaires ainsi que par la modulation des voies de signalisation fonctionnelles. De nombreux facteurs étiologiques sont associés aux maladies du foie et sont très productifs de ERO. Les ERO peuvent être produits dans le foie par le réticulum endoplasmique via les enzymes du cytochrome P450, au niveau des macrophages et des neutrophiles. En fait, des études ont démontré que l'éthanol peut entraîner une augmentation significative des ERO mitochondriaux dans les hépatocytes. En revanche, l'hépatotoxicité des médicaments est liée à la production d'ERO et d'ERN. Réellement, la prise de médicaments peut induire un stress oxydant via l'augmentation des oxydants cellulaires et de la peroxydation lipidique et épuisement des antioxydants dans le foie. En plus de ces facteurs, l'exposition aux métaux lourds, les radiations et la température élevée peut également causer des dommages oxydatifs dans le foie. Les maladies hépatiques induites par le stress oxydatif peuvent également entraîner une insuffisance rénale (Farzaei *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019). De nombreuses études ont décrit que l'élévation du stress oxydatif induit la sécrétion des cytokines inflammatoires, y compris les interleukines (IL-1, IL-6) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF). En outre, des études antérieures indiquent que les cytokines inflammatoires peuvent réguler la sécrétion de facteur de croissance transformant β 1 (TGF- β 1), qui est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la

différenciation et l'apoptose. en réponse à des lésions hépatiques, le TGF- β 1 joue également un rôle majeur dans le processus de la fibrogenèse (Tsai *et al.*, 2015).

III. Inflammation

L'inflammation est une réponse protectrice du corps, peut être déclenchée par un traumatisme physique, chimique ou des microorganismes envahisseurs ...C'est une réponse immunitaire importante qui conduit à l'élimination du pathogène et la cicatrisation du tissu lésé (Jin-Yao *et al.*, 2016; Vanlalhru *et al.*, 2019).

III.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est un processus à court terme caractérisé par les signes classiques de l'inflammation: gonflement, rougeur, douleur, chaleur et perte de fonction. Elle survient tant que le stimulus néfaste est présent et cesse une fois que le stimulus est éliminé. Le processus d'inflammation aiguë est initié par les vaisseaux sanguins locaux du tissu lésé, sous l'effet des médiateurs chimiques libérés par les cellules résidentes et immunitaires; l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et la libération des facteurs chimiotactiques du site enflammé est activée en augmentant la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et l'exsudation des protéines plasmatiques et des leucocytes circulatoires à travers l'endothélium vasculaire. L'infiltration des leucocytes du sang est essentielle pendant la réponse inflammatoire. Un groupe d'agents chimiotactiques telles que les endotoxines microbiennes, le fragment C5a du complément et les interleukines avec les sécrétions des basophiles (le facteur d'activation des plaquettes, l'histamine, et le leukotriène B) peut stimuler l'infiltration des leucocytes en quelques minutes (**tableau 2**) (Afsar, 2011; Stankov, 2012; Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

L'augmentation du flux de fluide dans le tissu infecté provoque le gonflement caractéristique associé à l'inflammation, et l'augmentation du flux sanguin vers la zone cible provoque la couleur rougeâtre et la chaleur accrue qui peut aussi s'élever sous l'effet des médiateurs chimiques comme les prostaglandines (Vetriselvan *et al.*, 2013; Nadipelly, 2017). La douleur résulte soit du fait du dommage initial, de l'effet direct des médiateurs inflammatoires ou de l'étirement des nerfs sensoriels due à l'œdème. La perte de fonction fait référence soit, à l'œdème et la douleur, ou au remplacement des fonctions cellulaires initiales par la fonction de défense et de la cicatrisation (Punchard *et al.*, 2004).

Ces événements étroitement régulés entraînent une prédominance des neutrophiles dans la zone enflammée au début de la lésion, progressivement remplacés par des cellules mononucléaires principalement monocytes, qui se différencient ensuite en macrophages. Ces cellules et d'autres phagocytent les agents étrangers, libèrent également des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, et génèrent des espèces réactives de l'oxygène qui éliminent et digèrent les organismes envahisseurs et les débris cellulaires. Enfin, le stimulus inflammatoire est effacé et la structure tissulaire normale et la fonction du tissu sont rétablies (Lawrence *et al.*, 2002).

Tableau 2: Médiateurs de la réponse inflammatoire aigue

Classe des médiateurs	Pro-inflammatoires	Anti-inflammatoires
Amines	Histamine, bradykinine	Adrénaline, noradrénaline
Médiateurs lipidiques	PGE ₂ , PGI ₂ , LTB ₄ , LTC ₄	PGJ ₂ , PGA _{1/2} , Lipoxines
Complément	C3a, C5a	Récepteurs de C1q
Nucléotides cycliques	cGMP	cAMP
Molécules d'adhésion	E-selectine, p-selectine, ICAM1, VCAM1	α , β_3 Intégrine, récepteurs TSP et PS,
Cytokines	TNF, IL-1 β , IL-6	TGF- β_1 , IL-10
Chemokine	IL-8 (CCL8), GRO/KC, MIP1 α (CCL3), MCP1 (CCL2)	-
Hormones stéroïdiens	-	Glucocorticoïde

III.2. Inflammation chronique

A l'inverse de l'inflammation aigue qui est une réponse bénéfique limitée, l'inflammation chronique est une affection pathologique caractérisée par une inflammation active, concomitante, une destruction des tissus et des tentatives de réparation. L'inflammation chronique n'est pas caractérisée par les signes classiques de l'inflammation aiguë. Cependant, les tissus enflammés de façon chronique sont caractérisés par l'infiltration de cellules immunitaires mononucléaires (monocytes, macrophages, lymphocytes et plasmocytes), la destruction des tissus et les tentatives de guérison, qui comprennent l'angiogenèse et la

fibrose. Les causes endogènes comprennent une inflammation aiguë persistante. Les causes exogènes sont variées et comprennent une infection microbienne, une exposition prolongée à des agents chimiques tels que la silice ou des réactions auto-immunes (Vetriselvan *et al.*, 2013; Gabay, 2006). L'inflammation chronique a un effet significatif sur le développement de plusieurs maladies comme: athérosclérose, colite ulcéreuse, maladie de Crohn, cancer, troubles du SNC comme la dépression et la maladie de Parkinson, polyarthrite rhumatoïde, maladies cardiovasculaires et diabète de type 2 (Laveti *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018).

III.3. Principales cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation

III.3.1. Neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires qui s'infiltrent au tissu blessé, elles arrivent en grand nombre en réponse aux chimiokines libérés par les cellules blessées et nécrotiques. Le recrutement des neutrophiles dans les tissus blessés commence 4 à 6 heures après la première blessure, avec un nombre maximum détecté après 18 à 24 heures. Les neutrophiles détruisent les microbes envahisseurs par plusieurs mécanismes: la phagocytose, la libération des peptides antimicrobiens (notamment cathélicidines), les enzymes cytotoxiques comme l'élastase et myéloperoxydase et la production des ERO et ERN microbicide (Brazil *et al.*, 2019).

III.3.2. Macrophages

Les macrophages sont des cellules immunitaires résidentes dans les tissus ou infiltrées, jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée, le développement normal des tissus, l'homéostasie des organismes et la réparation des tissus endommagés. Ils reçoivent des signaux endocrine ou paracrine d'autres cellules phagocytaires, de microvésicules et molécules dans la matrice extracellulaire. De plus, les macrophages peuvent interagir directement avec les récepteurs de surface sur d'autres cellules résidentes dans les tissus, les cellules immunitaires recrutées pendant l'infection et les protéines extracellulaires des cellules. En conséquence, les macrophages s'activent et jouent divers rôles dans le développement de la réponse immunitaire et la réparation tissulaire (Watanabe *et al.*, 2019).

III.3.3. Cellules tueuses naturelles (NK)

Les cellules NK sont des composants cruciaux du système immunitaire inné. En plus des NK circulatoires, on peut les retrouver dans la cavité péritonéale, rate, foie, poumon, ganglions

lymphatiques, thymus et dans l'utérus pendant la gestation. Les cellules tueuses naturelles ont diverses fonctions biologiques, notamment la reconnaissance et la destruction des cellules infectées par les virus et les cellules néoplasiques. Les cellules NK ont également un rôle immunorégulateur car elles sécrètent plusieurs cytokines, comme l'interféron (IFN) γ .

La fonction de la cellule NK est contrôlée par une large gamme de récepteurs qui s'expriment sur sa surface; elle porte deux types de récepteurs: inhibiteurs et activateurs. La famille des récepteurs inhibiteurs se compose des récepteurs de type immunoglobuline tueurs (KIR) ou des récepteurs de type Ig (CD158), les récepteurs de lectine de type C (CD94-NKG2A) et les récepteurs inhibiteurs des leucocytes (LIR1, LAIR-1). Les récepteurs activateurs sont les récepteurs de cytotoxicité naturels (NKP46, NKP44), les récepteurs de lectine de type C (NKG2D, CD94-NKG2C) et les récepteurs de type Ig (2B4). Une cellule NK exprime généralement deux à quatre récepteurs inhibiteurs en plus d'un réseau de récepteurs d'activation. La cytotoxicité des cellules NK est étroitement régulée par un équilibre entre les signaux d'activation et inhibition. La diversité des récepteurs assure une hétérogénéité importante au sein de la population de cellules NK. C'est pour cette raison que les cellules NK ayant la capacité à répondre à une grande variété d'antigène et de participer à des réponses dans différentes conditions pathologiques (Mandal et Viswanathan, 2014; Orakpoghenor *et al.*, 2019).

III.3.4. Lymphocytes

Les lymphocytes jouent un rôle fondamental dans le système immunitaire, ils participent à la réponse immunitaire spécifique contre les microorganismes et les substances étrangères, les cellules tumorales et le rejet de greffe. Ils se retrouvent dans le sang, la lymphe, les organes et les tissus lymphoïdes (thymus, ganglions lymphatiques, rate et appendice...).

a. Lymphocytes B

Les lymphocytes B assurent la réponse immunitaire humorale caractérisée par la production d'anticorps. Ils peuvent aussi présenter les antigènes et sécréter des cytokines comme IL-10, IL-35, et TGF- β . La maturation des cellules B a lieu dans la moelle osseuse chez les mammifères et dans la bourse de Fabricius chez les oiseaux. Leur activation est initiée par la liaison spécifique entre les BCR exprimés sur leur membrane plasmique et les déterminants antigéniques des antigènes (Orakpoghenor *et al.*, 2019).

b. Lymphocytes T

Les LT qui vont reconnaître l'Ag et s'activent s'ils reçoivent un second signal via des interactions moléculaires avec les cellules présentatrice d'antigène (CPA), en particulier grâce aux molécules de costimulation. Il existe deux grandes classes de lymphocytes T, Les lymphocytes de type CD₄⁺ ou auxiliaires et les lymphocytes de type CD₈⁺ ou cytotoxiques. Lorsqu'un lymphocyte T naïf (LTH₀) est activé par la reconnaissance d'un antigène présenté par une CPA, il peut se différencier en plusieurs populations lymphocytaires: LTH₁, LTH₂, LTH₁₇ ou LT régulateur. Ces différentes populations de LT coordonnent divers types de réponses immunitaires notamment via les cytokines qu'ils vont sécréter. Schématiquement, les LTH₁ vont stimuler la réponse immunitaire cellulaire en activant les cellules cytotoxiques essentielles dans la réponse immunitaire antibactérienne et antitumorale, les LTh vont orienter la réponse vers une réponse humorale par coopération avec les LB qui sécrètent les anticorps. Les LT régulateurs naturels d'origine thymique sont des cellules immunosuppressives qui régulent négativement la réponse immunitaire. L'orientation de cette différenciation est fonction de l'environnement cytokinique. La CPA, oriente la différenciation du LT et donc de la réponse immunitaire grâce au type de cytokines sécrétées : TH1 par l'IFN_γ et l'IL-12, TH₂ par l'IL-4, TH₁₇ par le TGF β, l'IL-1β, l'IL-23 et l'IL-6 ou Treg par le TGF-β (Samson *et al.*, 2011).

III.4. Principaux médiateurs de l'inflammation

De nombreux médiateurs chimiques endogènes jouent un rôle important dans la médiation du processus inflammatoire comme : des amines vasoactives telles que l'histamine et la sérotonine, les peptides (par exemple, la bradykinine) et les eicosanoïdes (par exemple, les thromboxanes, les leucotriènes et les prostaglandines) (Abdulkhaleq *et al.*, 2018). Les cytokines comprennent les interleukines (IL), interférons (IFN), chemokines et le facteur necrosant des tumeurs (TNF) (Matsumoto *et al.*, 2018). La meilleure compréhension des types et des fonctions des cytokines permettra l'identification et / ou le développement de nouveaux médicaments pour le traitement des maladies auto-immunes, infectieuses et maladies néoplasiques (**figure 3**) (Wang *et al.*, 2020).

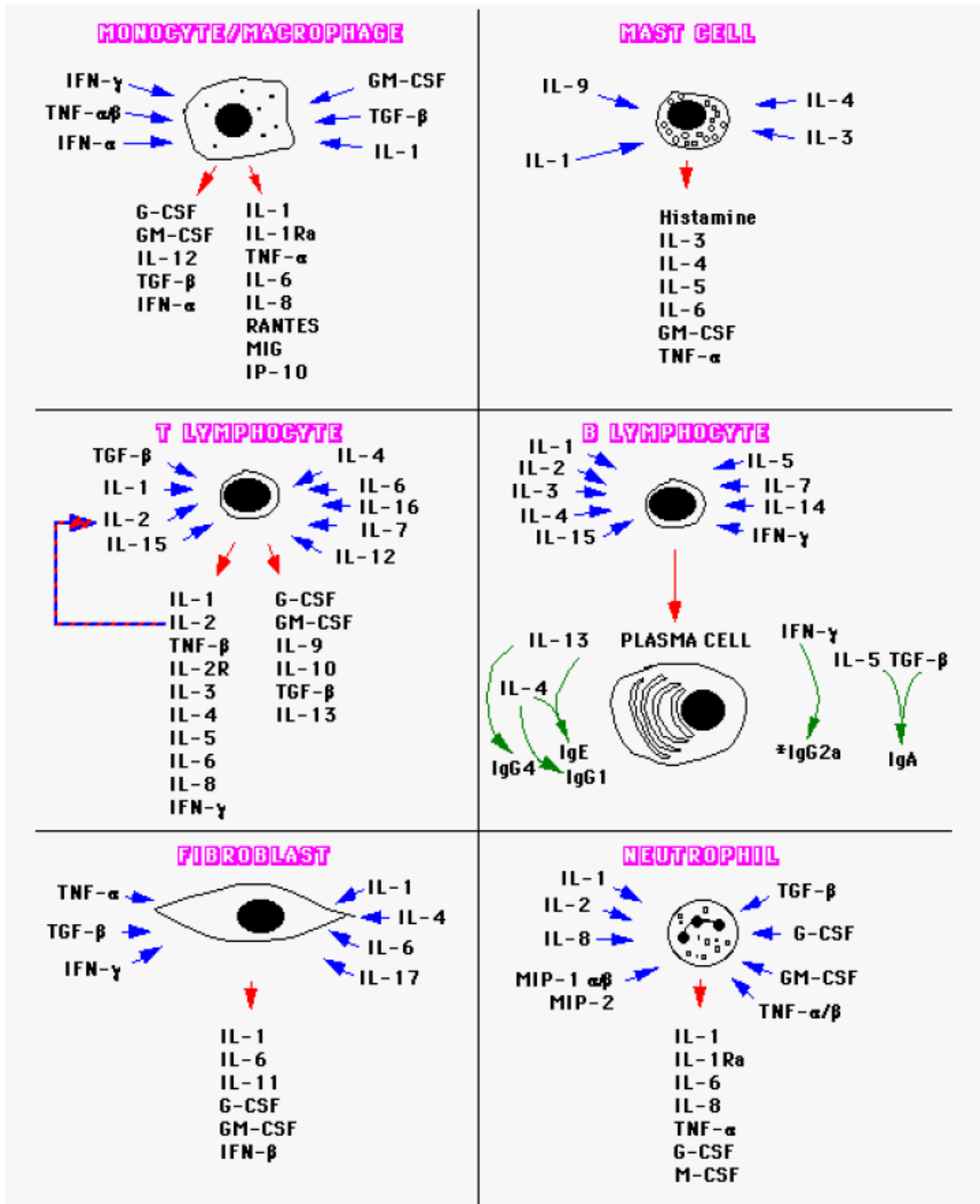


Figure 3: Cytokines inflammatoires, leurs principales sources et cellules cibles (Wang *et al.*, 2020).

III.5. Anti-inflammatoires

III.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les principaux médicaments utilisés pour réduire les conséquences néfastes de l'inflammation et inhiber la voie de biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, à travers l'inhibition des enzymes COX (Ziltner *et al.*, 2010).

Il existe trois isoformes de COX: COX-1, COX-2 et COX-3. COX-1, est dite constitutive, est présente dans la plupart des tissus, elle est responsable de la production de prostaglandines, qui sont vitales pour les processus physiologiques normaux tels que le maintien du débit sanguin rénal, la protection de la muqueuse gastrique et l'adhérence plaquettaire. La COX-2 est absente dans la plupart des tissus sauf le cerveau, l'utérus, les reins et la prostate. Des niveaux élevés sont remarqués au cours d'une inflammation. Le rôle des AINS étant principalement lié à l'inhibition des COX2, ce qui entraîne une réduction de leur synthèse et donc un effet analgésique. La COX-3 se trouve dans le système nerveux central et serait le site d'action du paracétamol; la nature exacte de cet isoenzyme n'est pas claire pour le moment (Sylvester; 2019).

L'inhibition des COX1 constitutionnelles est à l'origine des effets indésirables des AINS comme les lésions rénales et les bronchospasmes, les ulcères gastriques. Cette inhibition dévie le métabolisme de l'acide arachidonique vers la production de leucotriènes par la 5-lipoxygénase (5- LO), d'autant plus que le frein exercé d'ordinaire par la PGE2 sur la 5-LO est levé. Cette surexpression de la voie des leucotriènes serait à l'origine de certaines hypersensibilités comme l'asthme à l'aspirine, hypothèse corroborée par l'élévation majeure du taux de leucotriènes LTE4 urinaires chez les patients atteints, après un test de provocation à l'aspirine. Actuellement, on distingue parmi les AINS ceux dits « classiques », inhibant fortement les complexes enzymatiques COX1, les AINS « anti-COX2 préférentiels » (sélectivité relative pour COX2, disparaissant aux fortes doses) et enfin les anti-COX2 sélectifs ou Coxibs (Tableau 3) (Pipet *et al.*, 2012; Peres *et al.*, 2012).

Tableau 3: Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) selon leur structure (Pipet *et al.*, 2012).

Classes	Anti-inflammatoires
Salicyles	Aspirine
Dérivés de l'acide acétique	Indométacine, sulindac (indolés), Diclofénac
Fenamates	Acide méfénamique, acide niflumique
Propioniques	Ibuprofène, kétoprofène, naproxène, flurbiprofène, fénoprofène. . .
Oxicams	Piroxicam, Meloxicam. .
Pyrazoles	Phénylbutazone
Coxibs	Celecoxib, Etoricoxib

III.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent des analogues structuraux du cortisol. Le cortisol est une hormone sécrétée par les zones fasciculées et réticulées de la corticosurrénale, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ils possèdent des effets physiologiques variés et jouent notamment un rôle dans la réponse au stress. Ils possèdent de multiples fonctions métaboliques et, en particulier, permettent la mobilisation rapide des réserves énergétiques de l'organisme: glucides, lipides, protides. Leur action hyperglycémiant rend compte de leur appellation de glucocorticoïde, par opposition aux minéralocorticoïdes comme l'aldostérone. La sécrétion du cortisol suit un rythme circadien caractéristique. Comme anti-inflammatoire, les (AIS) répriment l'expression de gènes pro-inflammatoires (cytokines) et induisent l'expression des gènes anti-inflammatoires, en inhibant la production des prostaglandines et des leucotriènes par blocage de la phospholipase A2, en réduisant la perméabilité capillaire ou la phagocytose, en bloquant la libération de sérotonine, d'histamine et de bradykinine... ; leur effets immunosuppresseurs est expliqué par l'inhibition de la production de cytokines (interleukines 1, 2, 3 et 6, interféron γ , TNF α), se répercutant sur l'immunité à médiation aussi bien cellulaire qu'humorale. Les effets secondaires des AIS découlent directement de leurs activités biologiques (Faure, 2009).

III.6. Inflammation et stress oxydatif

Pendant l'inflammation, l'activation des mastocytes, des macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles stimule la production de plusieurs ERO et ERN (radicaux superoxyde, radicaux hydroxyle, NO...). Ces radicaux peuvent également agir comme des messagers secondaires, provoquant ainsi la production d'autres médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire. De plus, l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique pour produire les prostaglandines est accompagnée par la production excessif des radicaux libres (Jin-Yao *et al.*, 2016).

IV. Plantes étudiées

IV.1. Généralités

La famille des Lamiaceae comprend 220 genres et 3300 espèces répandues dans le monde entier. Les plantes appartenant à cette famille sont connues pour leur diversité phytochimique et leurs propriétés thérapeutiques (Carović-Stanko *et al.*, 2016). Les genres *Mentha* et *Lamium* appartiennent à cette famille.

Les plantes appartenant au genre *Mentha* produisent plusieurs métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols, les terpènes et les quinones (Erum *et al.*, 2012). Les plantes de ce genre sont largement répandues dans le monde et grâce à leurs propriétés utiles, elles sont utilisées en industrie pharmaceutiques, alimentaire et cosmétique (Grzeszczuk et Jadczyk, 2009).

Le genre *Lamium* comprend environ 40 espèces réparties dans les régions tempérées et subtropicales d'Afrique, d'Asie et d'Europe (Salehi, 2019). Les études phytochimiques des plantes de ce genre ont révélé l'existence de plusieurs composés à savoir : flavonoïdes, anthocyanes, huiles essentielles, terpènes, phénylpropanoïdes... cette variété phytochimique leur confère des activités pharmacologiques importantes, notamment l'activité antioxydante, antiproliférative, anti-inflammatoire, antinociceptive, bactériostatique, cytotoxique, antispasmodique ... (El-Hela *et al.*, 2016).

IV.2. *Mentha rotundifolia*

IV.2.1. Description

M. rotundifolia est une plante aromatique herbacée, vivace, très odorante, pousse spontanément en Algérie particulièrement dans les milieux humides (Brada, 2007). C'est une herbe vivace de 25 à 80 cm de hauteur. Les feuilles sont distinctement pédonculées, ovales, obtuses, moins de 2 fois plus longues que larges, ridées en réseau. Inflorescences en épis en têtes ou en verticilles. Calice tubuleux ou en cloche à 5(4) dents subégales. Corolle infundibuliforme blanche, rosée ou violet pâle à 4 lobes subégaux. Les fleurs sont en épis cylindriques terminaux non feuillés. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher (**figure 4**). Comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique (Quezel et Santa, 1963).



Figure 4. Photographie de *M. rotundifolia* récoltée au mois d'Juin 2016 de la région de Djemila Wilaya de Sétif.

IV.2.2. Nomenclature

M. rotundifolia connue par la population locale sous le nom de « Megne essif», est généralement dénommée en Algérie «timarsat» (Khadraoui *et al.*, 2013), et au Maroc «Timija» (El Arch *et al.*, 2003). D'autres dénominations sont affectées à cette plante à travers le monde telles que «Applemint» (Umemoto, 1998), «Baume sauvage», «Ment astre», «menthe douce à feuilles ronde» (Kothe, 2007).

IV.2.3. Classification botanique

D'après Quezel et Santa (1963), la classification de *Mentha rotundifolia* est la suivante:

Embranchement: Spermatophytes

Sous- embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Famille: Lamiaceae

Genre: *Mentha*

Espèce: *Mentha rotundifolia*

IV.2.4. Composition chimique de la plante

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de *M. rotundifolia*. Une étude réalisée par Riahi *et al.* (2018) sur un extrait hydrométhanolique a permis d'identifier 50 composés dont des phénols, terpènes, stéroïdes et aldéhydes.

La composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques. Ces huiles présentent une diversité chimique en relation avec la distribution géographique: Maroc (Derwich *et al.*, 2010), Uruguay (Lorenzo *et al.*; 2002), Cuba (Pino *et al.*, 1999), Japon (Shimizu, 1956).

IV.2.5. Usage traditionnel

M. rotundifolia est une plante aromatique très utilisée en médecine traditionnelle, dans les préparations culinaires, en cosmétique et parfumerie. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour un large éventail d'activités: tonique, stomachique, carminative, antispasmodique, hypotensive, insecticides, antiseptique, analgésique et anti-inflammatoire (Ladjel *et al.*, 2011, Riahi *et al.*, 2018), mais elle ne doit pas être utilisée au cours de la grossesse (Kothe, 2007).

IV.2.6. Activités biologiques

Les métabolites secondaires de *M. rotundifolia* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Selon une étude réalisée par Boussouf *et al.*, (2017) l'extrait hydrométhanolique de *M. rotundifolia* possède un bon effet anti-inflammatoire, analgésique et antioxydant. La sensibilité des bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), des champignons (*Trametes pini*, *Aspergillus niger*, *Penicillium parasiticus*) et des insectes des céréales en stockage (*Rhizopertha dominica* et *Sitophilus*

oryzae) vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* est illustré par El Arch *et al.*, 2003).

IV.3. *Lamium amplexicaule*

IV.3.1. Description

L. amplexicaule connue par la population locale sous le nom de « nanaa el far » est une plante herbacée annuelle ou hivernante, cléistogame qui produit à la fois des fleurs fermées (autofécondation obligatoire) et des fleurs roses ouvertes. La période de la florescence est de mars à août, puis à nouveau en septembre-Octobre. C'est une plante à croissance spontanée, crée des populations dans différentes conditions écologiques comme les collines, les prairies, les jardins, les terres cultivées, et les terrains vagues. Cette plante agit de manière envahissante partout où elle se trouve et pose des problèmes importants aux écosystèmes naturels et aux terres cultivées. Elle a un effet allélopathique et réduit le rendement du blé probablement en raison de ses composants chimiques (**figure 5**) (Bond *et al.*, 2007 ; Azimishad *et al.*, 2018).



Figure 5: Photographie de la plante *Lamium amplexicaule* récoltée au mois d'Avril 2016 de la région de Djemila Wilaya de Sétif.

IV.3.2. Classification botanique

La classification de *Lamium amplexicaule* est la suivante (Quezel et Santa., 1963):

Embranchement: Spermatophytes

Sous- embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Famille: Lamiaceae

Genre: *lamium*

Espèce: *Lamium amplexicaule* .

IV.3.3. Composition chimique

Divers composés chimiques ont été isolés à partir des extraits de la plante *Lamium amplexicaule*. L'huile essentielle de *L. amplexicaule* se compose en grande partie d' α -pinène, β -pinène, 1-octène-3-ol, (E) -caryophyllène et germacrène D (Jones *et al.*, 2012) ; trans-phytol, octadecanol, acide hexadecanoïque, hexahydrofarnesyl acetone, 1-octen-3-ol , trans-chrysanthenyl acetate, camphore, isophytol... (Salehi *et al.*, 2019).

L'étude phytochimique réalisée par Laggoune *et al.* (2008), sur des extraits de cette plante a permis d'isoler deux flavonoides (7-O-glucosyl-3-methylkaempferol ; 5, 7, 4-trihydroxy-3-methoxyflavone, chrysoeriol) des parties aériennes et deux stérols des racines (β -stigmasterol et γ -sitosterol).

IV.3.4. Activités biologiques

Une étude réalisée par Yumrutas et Saygideger (2010) a montré que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux cru de la plante *L. amplexicaule* a un effet antioxydant appréciable. Laggoune *et al.* (2008) ont rapporté que *Lamium amplexicaule* L possède un effet antimicrobien remarquable contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus α -hemolytic*, *Serratia*, *Enterobacter*, et *Bacillus subtilis*. L'activité anti-inflammatoire évaluée par le test de caragenane a montrée un bon effet (El-Hela *et al.*, 2016).

Matériel

et

Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Plantes

Cette étude traite de deux plantes médicinales *Mentha rotundifolia* et *Lamium amplexicaule*. La récolte des parties aériennes est effectuée en pleine floraison dans la région de Djemila au Nord- Est de la Wilaya de Sétif- Algérie, au mois de Mars 2015 pour *L. amplexicaule* et en Juins 2015 pour *M. rotundifolia*. L'identification botanique des plantes a été réalisée par le Pr Laouer Hocine et Dr. Lebazda Rafika (Université Ferhat Abbes, Sétif 1) pour *Mentha rotundifolia* et *Lamium amplexicaule* respectivement.

I.2. Animaux

L'étude *in vivo* est réalisée sur des souris mâles Nmris pesant entre 25 et 35g et des rats mâles (Albino) pesant entre 150 et 190 g procurés à l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux sont soumis à une période d'adaptation dans des cages avec accès libre à l'eau et à l'aliment standard obtenu de l'office national de l'aliment de bétail (ONAB) de Bejaia.

I.3. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude sont la lignée macrophages RAW 264 et la lignée Caco-2 (Human colon epithelial cancer cell line) fournie par l'unité de culture cellulaire de l'Université de Grenade (Espagne). Le lipopolysaccharide (LPS) provient de la bactérie *Escherichia coli* 055: B5; Sigma, Saint-Louis, MO, USA.

I.4. Produits chimiques

Les produits chimiques et les solvants organiques utilisés dans cette étude sont tous de grade analytique et sont procurés auprès de Sigma- Aldrich (Allemagne) et Fluka (France), Prolabo (France).

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

Deux méthodes d'extraction ont été adoptées pour l'obtention des extraits à partir des parties aériennes des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*.

II.1.1. Extraits aqueux

Le broyat des parties aériennes de chaque plante est soumis à la décoction dans l'eau distillée (10% m/v) pendant 15 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée sur une gaze puis sur papier Wattman et le filtrat est évaporé à sec pour donner des extraits aqueux bruts (Belhattab *et al.*, 2004).

II.1.2. Extraits acétoniques

20 g du broyat végétal sont placés dans une cartouche et soumis à l'extraction au Soxhlet en utilisant l'acétone comme solvant. Après 6 heures, l'extrait est récupéré puis soumis à une évaporation rotative sous vide à 40 °C pour obtenir l'extrait brut (Belhattab *et al.*, 2004).

II.2. Analyse phytochimique des extraits

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin- Ciocalteu décrite par Li *et al.*, (2007). En bref, 200 µl de chaque extrait sont mélangés à 600 µl de réactif de Folin- Ciocalteu (10%). Après 4 minutes, 800 µl de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% sont ajoutés. Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 2 h avant de mesurer l'absorbance à 760 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g Extrait).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Kosalec *et al.* (2004). Le milieu réactionnel se compose d'un ml d'extrait et 1 ml de chlorure d'aluminium à 2% préparé dans le méthanol. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430 nm et la teneur en flavonoïdes calculée est exprimée en mg équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g Extrait).

II.2.3. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC- MS/MS)

L'analyse qualitative des extraits a été conduite en utilisant un système de chromatographie HPLC de type Agilent 1200 (Agilent 1200, Agilent Technologies, Wilmington, DE, Etats-Unis) équipé d'un détecteur de masse API-3200. Les extraits et les standards phénoliques ont été dissous dans du méthanol à la concentration

de 1mg /mL et injectés dans une colonne C18 Agilent zorbax 150 mm X 4,6 mm. L'analyse a été réalisée en utilisant un système à gradient de solvant (solvant (A) : eau- acide formique (0,1%) et solvant (B) : acétonitrile. Un gradient d'élution linéaire en cinq étapes avec une durée totale de traitement de 35 minutes est utilisé. Le gradient a été réalisé en diminuant le solvant A jusqu'à 10% et en augmentant le solvant B à 90%. Un volume d'injection de 20 µL et un débit constant de 1mL/ min est utilisé pour chaque analyse. L'ensemble du flux issu de la chromatographie liquide à haute performance est dirigé vers un spectromètre de masse à trois quadripôles (API 3200; MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Les données spectrales de masse sont acquises en mode ion négatif avec une tension capillaire de 4500 V, une source d'ions pour une ionisation par pulvérisation électronique (ESI), une tension au cône de 70 V, une énergie de collision de 35 eV, une température de séchage de 650 °C, N₂ comme gaz de séchage avec un débit de 4L/ min et un logiciel Analyst version 6. Un détecteur UV à barrette de diodes a été utilisé pour balayer entre 200 et 400 nm afin d'évaluer le contenu en composés phénoliques. Les échantillons élués et les standards ont été détectés à 280 nm.

II.3. Activité antioxydante *in vitro*

II.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'effet scavenger du radical DPPH (2,2 diphényl -1- picryl hydrazine) est déterminé selon la méthode de Que *et al.* (2006). En présence des antioxydants, le radical libre DPPH est réduit en acceptant un hydrogène ou un électron, le degré de décoloration de la solution violette du DPPH reflète le potentiel de piégeage de l'extrait (Nic'Iforovic *et al.*, 2010). Le milieu réactionnel pour ce test est composé de 1 ml de chaque échantillon à différentes concentrations et 1 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.01 M). Les mélanges sont incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'hydroxytoluène butylé (BHT) est utilisé comme contrôle positif. La capacité antiradicalaire est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

La concentration inhibitrice de 50% (CI₅₀) du DPPH et exprimée en µg/ml.

II.3.2. Effet scavenger du radical OH[•]

La capacité de piégeage des radicaux hydroxyles (OH[•]) est mesurée selon la méthode décrite par Ates *et al.*, (2008). Le mélange réactionnel (3 ml) est composé d'un ml de FeSO₄ (1.5mM), 0.7 ml de H₂O₂ (6 mM), 0.3 ml de salicylate de sodium (20 mM) et de différentes concentrations d'extrait ou d'antioxydant standard (BHA). Après une heure d'incubation à 37 °C, l'absorbance est mesurée à 562 nm. L'effet scavenger du radical OH[•] est déterminé selon l'équation:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Contrôle}] \times 100.$$

II.3.3. Effet scavenger du radical ABTS^{•+}

Les radicaux libres de l'ABTS (Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) peuvent être régénérés de l'oxydation des molécules d'ABTS par du persulfate de potassium et réduits en présence d'un antioxydant (Yang *et al.*, 2015). L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de ce radical est déterminée selon Re *et al.* (1999). L'ABTS (7 mM) est dissous dans de l'eau distillée. Les radicaux ABTS^{•+} sont obtenus par la réaction de la solution mère d'ABTS avec la solution du persulfate de potassium (2.45 mM). Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12-16 h avant l'utilisation.

La solution ABTS^{•+} est diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 0,70 à 734 nm. Ensuite, 1 ml de cette solution est ajouté à 50 µl de la solution des extraits et de la vitamine C à différentes concentrations. Après 30 min d'incubation, l'absorbance est lue à 734 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Contrôle}] \times 100.$$

II.3.4. Chélation du fer ferreux

La capacité des extraits à chélater les ions de fer est estimée selon la méthode décrite par Le *et al.* (2007). Brièvement, 1 ml de différentes concentrations d'extrait ou de témoin positif (EDTA) est mélangé avec 100 µl de FeCl₂ (0,6 mM) et 900 µl de méthanol. Après 5 min, 100 µl de ferrozine (5 mM) sont additionnés. Ensuite, les mélanges sont incubés pendant 10 min avant de mesurer l'absorbance à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ est calculé comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Contrôle}] \times 100.$$

II.3.5. Pouvoir réducteur

La présence des composés réducteurs dans les échantillons provoque la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure à la forme ferreuse. Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé selon la méthode décrite par Beyhan *et al.* (2010). 1 ml de différentes concentrations d'extrait est mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5 ml de la solution du ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1%. Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés au mélange. Après une agitation vigoureuse, 2,5 ml de cette solution sont mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl_3 (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le BHA est utilisé comme témoin positif. La CE_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5, elle est calculée à partir de l'équation de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.3.6. Test de blanchissement du β -carotène/ acide linoléique

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β - carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique, selon la méthode décrite par Miraliakbari et Shahidi (2008). L'émulsion de β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Ensuite, le chloroforme est complètement évaporé à 45°C au rotavapeur, avant d'ajouter 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène. 500 μl de la solution d'extrait ou BHT solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion. Pour le contrôle négatif l'échantillon est remplacé par 500 μl de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence des échantillons est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 2 heures. La capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique .

II.4. Etude de la toxicité

II.4.1. Test de toxicité aiguë

La toxicité aiguë se manifeste rapidement après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. Pour l'évaluer, les lignes directrices pour les essais des produits

chimiques de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 425, 2008) ont été adoptées. Des souris mâles, Nmr18, adultes de poids variant entre 25 et 30 g ont été réparties selon l'homogénéité de leurs poids en 5 lots de 5 souris chacun comme suit:

Groupe 1: ont reçu de l'eau physiologique.

Groupe 2 et 3: ont reçu l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* (2 et 5 g/kg respectivement).

Groupe 4 et 5: ont reçu l'extrait aqueux de *L. amplexicaule* (2 et 5 g/kg respectivement).

Notant que, ces souris sont préalablement mises à jeun pendant 18 h et l'administration de l'extrait se fait par gavage d'une seule prise.

Après gavage; les souris sont observées régulièrement pendant les premières 24 heures puis chaque jour pendant 14 jours. Ces observations ont porté principalement sur la mortalité, l'état physiologique et l'évolution des poids corporels qui sont enregistrés au premier, septième et quatorzième jour. À la fin de la période de l'étude, les souris ont été mises à jeun 4h avant d'être sacrifiées.

a. Préparation du plasma et analyse biochimique

Le sang de chaque souris est prélevé dans des tubes héparinés puis centrifugé à 3000 tr / min pendant 10 min pour récupérer le sérum.

Les paramètres biochimiques plasmatiques: glucose, cholestérol, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), acide urique et créatinine ont été analysés. L'analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire de Biochimie du Centre anti-cancer de Sétif, Algérie, en utilisant un analyseur automatique Bechaman.

b. Poids des organes

Dans le but d'examiner les organes internes, les souris ont été disséquées pour prélever et peser les organes (foie, rate, reins, cœur, poumons). Le poids relatif d'organe de chaque animal a ensuite été calculé selon l'équation suivante:

Poids relatif d'organe = (poids d'organe/poids corporel de l'animal le jour du sacrifice) *100.

Ces organes sont soumis à un examen macroscopique qui consiste en l'observation de la structure externe, la couleur, la consistance et la texture. Le foie et les reins de chaque souris ont été fixés dans du formol à 10% pour les études histopathologiques.

c. Analyse histologique

Les coupes histologiques des foies et des reins sont effectuées au CHU de Sétif (service de pathologie anatomique). Les échantillons fixés dans le formol 10%, sont déshydratés à l'aide d'un appareil automatique permettant le passage automatique et progressif dans 7 Bains : eau, alcool, 3 xylène, 2 Paraffine. La pièce est alors plongée dans un bain de paraffine liquide puis incubée dans un bloc de paraffine. Les coupes minces (5 µm en moyenne) sont obtenues à l'aide d'un microtome, puis étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée. La coloration des lames a été faite par un système hématoxyline/éosine.

Enfin, les coupes sont observées au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

II.4.2. Test de cytotoxicité *in vitro*

Afin d'évaluer la cytotoxicité des extraits EAqM, EAqL, EAqM, EAqL, la lignée de cellules Caco-2 obtenue de l'unité de culture cellulaire de l'Université de Grenade (Grenade, Espagne) est utilisée. Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI, additionnées de: 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, L-glutamine (2 mmol/L), pénicilline (100 unités/mL) et streptomycine (1 mg/mL) dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37°. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 5 x 10⁵ cellules / puits jusqu'à la formation d'une monocouche et pré-incubées avec différentes concentrations des extraits (50 et 100 µg / mL) pendant 24 h. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif. Après 24 h, l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire a été vérifié suivant le protocole du fabricant CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA). En ajoutant la solution de [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium] à chaque puits et incubée pendant 1-4 h. L'absorbance du milieu a été mesurée à 490 nm sur un lecteur MRX Dynexmicroplate (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). La viabilité cellulaire a été calculée à partir de la valeur d'absorbance et comparée à celle des cellules témoins non traitées.

II.5. Activité hépatoprotectrice *in vivo*

II.5.1. Induction de l'hépatotoxicité par le tétrachlorure de carbone (CCl₄)

L'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux de la plante *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée selon le protocole décrit par Wang *et al.* (2004) en utilisant le CCl₄ comme agent déclenchant de l'hépatotoxicité. Brièvement, après une période d'adaptation de sept jours; des rats males (Albino) sont divisés en huit groupes de six individus chacun comme suit:

- Groupe 1, 2 et 3 ont reçu oralement 3 ml d'eau physiologique /kg/ jour.
- Groupes 4 et 5 sont administrés par gavage des doses d'extraits aqueux de *M. rotundifolia* 250 et 500 mg/kg/jours respectivement.
- Groupes 6 et 7 sont traités par gavage des doses d'extrait aqueux de *L. amplexicaule* 250 et 500 mg/kg/jours, respectivement.
- Groupes 8: les rats de ce groupe ont reçu par gavage la vitamine C (200 mg/kg).

Au septième jour, après la prise orale de la dernière dose, les groupes (3, 4, 5, 6, 7, 8) sont traités par le CCl₄ (3ml/kg), dilué au demi dans de l'huile d'olive, par voie intrapéritonéale. Le groupe 1 est gardé comme normaux. Le groupe 2 a reçu le véhicule (huile d'olive) (3ml/kg). Au bout du huitième jour, les rats sont sacrifiés, le sang est immédiatement récupéré dans des tubes héparinés et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes pour l'obtention du sérum. Les foies et les reins sont récupérés, nettoyés avec du NaCl 0.9% stérile et froid, puis fixés dans le formol (10%) pour les analyses histopathologiques.

II.5.2. Analyses biochimiques

Les enzymes hépatiques (alanine transaminase (ALAT), aspartate transaminase (ASAT), phosphatase alcaline (ALP)), les protéines totales, l'urée et la créatinine, sont dosées dans le sérum en utilisant des kits de diagnostic Sprinreact (Espagne) et un analyseur automatique (Bechaman) au niveau du Laboratoire de Biochimie du Centre anti-cancer de Sétif, Algérie.

II.5.3. Etude histologique

Les coupes histologiques des foies et des reins sont effectuées au CHU de Sétif (service de pathologie anatomique) selon le protocole décrit précédemment avec le test de la toxicité aigue.

II.6. Activité anti-inflammatoire

II.6.1. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée selon le test d'inhibition de la dénaturation des protéines selon le protocole de Williams *et al* (2008). Brièvement, 500 µl du BSA (0.2 %) préparé préalablement dans un tampon tris-HCl (20 mM, pH 6.8) sont ajoutés à 500 µl des différentes concentrations des extraits ou de Diclofenac (250 µg/ml). Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 20 min puis à 65 °C pendant 10 min. Après refroidissement des tubes, les absorbances sont mesurées à 660 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

II.6.2. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

II.6.2. 1. Œdème de l'oreille induit par le xylène

L'évaluation de l'effet anti-œdémateux local des extraits est effectuée selon la méthode décrite par Manga *et al* (2004). Brièvement, des souris Nmr1s sont réparties en 8 groupes et reçoivent par voie orale les extraits et le contrôle positif comme suit:

Groupe 1: témoin négatif (contrôle): a reçu uniquement de l'eau distillée.

Groupe 2: témoin positif: a reçu de l'aspirine (150 mg/kg).

Groupes 3, 4, 5: traités par l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* (100, 250, 500 mg/kg du poids corporel respectivement).

Groupes 6, 7, 8: traités par l'extrait aqueux de *L. amplexicaule* (100, 250, 500 mg/kg du poids corporel respectivement).

Après une heure, l'inflammation cutanée de la face interne de l'oreille des souris est induite par l'application de 20 µl de xylène.

2 heures après cette application, l'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital. La différence de l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'œdème chez les souris traitées en comparaison avec les souris du groupe témoin négatif comme suit.

Activité anti-inflammatoire % = $(\Delta \text{ épaisseur C} - \Delta \text{ épaisseur E} / \Delta \text{ épaisseur C}) \times 100$

$\Delta \text{ épaisseur C}$: différence de l'épaisseur du groupe Contrôle (2h- 0h)

$\Delta \text{ épaisseur E}$: différence de l'épaisseur du groupe échantillon (2h- 0h).

II.6.2.2. Inflammation aiguë induite par la λ -carraginane chez les rats

L'œdème de la patte induit par la λ -carraginane chez le rat a été évalué selon la méthode décrite par Elion Itou *et al*, (2014).

Des rats Albino pesant entre 150-180 mg sont divisés en huit groupes de six chacun, comme suit:

- Le groupe 1 est gardé comme témoin recevant seulement de l'eau distillée.
- Les groupe 2, 3, 4 ont reçu par voie orale l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* (100, 250, 500 mg /kg respectivement).
- Les groupe 5, 6, 7 ont reçu l'extrait aqueux de *L. amplexicaule* (100, 250, 500 mg/kg respectivement).
- Le groupe 8 a reçu par voie orale le diclofénac (5 mg/kg).

Une heure après l'administration orale des échantillons, 0.2 ml de λ -carraginane (1%) est injecté dans la patte arrière gauche de chaque rat. L'épaisseur de la patte est mesurée chaque heure pendant 6h après l'administration de la λ -carraginane en utilisant un pied à coulisse. Le pourcentage d'inhibition de l'augmentation de l'épaisseur de la patte dans le temps est calculé en utilisant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition de l'œdème de la patte} = (E_c - E_t / E_c) \times 100$$

Où E_c et E_t représentent l'épaisseur moyenne de la patte de l'animal témoin et traité respectivement.

II.6.3. Activité Analgésique

L'activité analgésique des extraits aqueux de *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée par le test des torsions selon la méthode décrite par Koster *et al.* (1959).

Des souris mâles de 25 à 30 g sont maintenues à jeun pendant 18 h avant le test puis réparties en huit groupes de six chacun comme suit :

- Le groupe 1, représente le contrôle négatif, il est administré par voie orale de l'eau distillée seulement
- L'aspirine (100 mg / kg) utilisé comme témoin positif, est administré au groupe 2.
- L'extrait aqueux de la plante *Mentha rotundifolia* est administré aux groupes 2, 3 et 4 en trois doses différentes (100, 250 et 500 mg / kg de poids corporel respectivement).
- Les groupes 5, 6 et 7 ont reçu l'extrait aqueux de la plante *Lamium amplexicaule* (100, 250 et 500 mg / kg de poids corporel respectivement).

Une heure après administration des échantillons, un volume de 10 ml/kg d'acide acétique à 0.6 % est ensuite injecté par voie intra péritonéale. Le syndrome douloureux est caractérisé par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsions de la musculature dorso-abdominale.

Chaque souris est observée individuellement pour compter le nombre de convulsions à partir de la 5^{ème} minute de l'administration de l'acide acétique jusqu'à 30 minutes. La moyenne du nombre de convulsions dans chaque groupe traité est calculée. Le pourcentage d'inhibition de convulsions est calculé selon la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition = [(moyenne de convulsions du contrôle négatif - moyenne de convulsions du groupe traité) / moyenne de convulsions du contrôle négatif] × 100.

II.6.4. Propriétés immunomodulatrices *in vitro*

L'effet immunomodulateur des extraits EAqM, EAcM, EAqL et EAcL est évalué en utilisant la lignée cellulaire macrophages RAW 264 fournie par l'unité de culture cellulaire de l'Université de Grenade (Grenade, Espagne). Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI, contenant 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, L-glutamine (2 mmol / L), pénicilline (100 unités/ mL) et streptomycine (1 mg / mL) dans un milieu à atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à

une densité de 5×10^5 cellules / puits, cultivées jusqu'à la formation d'une monocouche, pré-incubées avec différentes concentrations des extraits (50 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) pendant 2 h et stimulées avec le lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) (100 ng/ mL) pendant 24 h. Les concentrations d'extraits ont été préparées à partir d'une solution mère obtenue en dissolvant 20 mg de chaque extrait dans un mélange de milieu DMSO/ RPMI (0,1mL/0,9mL).

Des cellules non stimulées et non traitées et des cellules stimulées par LPS ont été utilisées comme contrôles négatifs et positifs respectivement. Après la période de stimulation, les surnageants ont été recueillis et les niveaux de nitrites ont été mesurés par la méthode de Griess (sulfanilamide à 1%, m/v, dans de l'acide phosphorique à 5% et 0,1% de N-1-naphtyléthylènediamine, dans de l'eau). L'absorbance du milieu a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un lecteur MRX Dynexmicroplate (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) et interpolée dans la courbe d'étalonnage correspondante pour calculer les concentrations en nitrites en tant que détermination indirecte de la production d'oxyde nitrique. L'effet des extraits sur la viabilité des cellules a été évalué avec le test de la prolifération cellulaire AQueous One Solution de CellTiter 96® (Promega, Madison, WI, États-Unis) selon le protocole décrit par le fabricant, en ajoutant du [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H- tétrazolium] dans chaque puits et incubé pendant 1-4 h. L'absorbance du milieu a été mesurée à 490 nm sur un lecteur MRX Dynexmicroplate (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). La viabilité cellulaire a été calculée à partir de la valeur d'absorbance et comparée à celle des cellules témoins non traitées.

II.7. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD, tandis que ceux effectués *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm écart type. L'analyse de variance est effectuée par le test d'Anova One Way, suivie par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples, en utilisant le logiciel de Graph Pad. Prism.V5.00. La différence est considérée statistiquement significative au seuil de 5% ($P < 0.05$).

Résultats

Et

Discussion

Résultats et Discussion

1. Rendement

L'extraction des composés phénoliques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est effectuée par deux méthodes différentes: les extraits aqueux EAqM et EAqL obtenus par décoction ont donné des rendements de 14.2% et 19.36% pour *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* respectivement. Cependant, les extraits acétoniques obtenus par Soxhlet ont donné des rendements respectifs de 3.08% et 3.92% (m/m).

2. Etude phytochimique

2. 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

L'estimation de la quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans les différents extraits est évaluée par la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement. Les teneurs sont déterminées en se référant à des courbes d'étalonnage tracées en fonction de différentes concentrations d'acide gallique pour les polyphénols et de quercétine pour les flavonoïdes (figure 6), les résultats sont présentés dans le **tableau 4**.

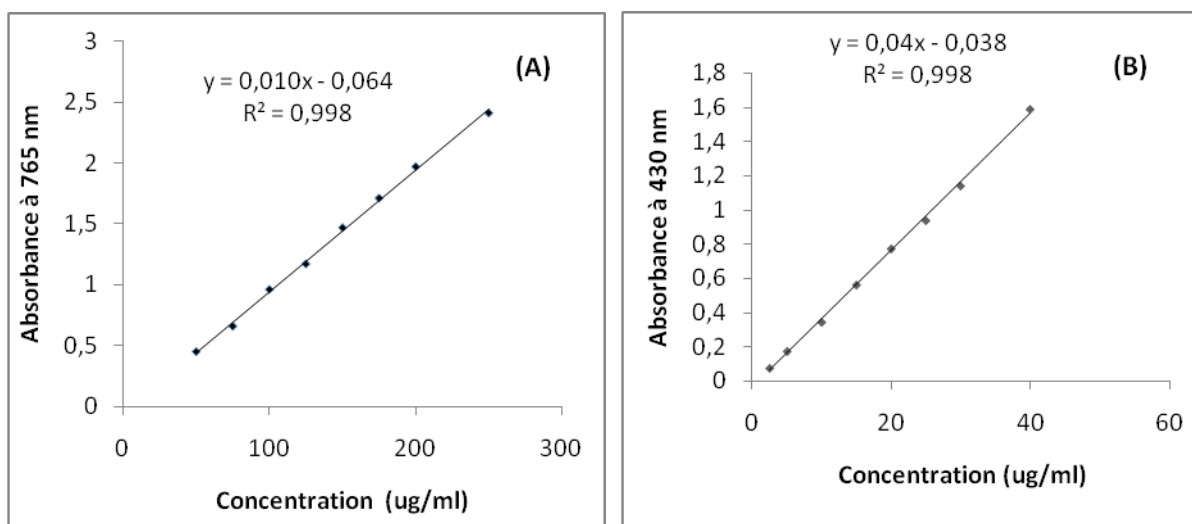


Figure 6: Droite d'étalonnage des absorbances relatives en fonction des concentrations d'acide gallique (A) et de quercétine (B)

Tableau 4: Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

Extraits	Polyphénols (mg EAG/g extrait)	Flavonoïdes (mg EQ /g extrait)
EAqM	154.15±1.95	29.358±2.009
EAcM	113.7±2	16.275±0.375
EAqL	42.466±1.037	7.962±0.012
EAcL	32.433 ±1.369	7.7±0.125

2.2. Identification des constituants chimiques des extraits par LC-MS/MS

L'analyse phytochimique des extraits par LC-MS/MS a révélé la présence de plusieurs composés phénoliques (**figure 7**). Parmi les 22 standards utilisés, l'analyse a permis d'identifier 15 composés phénoliques dans l'EAqM et 16 dans l'EAcM, le composé majoritaire était l'acide rosmarinique (6610 ng/ml et 6370 ng/ml pour EAqM et EAcM respectivement). Concernant la plante *L. amplexicaule*, l'analyse a révélé la présence de 17 composés dans l'extrait aqueux et 16 composés dans l'extrait acétonique. L'acide chlorogénique est détecté comme étant le composé majoritaire avec des teneurs de 11600 ng/ml et 2860 ng/ml pour EAqL et EAcL respectivement (**Tableau 5**).

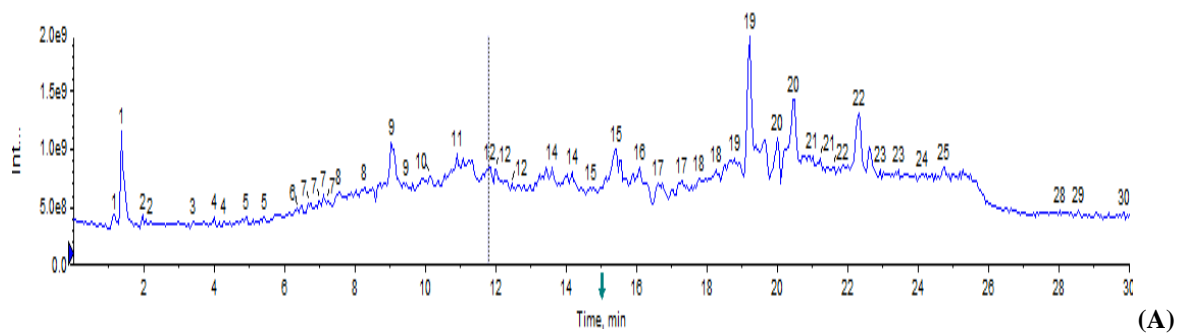
Résultats et Discussion

Tableau 5: Composés phénoliques identifiés par LC-MS/MS dans les extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*

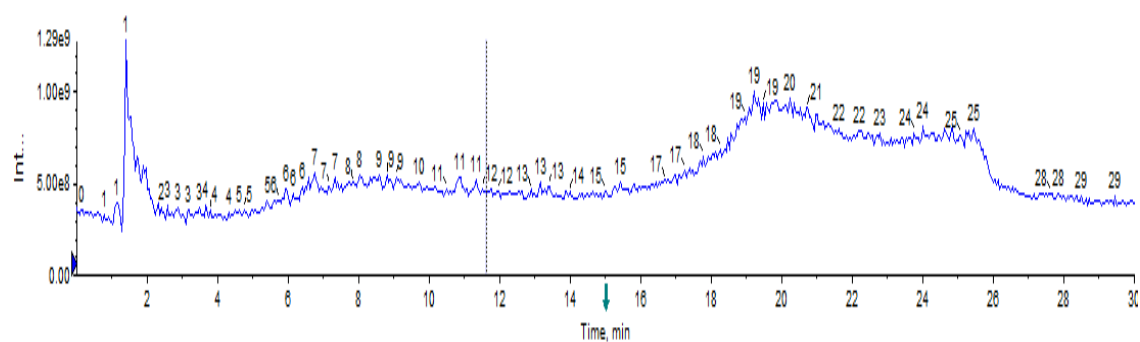
Composés	C (ng/ml)							
	RT	MWT	Q1	Q3	EAqM	EAcM	EAqL	EAcL
Acid Gallique	1,53	170,12	169	124,6	/	/	/	/
Catechole	5,5	110,11	109	109	/	/	/	/
Acid Chlorogenique	5,94	354,31	353,155	190.4/84.8/93.1	77,4	197	11600	2860
Acide Vanillique	6,38	168,15	166,66	107.8/151.2/151.7	67,8	260	217	292
Procyanidine B2	6,4	578,52	577,1	407/ 289	/	/	/	/
Acide Hydroxybenzoïque	6,48	135,12	134,779	88.4/106.8/89.1	29,9	77,7	35,6	9,22
Acide Syringique	6,48	198,17	196,718	120.4/120.7/152.3	95,1	197	542	150
Acide Caféique	6,5	18,16	178,465	134.2/106.4/89.1	23,4	50,8	21,9	/
Epicatechin	6,57	290,3	289,1	108,8	/	/	/	/
Epigallocatechin Gallate	6,66	458,372	456,579	168.2/ 168.5/124.8	N/A	/	/	/
Rutine	6,84	610,52	609,419	299/299.9/270.9	64,8	139	10400	1870
Quercetine3-O-Galactoside	7	464,379	463	301	45,6	32,7	1670	429
Isoquercitrine	7	464,4	464,9	300	20	/	404	110
Myrtilline	7,01	500,8	462,178	299.8/270.8/254.7	0,414	18,1	333	76,8
Acide P-Cumarique	7,06	164,16	162,756	118.8/118.1/92.7	75,8	262	130	131
Acide Ferulique	7,2	194,18	192,807	133.9/133.4/177.8	93	99,2	133	81,2
Acide Rosmarique	7,38	360,32	358,319	160.7/161/132.7	6610	6370	102	56,5
Acide Transcinamaldehyde	7,95	132,16	131,797	103.7/102.8/101.9	/	171	/	7,97
Luteoline	8	286,24	285	217	40,9	263	3,75	/
Cyanine Chlorid	8	287,1	286,198	133.4/132.8/150.6	59,9	438	12,1	9,66
Acide Ellagique	8,01	302,197	300,703	149.7/150.6/149.9	/	/	71,4	30,4
Quercetine	8,01	302,2	300,604	150,4	/	8,09	39,1	7,74
Apigenine	8,4	270,12	269	151	9,12	139	5,74	19
Hypericine	10, 53	504,45	503	405	/	/	/	/

C: concentration de composé phénolique, **Q₁:** poids moléculaire du composé, **Q₃:** poids moléculaire du fragment, **MWT:** poids moléculaire théorique.

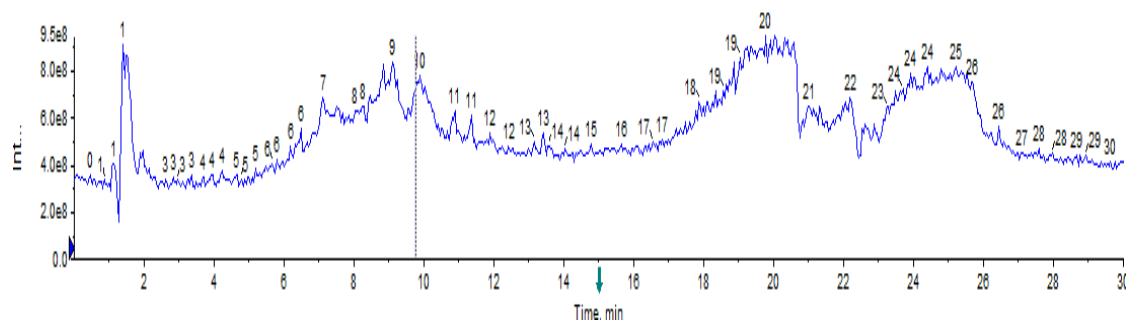
Résultats et Discussion



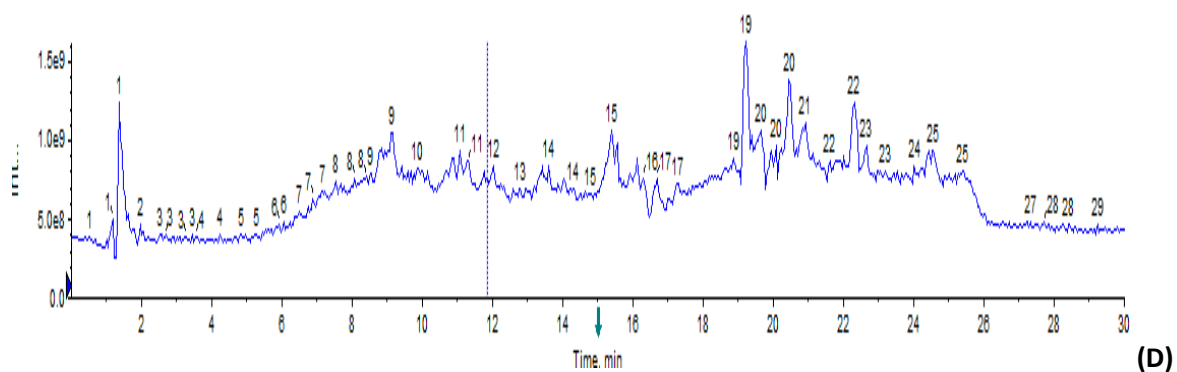
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 7. Chromatogramme des extraits des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* (A) EAqM, (B) EAcM, (C) EAqL, (D) EAcL obtenus par HPLC-UV.

L'extraction est une étape très importante pour la mise en évidence des principes actifs des plantes et ainsi leur valorisation sur le plan thérapeutique. Dans ce travail, l'extraction est effectuée sur le broyat des parties aériennes des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* séchées à l'air et à l'abri de la lumière. Selon Azwanida (2015), la diminution de la taille des particules du broyat des plantes augmente la surface de contact entre les molécules recherchées et les solvants d'extraction sachant que la taille des particules inférieure à 0,5 mm est idéale pour une extraction efficace. Dans le but d'extraire les principes actifs de ces plantes, deux méthodes d'extraction sont adoptées: extraction par décoction dans de l'eau distillée et extraction au Soxhlet en utilisant l'acétone comme solvant. Les résultats montrent que le rendement des extraits aqueux est supérieur à celui des extraits acétoniques pour les deux plantes. Comme les polyphénols sont connus par leurs effets thérapeutiques contre une grande variété de pathologies, leur dosage est effectué en utilisant la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteu, cette méthode universelle est basée sur le transfert d'électrons entre les constituants du réactif et les composés phénoliques. Néanmoins, la présence d'autres composés réducteurs (acides aminés, l'acide déhydroascorbique (DHA) et les sucres réducteurs) dans les extraits peuvent aussi réagir avec ce réactif et influencer les résultats (Rangel *et al.*, 2013). La méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium est utilisée pour le dosage des flavonoïdes. Les résultats du dosage montrent que les extraits aqueux sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes que les extraits acétoniques.

Dans une étude réalisée par Boussouf *et al.*, (2017) sur les feuilles de la plante *M. rotundifolia*, récoltée au mois de septembre au Nord d'Algérie, l'extrait méthanolique obtenu par macération a donné des teneurs respectives en polyphénols et en flavonoïdes de 350.10 ± 0.96 mg EAG/g d'extrait et 79.44 ± 0.76 mg EQ/g d'extrait. Ces différences peuvent être dues à plusieurs facteurs qui peuvent influencer les teneurs et la nature des composés phénoliques des extraits comme : la région et la période de récolte des plantes, la partie utilisée, le temps et la température d'extraction, la polarité du solvant...etc. (Tiwari *et al.*, 2011).

Afin d'identifier les composés phénoliques des quatre extraits, une LC-MS/MS est effectuée. Sur la base de la comparaison de leurs profils chromatographiques et les temps de rétention avec ceux des standards utilisés; plusieurs composés phénoliques d'intérêt thérapeutique sont identifiés dans chaque plante. Concernant la plante *M. rotundifolia*, l'acide rosmarinique était le composé majoritaire; il a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs études scientifiques ce qui a permis de déterminer ses effets thérapeutiques : antioxydant (Bhat *et al.*, 2013), anticancéreux

(Hossan *et al.*, 2015), anti-inflammatoire (Rocha *et al.*, 2015), anti-Alzheimer (Tourandokht *et al.*, 2013; Habtemariam, 2018).

Le composé majoritaire de la plante *L. amplexicaule* est l'acide chlorogénique, qui est connu pour ses effets anticancéreux, anti-inflammatoire, antioxydant et anti-hypertensif (Jung *et al.*, 2017 ; Xue *et al.*, 2017 ; Bender et Atalay, 2018 ; Habtemariam, 2018). Une étude réalisée par Laggoune *et al.*, (2008) a permis d'isoler deux nouveaux flavonoïdes des parties aériennes de cette plante: (7-*O*-glucosyl-3-methylkaempferol ; 5, 7, 4-trihydroxy-3-methoxyflavone, chrysoeriol).

D'autres composés phénoliques en teneurs considérables sont aussi identifiés dans les deux plantes comme l'acide vanilique, lutéoline...etc. Notant que les quantités de ces composés diffèrent d'un extrait à un autre pour la même plante, ces différences sont probablement dues à la méthode et les solvants d'extraction utilisés.

3. Activité antioxydante

3.1. Effet scavenger du radical DPPH

Les résultats de ce test ont indiqué que tous les extraits testés ont exercé un effet scavenger remarquable contre le radical DPPH (**figure 8 A**). D'après les valeurs des CI_{50} , on remarque que l'extrait EA_{AcM} est le plus efficace ($CI_{50}=15.066\pm 0.449 \mu\text{g/ml}$) suivi par EA_{qM} ($CI_{50}=97.862\pm 0.218 \mu\text{g/ml}$), EA_{AcL} ($CI_{50}=107.961\pm 4.492 \mu\text{g/ml}$) et finalement EA_{qL} ($CI_{50}=110.023\pm 0.360 \mu\text{g/ml}$). Toutefois, l'effet des extraits reste inférieur à celui du BHA ($CI_{50}=5.742\pm 0.206 \mu\text{g/ml}$).

3.2. Effet scavenger du radical ABTS^{•+}

La réduction du radical ABTS^{•+} par les extraits est évaluée en suivant la diminution de l'absorbance à 734 nm (**figure 8 B**). D'après les valeurs des CI_{50} , le BHT a donné la valeur la plus faible ce qui reflète l'activité anti-radicalaire la plus forte ($CI_{50}=2.745\pm 0.180 \mu\text{g/ml}$). En ce qui concerne les extraits, l'EA_{qM} a révélé l'activité anti-radicalaire la plus forte avec une CI_{50} de $5.868\pm 0.487 \mu\text{g/ml}$. L'activité la plus faible est enregistrée pour EA_{AcL} ($CI_{50}=106.140\pm 2.408 \mu\text{g/ml}$), EA_{AcM} et EA_{qL} ont donné des valeurs d' CI_{50} de $22.026\pm 0.759 \mu\text{g/ml}$ et $34.485\pm 1.53 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

3.3. Effet scavenger du radical OH[•]

Parmi les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les radicaux hydroxyles sont les plus réactifs et les plus prédominants. Ce sont des radicaux endogènes générés au cours du métabolisme aérobie et peuvent initier des dommages cellulaires *in vivo* (Kang *et al.*, 2013). Pour ce test, les extraits acétoniques (EAcm et EAcl) ont montré un meilleur effet piègeur du radical OH[•] (CI₅₀ respectives 204.355 ± 3.925 µg/ml et 261.883±12.124 µg/ml) que les extraits aqueux (CI₅₀ = 377.232±4.995 µg/ml et 359.637±2.783 µg/ml pour EAqM et EAqL respectivement), cette activité est significativement inférieure à celle enregistrée pour la vitamine C (CI₅₀ = 194.868±1.836 µg/ml) (**figure 8 C**).

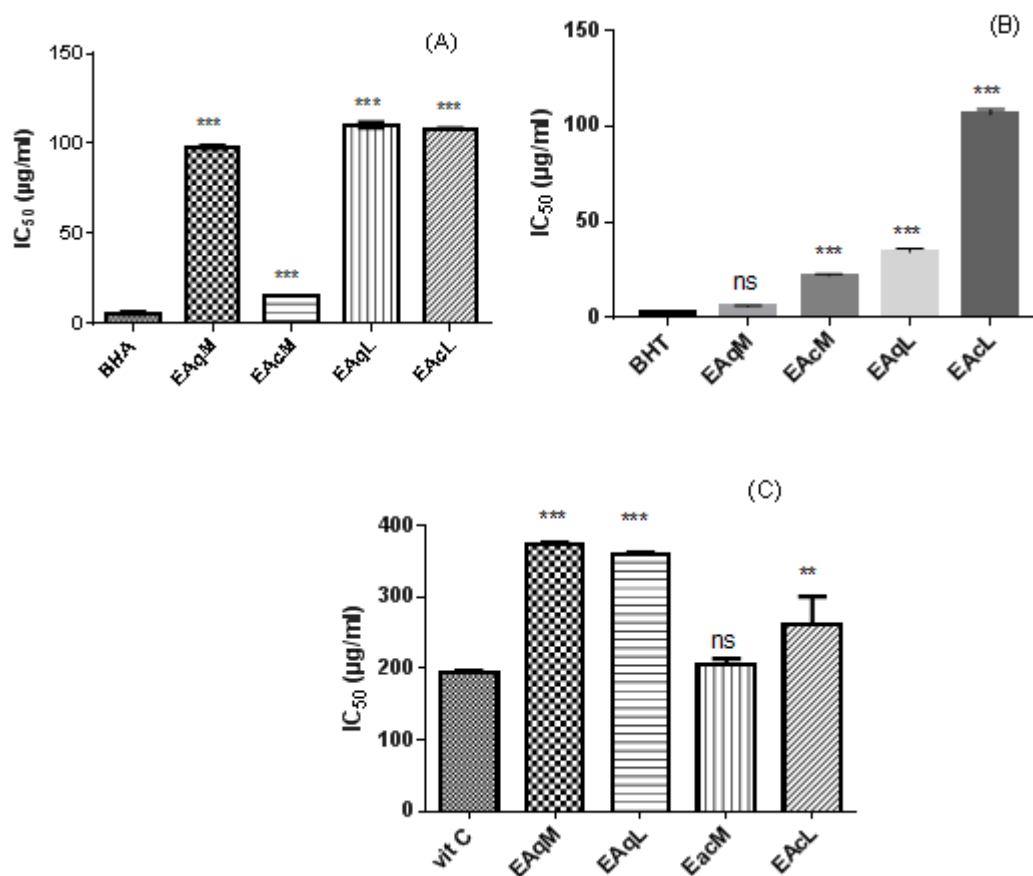


Figure 8: Effet piègeur des radicaux DPPH (A), (B) radical ABTS et radical OH[•] (C) par les extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*. Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n=3). * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001, ns: non significatif.

3.4. Chélation du fer ferreux

Les résultats de notre étude montrent que les différents extraits et le standard (EDTA) ont la capacité de capter l'ion ferreux avant qu'ils ne soient complexés par la ferrozine. L'activité chélatrice la plus importante est enregistrée pour l'EDTA ($CI_{50} = 6.273 \pm 0.288 \mu\text{g/ml}$), suivi par l'EAcL ($CI_{50} = 30.537 \pm 2.100 \mu\text{g/ml}$) puis l'EAqL ($CI_{50} = 53.856 \pm 1.274 \mu\text{g/ml}$) et l'EAqM ($CI_{50} = 128.155 \pm 5.887 \mu\text{g/ml}$), tandis que l'EAcM n'arrive pas à chélater 50% d'ions de fer ferreux et exerce une activité inhibitrice maximale de $22.713 \pm 3.323\%$ correspondant à la concentration $468.75 \mu\text{g/ml}$ (**figure 9 A**).

3.5. Test du pouvoir réducteur

La capacité des extraits à donner un électron reflète leur pouvoir antioxydant, et la réduction du Fe^{3+} est un indicateur de la capacité de l'échantillon à donner un électron. Dans ce test, le pouvoir réducteur des extraits est exprimé par la concentration effective à 50 % (EC_{50}). Les résultats illustrés dans la (**figure 9 B**) montrent que les extraits aqueux sont plus efficaces que les extraits acétoniques chez les deux plantes. En effet, l'EAqL présente la meilleure capacité réductrice (EC_{50} de $18,809 \pm 0,369 \mu\text{g/ml}$) suivi par l'EAqM (EC_{50} de $15,543 \pm 0,241 \mu\text{g/ml}$) ensuite l'EAcM (EC_{50} de $25,83 \pm 0,208 \mu\text{g/ml}$) et finalement l'EAcL ($EC_{50} = 81,666 \pm 0,771 \mu\text{g/ml}$). L'activité du contrôle positif (BHA) ($EC_{50} = 13,997 \pm 0,408 \mu\text{g/ml}$) reste significativement ($p \leq 0.05$) plus forte que celle de tous les extraits.

3.6. Test du blanchissement du β -carotène/acide linoléique

La cinétique de blanchissement du β carotène en absence et en présence des extraits est représentée par la (**figure 9 C**). Les résultats ont montré que le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β -carotène par les radicaux générés de l'acide linoléique diminue plus rapidement en présence des contrôles négatifs (H_2O et méthanol) qu'en présence des extraits. En présence du contrôle positif (BHT), les absorbances de la solution de β -carotène restent stables durant toute la période d'incubation. L'activité antioxydante calculée après 2 heures d'incubation montre que les différents extraits ont montré une activité antioxydante remarquable avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 79.778% et 84.666% et 84,731% et 85,097% pour l'EAcM, l'EAqM, EAqL et EAcL respectivement. Alors que les contrôles négatifs ont montré une activité antioxydante très faible ne dépassant pas 1,339% et 2,431% pour le H_2O et MEOH respectivement et celle du contrôle positif était 89,481%.

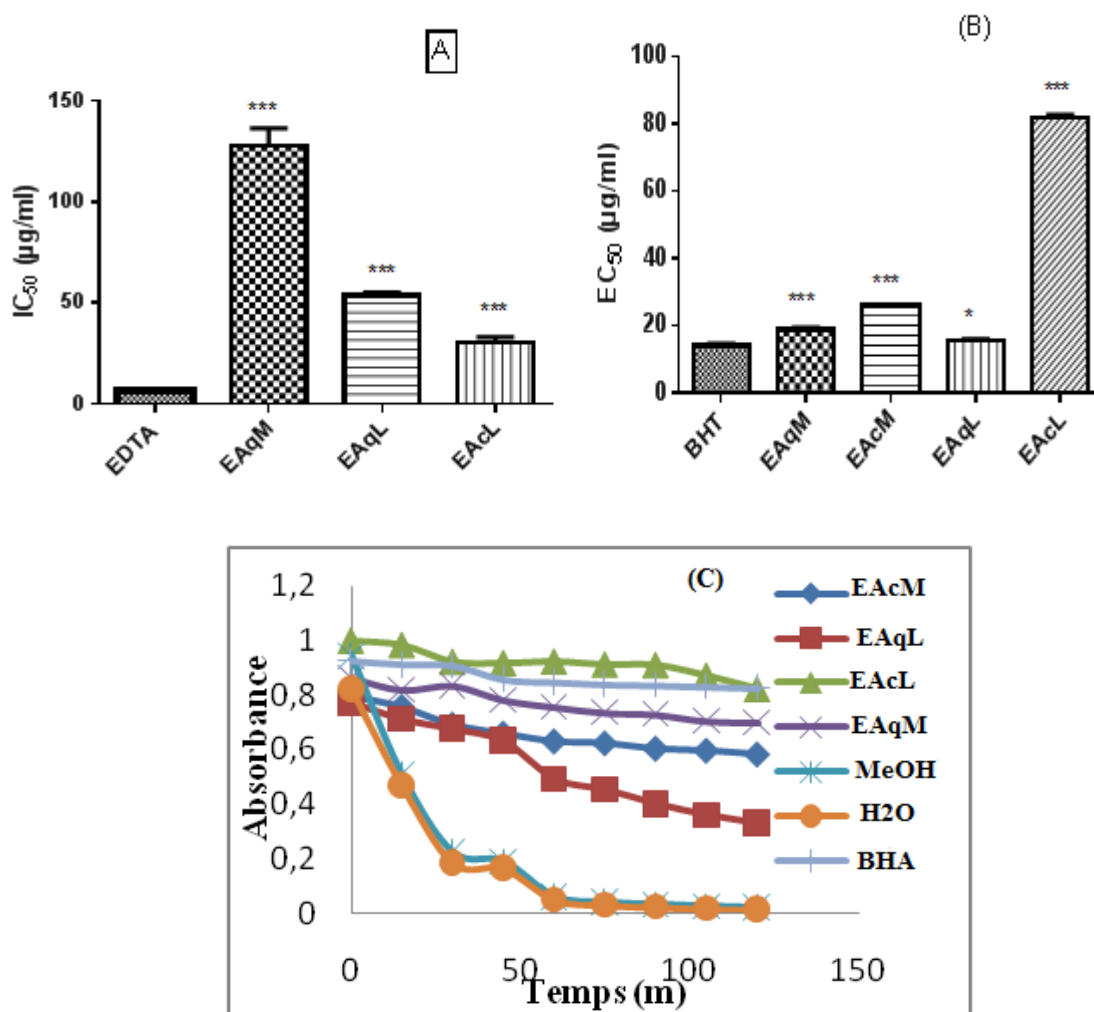


Figure 9: Activités antioxydantes des extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*: (A) chélation des ions de Fer ferreux, (B) test du pouvoir réducteur, (C) test du blanchissement du β-carotène. Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n=3). * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001, ns: non significatif.

Chaque année le risque du stress oxydatif et son interférence avec plusieurs maladies s'éclaire grâce aux multiples recherches scientifiques menées dans différents laboratoires à travers le monde. Dans ce contexte, l'activité antioxydante des extraits des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée par plusieurs tests puisque divers mécanismes réactionnels sont impliqués dans le processus de stress oxydatif et l'effet antioxydant est tributaire des molécules. Pour cela, Il n'y a pas une méthode unique par laquelle on peut déterminer l'activité antioxydante des échantillons d'une manière bien précise.

L'effet scavenger des extraits, évalué contre trois radicaux libres DPPH, ABTS et OH s'est avéré appréciable. Ce piégeage peut être tributaire de deux types de mécanismes: la libération

de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés antioxydants (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques), ou la libération d'un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes) (Popovici *et al.*, 2009).

Une étude réalisée par Brahmi *et al.*, (2015) sur l'effet de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique de la plante *M. rotundifolia*, a montré une activité de 38.50±1.96 mg équivalents de Trolox/g. une autre étude réalisée par Yumrutas et Saygideger (2010) a montré que les extraits méthanolique et hexanique de la plante *L. amplexicaule* ont un effet piègeur remarquable contre les radicaux DPPH et ABTS.

Selon Sivakumar et Meera, (2013) les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique. L'effet chélateur de nos extraits est évalué envers le fer ferreux (Fe^{2+}). Parmi les quatre extraits testés, juste trois arrivent à chélater 50% des molécules de fer ferreux. Cependant, EAcM révèle une activité relativement faible, dont le meilleur pourcentage d'inhibition était inférieur à 50%.

D'un autre côté, l'oxydation des lipides représente un grand risque sur les systèmes biologiques, l'inhibition de cette oxydation est évaluée *in vitro* par le test de blanchissement du β -carotène, les quatre extraits testés révèlent un effet significatif.

Les différences de l'efficacité entre les quatre extraits peuvent être liées à la différence des teneurs et des types de composés phénoliques. Aucune corrélation n'a été observée entre l'activité antioxydante des extraits et la teneur en polyphénols sauf avec le test de piégeage du radical ABTS où on a remarqué une corrélation linéaire. L'effet antioxydant peut être expliqué aussi par la présence d'autres composés non phénoliques dans les extraits. Une étude conduite par Riahi *et al.*, (2018) sur l'extrait méthanolique de la plante *M. rotundifolia* a montré la présence de 50 constituants entre- autres des composés phénoliques, des acides gras, des terpènes, des aldéhydes et des stéroïdes.

4. Evaluation de la toxicité des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*

4.1. Toxicité aigue *in vivo*

4.1.1. Mortalité et observations des comportements

Le suivi régulier du comportement des souris a révélé que les extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* n'ont provoqué aucun changement. De plus, aucun cas de mortalité n'a été enregistré pendant les deux semaines de l'étude, par conséquent, la dose létale de la moitié des souris (DL 50) est supérieure à 5 000 mg / kg de poids corporel pour les deux extraits.

4.1.2. Evolution du poids corporel

Le poids corporel des souris a augmenté progressivement tout au long de la période d'étude. (Tableau 6). L'analyse statistique du gain de poids corporel n'a révélé aucune différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin.

Tableau 6: Variation du poids corporel (mg) des souris traitées avec les extraits des deux plantes

	Control	EAqM (2g/kg)	EAcM (5g/kg)	EAqL (2g/kg)	EAcL (5g/kg)
1^{ier} Jours	27,666±1,095	26,16±0,897 ^{ns}	25±1,632 ^{ns}	26,166±1,138 ^{ns}	27,666±1,095 ^{ns}
7^{ème} Jours	31,333±1,000	28,16±1,067 ^{ns}	27,60±2,000 ^{ns}	28,000±3,000 ^{ns}	31,333±1,000 ^{ns}
14 Jours	32,000±0,748	30,50±0,957 ^{ns}	28±3,261 ^{ns}	28,50±2,958 ^{ns}	32,000±0,748 ^{ns}

Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle. ns: différence non significatif.

4.1.3. Poids relatifs des organes

L'administration orale des extraits n'a entraîné aucune modification significative du poids relatif des organes (foie, rate, reins, cœur, poumons) chez les souris traitées par rapport aux souris témoins (Tableau 7).

Tableau 7: Poids relatifs (%) des organes des souris traitées avec les extraits des deux plantes

Groupe	Fois	Rein	Rate	poumons	Cœur
Control	5,347± 0,074	1,321± 0,036	0,678±0,011	0,775±0,013	0,556± 0,0092
EAqM (2g/kg)	4,901±0,047 ^{ns}	1,426±0,024 ^{ns}	0,557±0,015 ^{ns}	0,688±0,006 ^{ns}	0,606±0,008 ^{ns}
EAqM (5g/kg)	5,686±0,045 ^{ns}	1,473±0,030 ^{ns}	1,140±0,053 ^{ns}	1,350±0,043 ^{ns}	1,175±0,046 ^{ns}
EAqL (2g/kg)	5,561±0,102 ^{ns}	1,377±0,026 ^{ns}	1,114±0,060 ^{ns}	0,815±0,013 ^{ns}	0,649±0,009 ^{ns}
EAqL (5g/kg)	5,4±0,025 ^{ns}	1,490±0,016 ^{ns}	1,181±0,045 ^{ns}	1,063±0,016 ^{ns}	0,581±0,007 ^{ns}

Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle. ns: différence non significatif.

4.1.4. Paramètres biochimiques

L'analyse statistique des paramètres évalués (ASAT, ALAT, cholestérol, glucose, créatinine, ac. urique) a montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les souris traitées et le groupe témoin. Cependant, une diminution significative ($p < 0,05$) de la dose du cholestérol a été enregistrée chez les souris traité par EAqL (2g/kg) (**Tableau 8**).

Tableau 8: Bilan hépatique et rénale des groupes des souris traitées par les extraits des plantes et le groupe control

Groupe	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)	Cholestérol (mg/dl)	Glucose (g/l)	Creatinine (mg/ml)	Ac. urique (mg/dL)
Controle	252±27,875	62,166±3,854	1,386±0,054	1,468±0,033	3,971±0,472	33,88± 7,930
EAqM (2g/kg)	190±6,659 ^{ns}	91±22,803 ^{ns}	1,31±0,030 ^{ns}	1,725±0,133 ^{ns}	5,961±0,654 ^{ns}	18,806±3,031 ^{ns}
EAqM (5g/kg)	207,44±3,129 ^{ns}	58,4±6,924 ^{ns}	1,1±0,085 ^{ns}	1,8±0,078 ^{ns}	5,445±0,343 ^{ns}	11,85± 2,851 ^{ns}
EAqL (2g/kg)	193,5±9,648 ^{ns}	81,5±13,680 ^{ns}	0,953±0,076 [*]	1,442±0,173 ^{ns}	3,87±0,433 ^{ns}	5,69±0,00 ^{ns}
EAqL (5g/kg)	204,5±12,765 ^{ns}	45,5±2,962 ^{ns}	1,062±0,061 ^{ns}	1,572±0,147 ^{ns}	3,267±0,441 ^{ns}	12,23± 2,698 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 5). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle. ns: différence non significatif.

4.1.5. Étude histologique

a. Histopathologie du foie

L'étude histologique des fois de souris traitées par les doses 2000 et 5000 mg/kg des extraits EAqM et EAqL n'a montré aucune toxicité apparente; ce qui manifeste par une architecture du tissu hépatique conservée et semblable à celle du groupe témoin, disposition radiaire

autour des veines centrolobulaires, absence de nécrose hépatocytaire ou d'infiltrat inflammatoire intralobulaire ou portal, à l'exception d'une discrète congestion observée, une dilatation de la veines centro-lobulaires est aussi peu marquée chez quelque souris (**figure 10**).

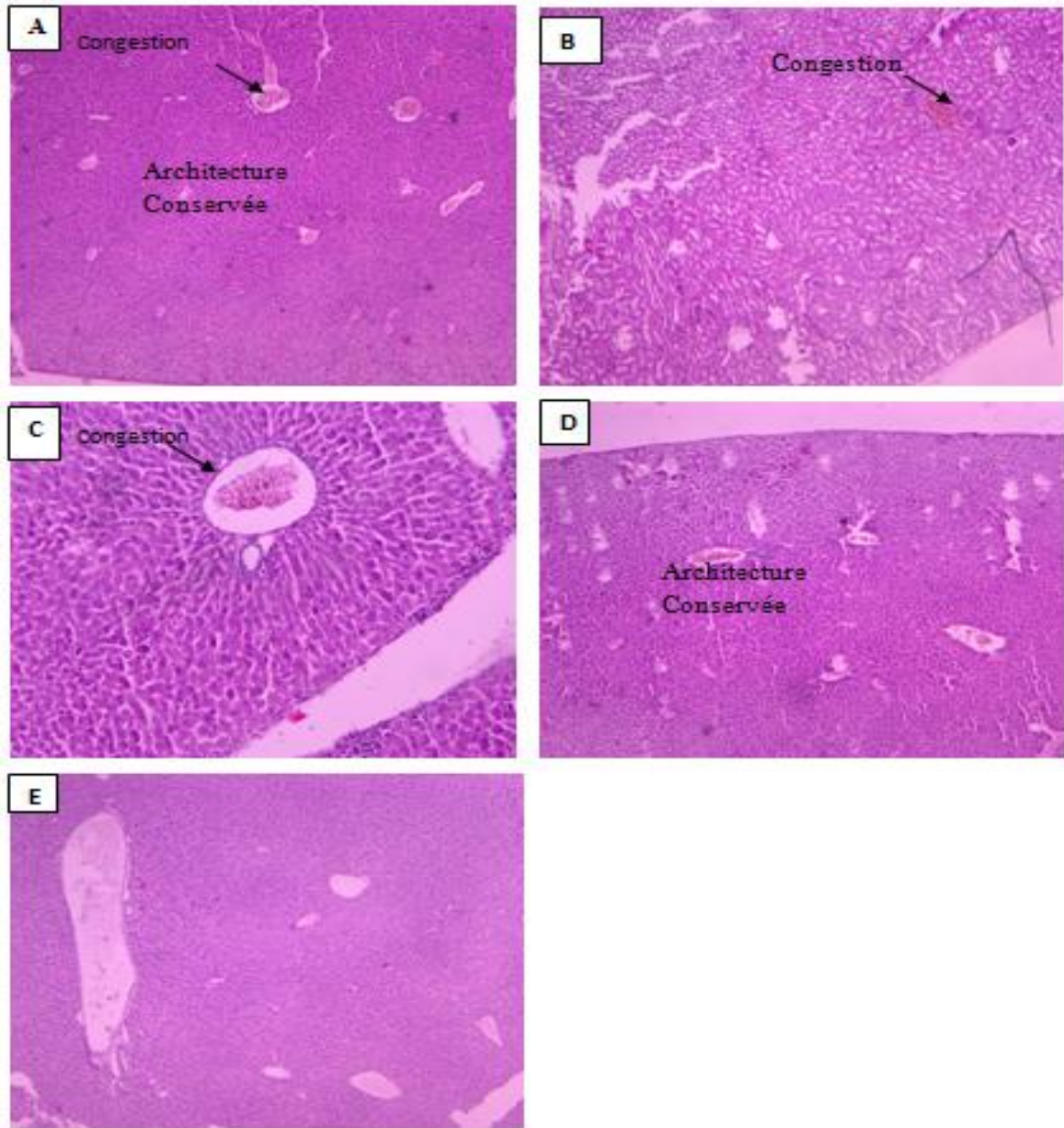


Figure 10: Coupes histologiques du foie de souris traitées par les extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* et du groupe normaux. (Dose 1 = 2g/kg, Dose 2= 5g/kg). **A:** parenchyme hépatique des souris traités par l'EAqM D₁, **B:** parenchyme hépatique des souris traités par l'EAqM D₂, **C:** parenchyme hépatique des souris traités par l'EAqL D₁, **D:** parenchyme hépatique des souris traités par l'EAqLD₂, **E:** parenchyme hépatique des souris du groupe normaux.

b. Histopathologie du rein

Les coupes histologiques des reins ont montré aussi une architecture conservée avec absence des lésions tissulaires dans tous les groupes expérimentaux traités (absence de nécrose tubulaire et d'infiltrat inflammatoire interstitiel...) à l'exception de la présence de discrète congestion non pathologique (**figure 11**).

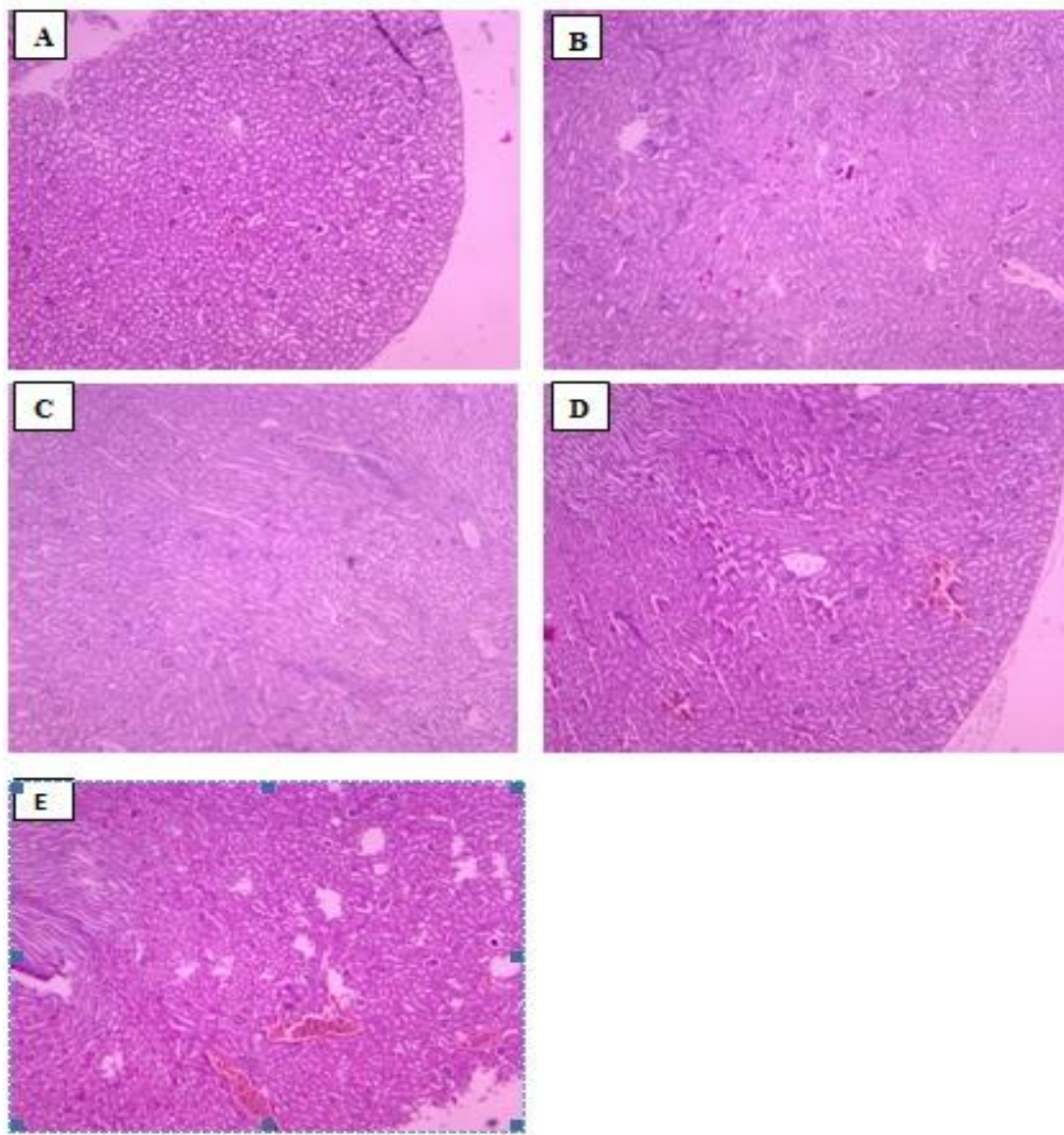


Figure 11: Coupes histologiques du rein de souris traitées par les extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* et du groupe normaux. (Dose 1 = 2g/kg, Dose 2= 5g/kg). **A:** Tissu rénal des souris traités par l'EAqM D₁, **B:** Tissu rénal des souris traités par l'EAqM D₂, **C :** Tissu rénal des souris traités par l'EAqL D₁, **D:** Tissu rénal des souris traités par l'EAqL D₂, **E:** Tissu rénal des souris du groupe normaux.

4.2. Etude de la cytotoxicité

L'étude préliminaire de l'activité cytotoxique n'a montré aucun effet significatif des quatre extraits (EAqM, EAqL, EAcm, EAcl) sur la prolifération cellulaire globale des cellules de Caco-2 (**Figure 12**).

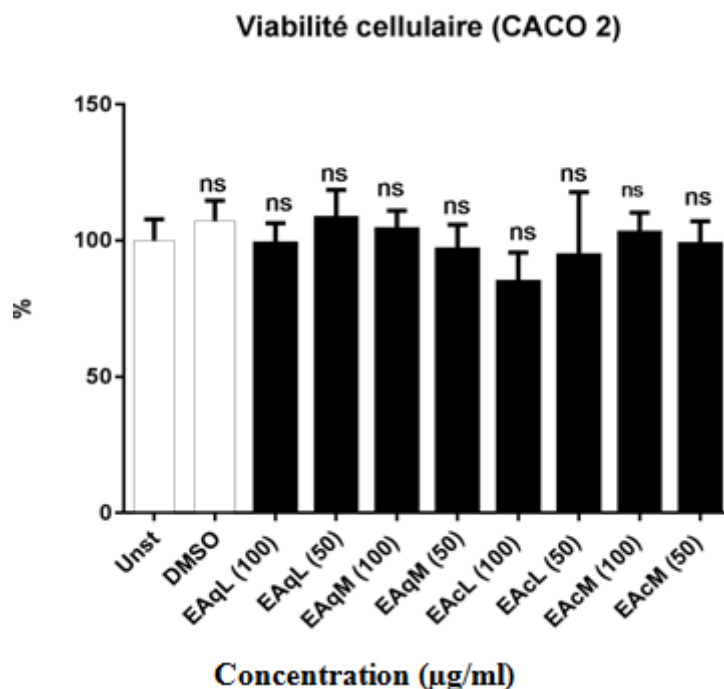


Figure 12: Effet des extraits EAqM, EAqL, EAcm, EAcl sur la viabilité et la prolifération des cellules Caco-2. ns : différence non significative. Contrôle: cellules non traitées.

Jadis, les plantes utilisées en médecine traditionnelle étaient considérées comme non toxiques. Cependant, les dernières enquêtes ont indiqué que beaucoup de ces plantes ont montré des effets indésirables. Par conséquent, l'évaluation de la toxicité de tout extrait de plante médicinale destiné à être utilisé chez l'animal ou chez l'homme est un préalable d'évaluation des profils thérapeutiques des plantes.

Pour cela la toxicité des extraits des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée *in vivo* sur des souris et *in vitro* sur les cellules de Cacao 2.

La toxicité se définit comme l'ensemble des effets néfastes qui peuvent être des lésions morphologiques et fonctionnelles dans un organisme vivant, provoquées par une substance introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées. (Etame *et al.*, 2017).

La toxicité aigüe de nos extraits est étudiée selon les recommandations de l'OCDO en fonction de plusieurs paramètres: la dose administrée, le taux de mortalité observé, l'évolution

pondérale, l'examen macroscopique de certains organes (foie, rate, reins, cœur et poumons), l'étude histopathologique du foie et du rein et la modification des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, cholestérol, glucose, créatinine et acide urique).

La présente étude révèle que l'administration par voie orale d'une dose unique de 2000 et 5000 mg/kg des deux extraits EAqM et EAqL, n'a engendré aucun effet négatif significatif sur l'ensemble des paramètres testés chez les souris traitées. Par conséquent, la DL₅₀ est supérieure à 5000 mg/kg.

D'après la classification de Diezi (1989), les extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* sont non toxiques. Donc, ces deux extraits peuvent être utilisés *in vivo* sans risque toxicologique aux doses inférieures à 5000 mg/kg. Nos résultats sont en accord avec une étude faite par Boussouf *et al.* (2017), sur l'extrait hydrométhanolique de la plante *M. rotundifolia* qui a montré une DL₅₀ supérieure à 5000 mg/Kg. D'après la littérature, l'acide rosmarinique (composé majoritaire de la plante *M. rotundifolia*) présente une toxicité très faible avec une DL₅₀ chez la souris de 561 mg/kg. Cette faible toxicité peut être expliquée par son élimination rapide du sang humain et de rat (Stanojkovic *et al.*; 2013).

Pour affirmer l'étude *in vivo*, la cytotoxicité des extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évaluée *in vitro* sur des cellules de Cacao 2. L'utilisation de lignées de cellules humaines est préférable car elle permet de prévoir facilement les effets possibles sur l'homme. Ce test fournit des données plus pertinentes pour l'homme que la valeur de la DL₅₀ obtenue lors d'études sur des animaux (Erhirhie *et al.*; 2018). Les résultats obtenus montrent que les quatre extraits n'ont aucune cytotoxicité aux doses 100 et 200 µg/ml. Selon l'Institut National American du Cancer (NCI), le critère d'activité cytotoxique pour les extraits bruts est exprimé en CI₅₀ (CI₅₀ est définie comme la concentration d'un produit qui peut inhiber la survie de 50% des cellules, comparé à un contrôle traité avec le véhicule) qui doit être inférieure à 30 µg /ml après une durée d'exposition de 72 heures (Povi *et al.*; 2015). Une étude réalisée par Stanojković *et al.*(2013) a montré que l'acide rosmarinique n'a aucune cytoxicité sur la lignée cellulaire saine MRC5 (fibroblaste des poumons des fœtus humains) (IC₅₀ >200 µg/ml).

5. Effet hépatoprotecteur

Cette activité est évaluée sur des rats male Albino qui reçoivent par voie orale les extraits aqueux de *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* pendant 7 jours. Ensuite, l'hépto-toxicité est induite par l'injection intra-péritonéale du tétrachlorure de carbone.

5.1. Paramètres biologiques

Les résultats de dosage des paramètres biochimiques hépatiques ALAT, ASAT et PAL montrent que l'intoxication des rats par l'injection intrapéritonéale du CCl₄ induit une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité des enzymes hépatiques ASAT, ALAT et PAL par rapport aux rats témoins (normaux) (**figure 13**). Ces résultats reflètent la lésion du tissu hépatique. Cependant, le traitement des rats par différentes concentrations (250 et 500 mg/Kg) des extraits aqueux de *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* réduit significativement l'activité de ces paramètres biochimiques par rapport au groupe contrôle traité par le CCl₄.

Les résultats de dosage des paramètres rénaux montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux plasmatique de l'urée, chez les rats intoxiqués par le CCl₄ par rapport aux rats du groupe contrôle. Cependant, le prétraitement avec les deux extraits ne présente aucune différence significative entre les différents groupes par rapport au groupe contrôle. Alors que, le taux plasmatique de la créatinine a diminué significativement chez les groupes traités par les extraits.

5.2. Etude histologique

Sur le plan histologique, les microphotographies obtenues à partir de l'examen histopathologique des foies montrent que l'architecture des foies des rats normaux est ordinaire à l'exception d'une discrète congestion non pathologique. Tandis que, ceux des foies des rats traités avec le CCl₄ présentent un aspect significativement différent à celui des rats du groupe normaux avec une congestion dans la veine centrale et sinusoïdale, une nécrose étendue des hépatocytes, des zones de stéatose et une infiltration des cellules inflammatoires... Les coupes histologiques des foies des rats ayant reçu un traitement préventif par les extraits EAqM et EAqL pendant 7 jours avant l'intoxication au CCl₄ ont révélé aussi différents signes de toxicité identiques à ceux enregistrés avec le CCl₄. Notant que, ces lésions hépatiques sont moins propagées dans les tissus des foies que celles observées chez les rats intoxiqués par le CCl₄ (**figure 14**).

Les coupes histologiques des reins ont montré l'absence des lésions tissulaires dans tous les groupes expérimentaux à l'exception de la présence de discrètes congestions non pathologiques (**figure 15**).

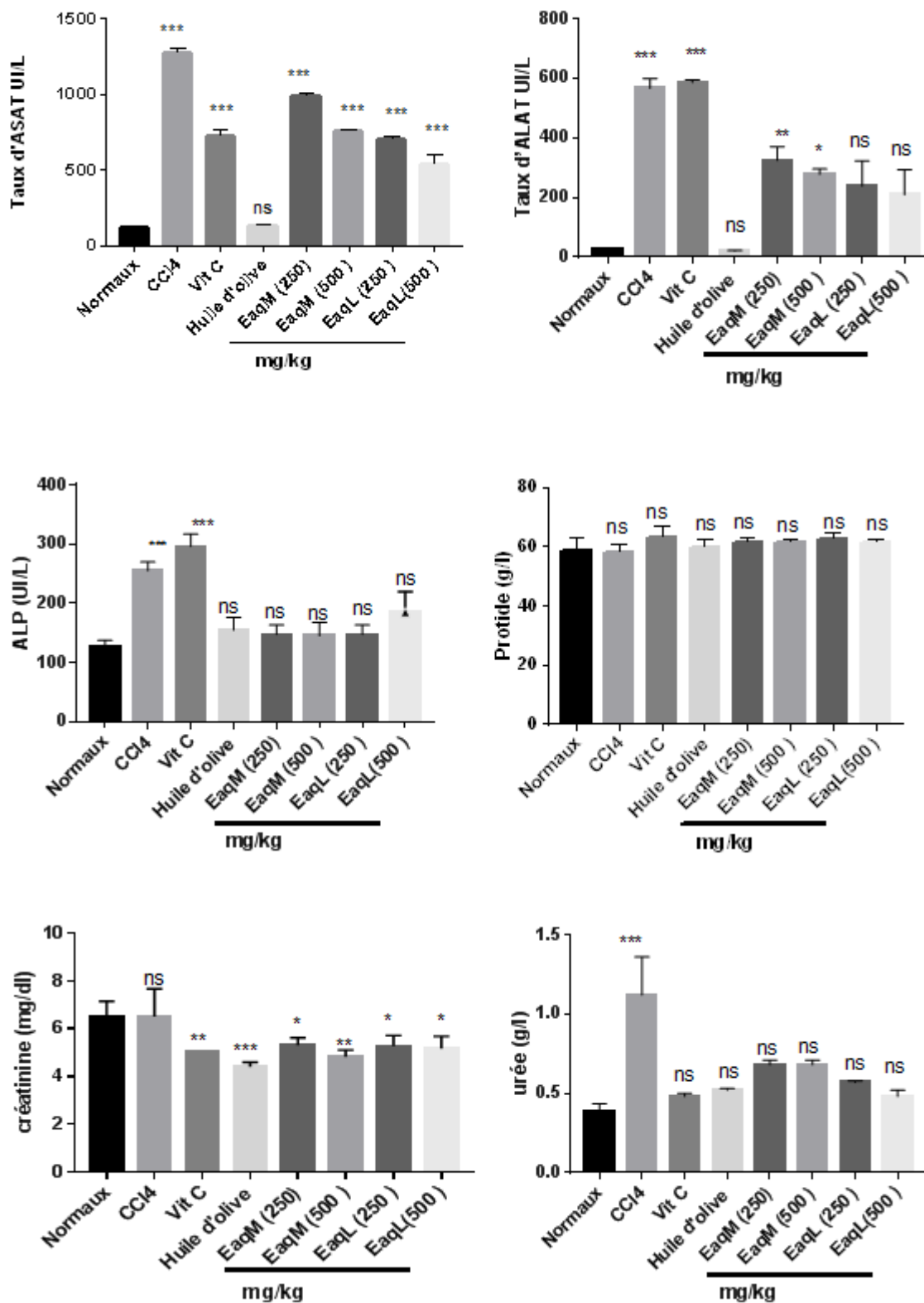
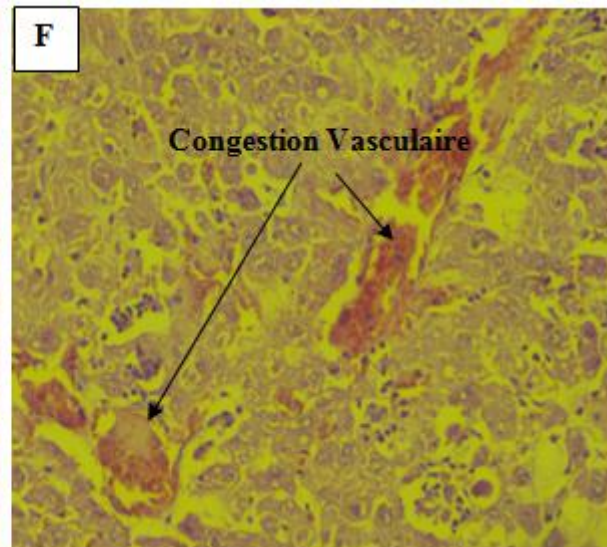
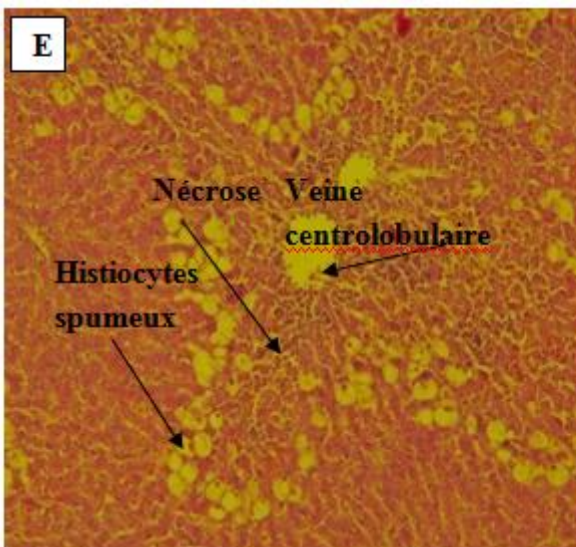
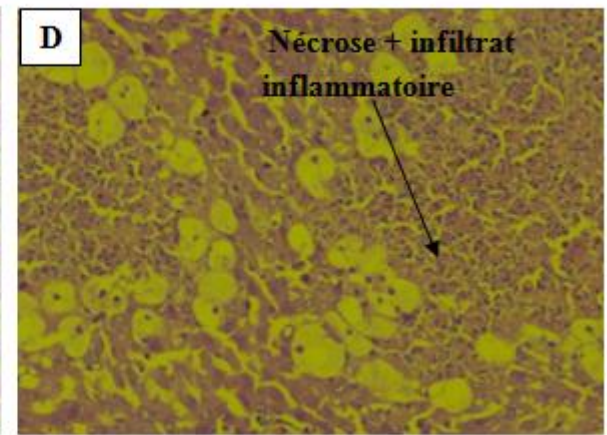
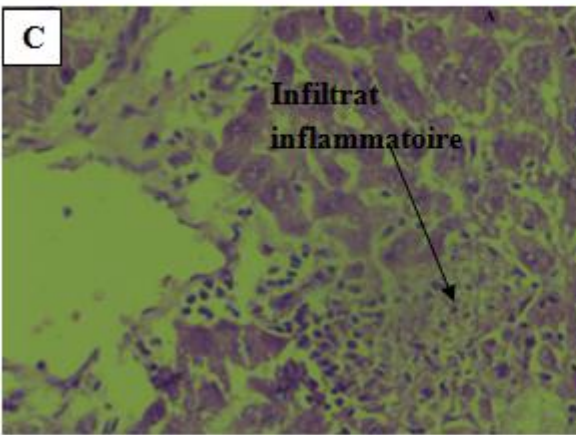
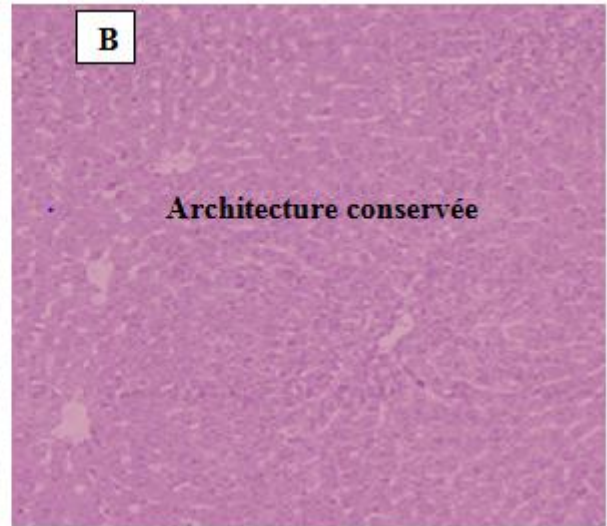
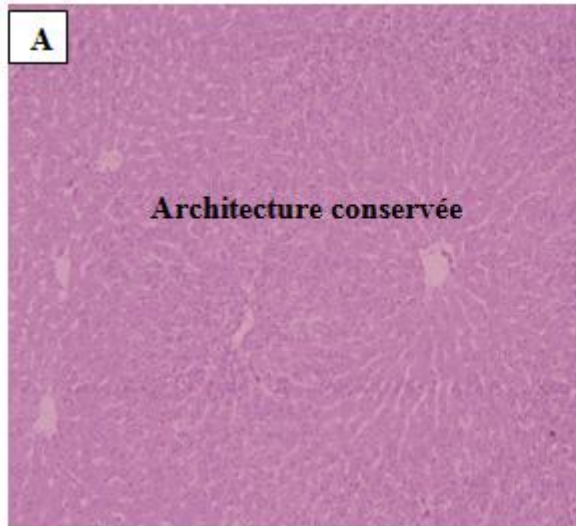


Figure 13: Effet des extraits aqueux de *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* sur quelques paramètres biochimiques des rats intoxiqués par le CCl₄. **ASAT**: Aspartate amino-transférase, **ALAT**: Alanine amino-transférase, **PAL**: phosphatase alcaline, **ns**: non significatif, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p ≤ 0,001. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=6).



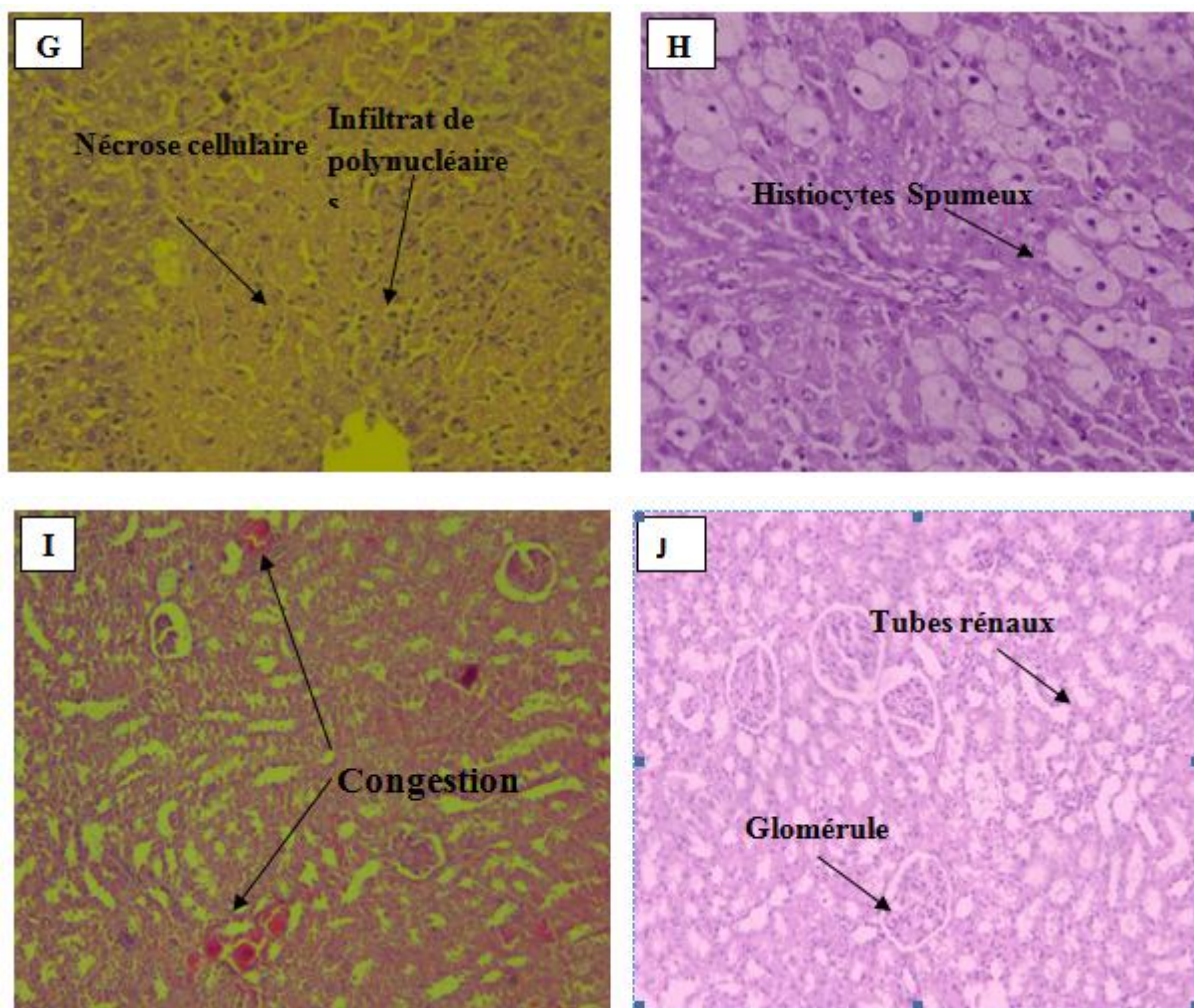


Figure 14: Coupes histologiques du foie et du rein des rats traités par les extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule*, du groupe normaux, huile d'olive, vitamine C. (Dose 1 = 250 mg/kg, Dose 2= 500 mg/kg). **A:** foie des rats non traités, **B:** foie des rats traités par l'huile d'olive (3ml/kg), **C:** foie des rats intoxiqué par le CCl_4 (3 ml/kg), **D:** parenchyme hépatique des rats traités par l'EAqM D₁, **E:** parenchyme hépatique des rats traités par l'EAqM D₂, **F:** parenchyme hépatique des rats traités par l'EAqL D₁, **G:** parenchyme hépatique des rats traités par l'EAqLD₂, **H:** parenchyme hépatique des rats traités par la vitamine C (200 mg/kg). **I:** tissu rénale des rats intoxiqué par le CCl_4 , **J:** tissu rénale des rats non traités.

Les pathologies hépatiques constituent un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Il est important que des travaux soient réalisés afin d'instaurer une base scientifique à l'utilisation des remèdes traditionnels par les populations pour le soin des troubles hépatobiliaires. Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est utilisé pour induire l'hépatotoxicité expérimentale car il est le plus communément utilisé d'une part et d'autre part, il induit une pathologie similaire à celle rencontrée en clinique: lésions de stéatose, nécrose hépatocytaire et même cirrhose (Ouattara *et al.*; 2003).

Dans notre étude on a constaté que chez le groupe intoxiqué par le CCl_4 , la dose de 3ml/kg induit une hépatotoxicité caractérisée par une élévation hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité sérique de l'ALAT, l'ASAT et PAL par rapport au groupe normaux. Cette élévation pourrait être principalement due à la fuite de ces enzymes du cytosol de foie dans le sang. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les lésions des cellules hépatiques induites par le CCl_4 ont été élucidés par plusieurs chercheurs: la bioactivation du CCl_4 par le cytochrome P450 des cellules hépatiques induites le stress oxydatif par la formation de radicaux libres réactifs comme le trichlorométhyl (CCl_3^\bullet), en présence d'oxygène ce dernier forme un radical trichlorométhylperoxyl ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$). Ces intermédiaires réactifs peuvent se lier d'une manière covalente à des macromolécules cellulaires entraînant une peroxydation lipidique qui conduit à une altération des membranes cellulaires causant une nécrose centrolobulaire suivi par fibrose hépatique et une fuite des enzymes cytosoliques. Ces radicaux réagissent même avec le glutathion réduit (GSH) entraînant la perte de son effet antioxydant. D'un autre côté, le CCl_4 active les cellules de Kupffer en augmentant la concentration intercellulaire de Ca^{++} , ce qui entraîne la libération de cytokines nocives et des radicaux libres qui contribuent à la mort des hépatocytes et induisent le stress oxydatif (Nabavi *et al.*, 2012; Chatterjee *et al.*, 2015; Refaey *et al* 2015).

L'étude histopathologique des foies du groupe intoxiqué par le CCl_4 révèle la présence de plusieurs aspects de toxicité: nécrose, des zones de stéatose, congestion et une infiltration des cellules inflammatoires. Ces aspects peuvent être dus à l'accumulation des radicaux libres comme conséquence de la peroxydation lipidique (Renugadevi *et al.*, 2009).

Dans notre étude, nous avons constaté que l'administration orale des extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* à des doses journalière de 250 et 500 mg/kg pendant 7 jours a permis de diminuer d'une manière significative ($P < 0.01$) l'activité plasmatique de l'ALT, de l'AST, de PAL, de l'urée et des lésions hépatotoxiques par rapport au témoin intoxiqué par le CCl_4 . Ces résultats suggèrent que ces extraits ont pu protéger

partiellement le foie des dommages qui peuvent être causés par le CCl₄ grâce à leurs effets antioxydants. Selon Kamisan *et al.*, (2013) l'effet hepatoprotecteur des extraits est liée à leur activité antioxydante puisque les radicaux libres et le processus d'oxydation jouent un rôle important dans l'évolution de l'hépatotoxicité.

6. Activité anti-inflammatoire

6.1. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est déterminé en utilisant le test d'inhibition de la dénaturation de la BSA; l'activité observée était importante (**figure 15**). En effet, l'extrait EAqM a développé une inhibition concentration-dépendante avec un pourcentage maximal de 82,334 % enregistré avec la dose 2,5 mg/ml. Concernant l'extrait EAqL le meilleur pourcentage d'inhibition a été estimé à 92,554 % pour la concentration de 1 mg/ml. Ces pourcentages sont proches à celui du Diclofenac utilisé comme molécule de référence (94.14 % à une concentration de 0,25 mg/ml).

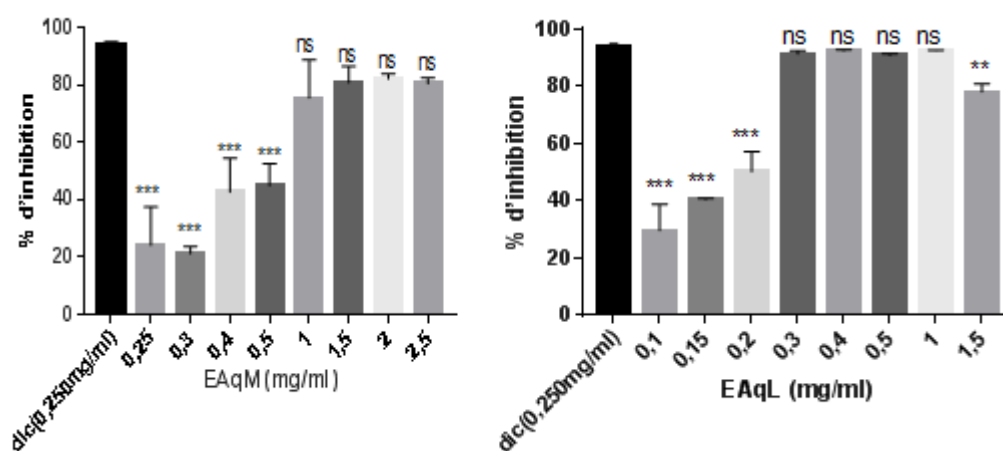


Figure 15: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD, *** : $p \leq 0.001$, ns: non significatif.

6.2. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris

L'effet anti- inflammatoire des extrait EAqM et EAqL est testé sur le modèle de l'œdème de l'oreille. L'application de 20 μ l de xylène a provoqué l'apparition d'un œdème chez toutes les souris traitées, l'épaisseur de cet œdème était réduite chez les souris prétraitées par les extraits et l'aspirine (contrôle positif). Les taux d'inhibition de l'œdème manifestés par ces extraits

n'étaient pas dose-dépendants; toutefois, les extraits EAqM et EAqL ont donné le meilleur pourcentage d'inhibition 69,306% pour la dose 300 mg/kg et 76,237% pour la dose 500 mg/kg respectivement. Ces pourcentages d'inhibitions sont inférieurs à celui obtenu avec l'aspirine (83,134%) utilisé comme anti-inflammatoire de référence (**tableau 9**).

Tableau 9: Effets inhibiteurs des extraits EAqM et EAqL et de l'aspirine sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris.

Traitement	Aspirine	EAqM			EAqL		
Dose (mg/kg)	100	100	300	500	100	300	500
Inhibition (%)	83,134	47,524	69,306	64,356	73,267	62,376	76,237

6.3. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la λ -carraginane chez les rats

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire des extraits EAqM et EAqL, un modèle expérimental d'inflammation aiguë de la patte de rat induit par la λ -carraginane est utilisé.

L'injection de la λ -carraginane provoque une augmentation progressive de l'épaisseur de l'œdème chez les rats traités avec l'eau physiologique durant les six heures de l'expérimentation. Les groupes administrés en préventif par les différentes doses des extraits ont réduit l'œdème induit par la λ -carraginane de façon significative à partir du 1h. L'inhibition était dose dépendante et les pourcentages maximaux sont obtenus six heures après l'injection de la λ -carraginane (**tableau 10**). Le meilleur effet est enregistré avec le diclofénac, Concernant les extraits des plantes, l'EAqM est plus efficace que l'EAqL.

Tableau 10: changement de l'épaisseur de la patte des rats (mm)

Traitement	Pourcentage d'inhibition (%)						
	mg/Kg	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Diclofénac	20	16,592	42,418	49,454	62,665	61,375	60,213
EAqM	100	6,005 ^{***}	6,235 ^{***}	21,078 ^{***}	20,174 ^{***}	23,269 ^{***}	26,923 ^{***}
	250	12,192 ^{ns}	10,588 ^{***}	29,857 ^{***}	21,208 ^{***}	25,480 ^{***}	35 ^{***}
	500	16,304 ^{ns}	17,843 ^{***}	29,696 ^{***}	25,786 ^{***}	28,141 ^{***}	35,961 ^{***}
EAqL	100	4,341 ^{***}	-	12,104 ^{***}	12,337 ^{***}	18,653 ^{***}	17,948 ^{***}
	250	3,853 ^{***}	4,379 ^{***}	7,230 ^{***}	6,963 ^{***}	10,576 ^{***}	21,442 ^{***}
	500	12,373 ^{ns}	8,725 ^{***}	22,788 ^{***}	23,847 ^{***}	28,685 ^{***}	31,538 ^{***}

6.4. Activité analgésique

L'activité analgésique des extraits EAqM et EAqL est évaluée par le test des torsions du corps et des relâchements des pattes arrières des souris induits par injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 0,06%. Les résultats représentés dans la **figure 16** montrent que le nombre des torsions est réduit chez les souris qui sont traitées par l'aspirine et les extraits EAqM et EAqL. Le meilleur effet inhibiteur (81,26%) a été enregistré pour l'aspirine (100 mg/Kg). L'extrait EAqM a exercé une inhibition dose-dépendante de la réaction analgésique avec effet de pic de 74,35% à la dose la plus élevée (500 mg/kg). Concernant, l'extrait EAqL, les doses 250 et 500 mg/kg ont montré des effets inhibiteurs presque identiques avec des pourcentages respectifs de 64,205% et 67,721 % (**tableau 11**).

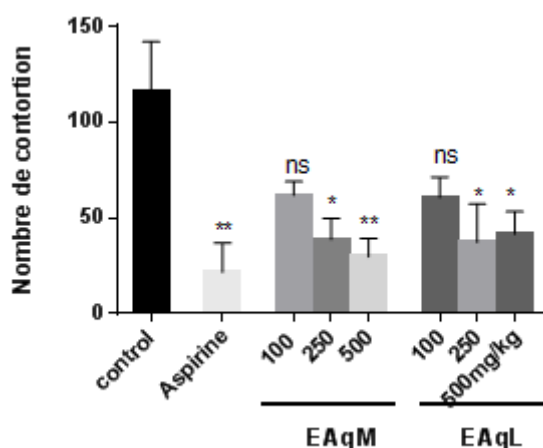


Figure 16: Evaluation de l'activité analgésique de l'aspirine et des extraits aqueux de *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* par la méthode de torsions abdominales induites par l'acide acétique chez les souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 5). ***: $p < 0.001$ vs témoin.

Tableau 11: Effets inhibiteurs des extraits EAqM et EAqL et l'aspirine sur les contorsions induites par l'acide acétique chez les souris.

Traitement	Aspirine	EAqM			EAqL		
Dose (mg/kg)	100	100	250	500	100	250	500
Inhibition (%)	81,266	46,538	66,424	74,350	47,547	67,721	64,205

6.5. Activité immunomodulatrice *in vitro*

L'effet immunomodulateur des extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* est évalué par le test de la prolifération et la production d'oxyde nitrique dans des cellules macrophages RAW 264.

6.5.1. Effet des extraits sur la prolifération des cellules macrophages RAW 264

Les résultats présentés dans la **figure 17** montrent que les quatre extraits n'ont présenté aucun effet significatif sur la prolifération des macrophages en présence du lipopolysaccharide (100 ng/mL) par rapport au témoin.

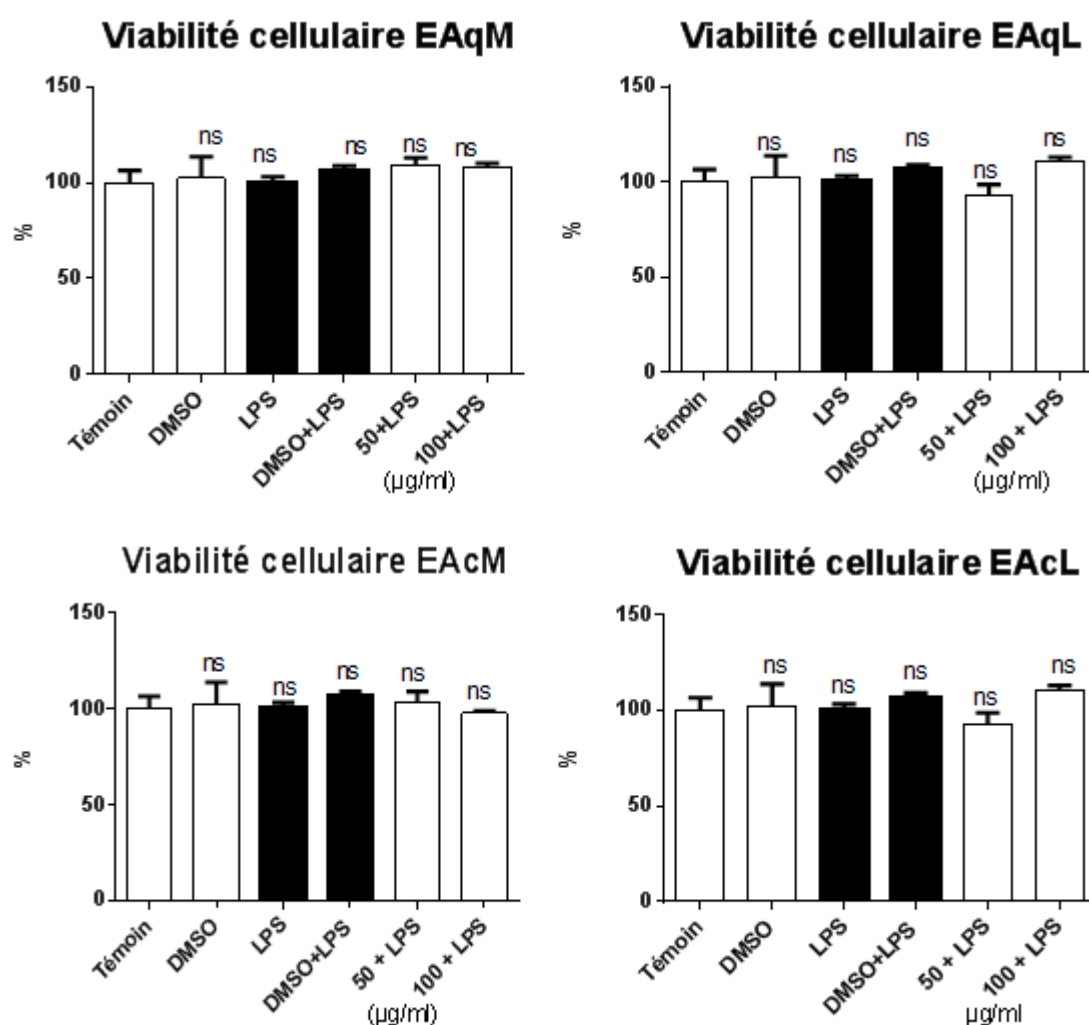


Figure 17: Effet des extraits aqueux et acétoniques des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* sur la prolifération des macrophages en présence de LPS (100 ng/ml). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ et comparés au témoin.

6.5.2. Effet des extraits sur la production d'oxyde nitrique par les macrophages RAW 264

Le dosage de l'oxyde nitrique est effectué afin de tester l'effet des extraits des deux plantes sur l'activation des macrophages. Les résultats montrent qu'en présence du LPS; les extraits EAqM et EAqL n'induisent aucune stimulation ou diminution significative de la production de l'oxyde nitrique par les macrophages par rapport aux cellules activées par le LPS seulement. Par contre les extraits EAcM et EAcL ont réduit significativement ($p=0,001$) la concentration du NO par rapport aux cellules activées par le LPS seulement (**figure 18**).

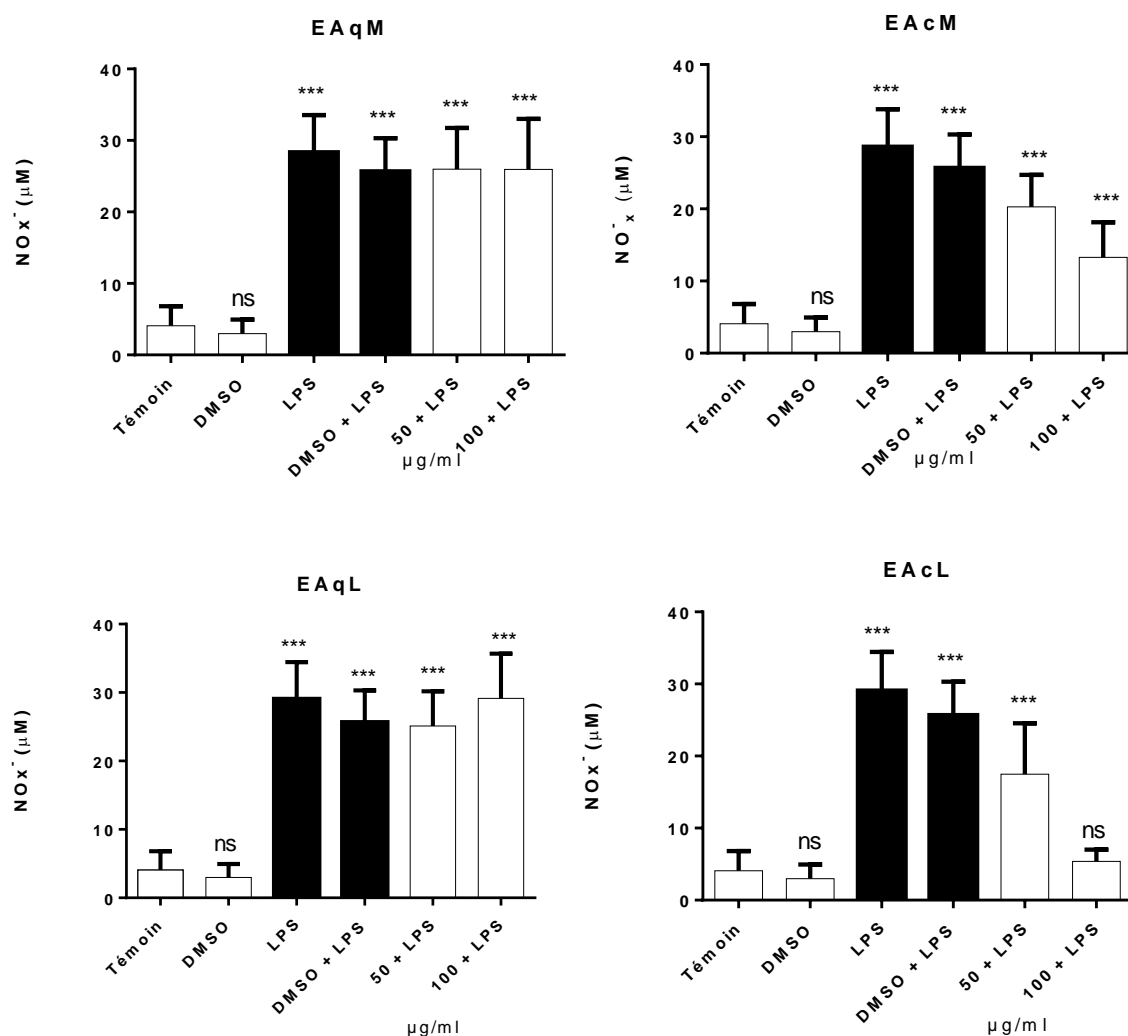


Figure 18: Effet des extraits des deux plantes sur la production d'oxyde nitrique dans les macrophages RAW 264

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme contre diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non

stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours (Rahmani *et al.*, 2016).

Dans le cadre des recherches de nouveaux anti-inflammatoires avec moins d'effets secondaires, cette étude s'est intéressée à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* *in vivo* et *in vitro* par plusieurs tests. La dénaturation des protéines est l'une des causes de l'inflammation. Dans certaines maladies rhumatismales, la production des auto-antigènes peut être due à la dénaturation des protéines (Kariawasam *et al.*, 2017). De plus, la dénaturation des protéines implique la perte de leur configuration, et par conséquent, la perte de leur fonction. Le mécanisme de cette dénaturation est probablement dû à l'altération des liaisons électrostatiques, hydrophobes, hydrogènes et les ponts disulfures. Les molécules qui peuvent protéger les protéines sont considérées comme des anti-inflammatoires (Vanlalhrui *et al.*, 2019).

L'adoption du test de dénaturation de la protéine BSA pour l'évaluation *in vitro* du potentiel anti-inflammatoire des extraits de plantes peut contourner les questions d'éthiques associées à l'utilisation d'animaux, en particulier aux étapes préliminaires de la valorisation des plantes. En effet, la réduction de la dénaturation de la BSA, est relative au potentiel anti-inflammatoire des plantes (Bailey-Shaw *et al.*, 2017). Les résultats de ce test montrent que les extraits aqueux et acétoniques des deux plantes ont pu protéger la BSA de la dénaturation provoquée par son incubation à une température de 37°C pendant 20 min puis à 65°C pendant 10 min.

Il est connu que l'œdème représente un signe essentiel des réactions inflammatoires. Pour mettre en évidence l'activité anti-œdémateuse de nos extraits, deux modèles sont adoptés: œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte provoqué par la λ -carragénane.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est utile pour tester l'activité anti-inflammatoire aiguë, le xylène provoque une irritation instantanée de l'oreille de la souris, ce qui provoque la libération de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine et la sérotonine qui favorisent la vasodilatation, l'infiltration des leucocytes et la fuite du plasma (Jin-Yao *et al.*, 2016, Vetriselvan *et al.*, 2013). Nos résultats ont montré que les extraits EAqM et EAqL réduisent significativement l'épaisseur de l'œdème de l'oreille. L'activité observée suggère que ces extraits possèdent des molécules actives qui peuvent inhiber la vasodilatation et l'infiltration des leucocytes. Selon Okoli *et al.* (2007), les substances lipophiles bioactives peuvent pénétrer à travers la barrière cutanée et réduisent l'inflammation.

La λ -carragénane est un mucopolysaccharide administré sous forme orale chez le rat et provoque une inflammation aiguë (Itou *et al.*, 2017). L'induction de l'œdème est biphasique, la phase

initiale (1h ou 1,5h) est induite en raison de l'action de médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine et la bradykinine sur la perméabilité vasculaire (Yousuf *et al.*, 2017). Tandis que, la deuxième phase est caractérisée par la libération de prostaglandines et d'oxyde nitrique produits par la cyclo-oxygénase (COX) et l'oxyde nitrique synthase (iNOS) respectivement avec un pic à 3h (Aliyu *et al.*, 2015). Le résultat du prétraitement des rats par l'EAqM et EAqL a démontré que l'effet anti-inflammatoire des extraits reste significatif durant les 6 h de l'expérience. Les extraits sont plus efficaces dans la phase tardive que la phase initiale. Cette activité peut être expliquée par la présence de composants ayant la capacité à inhiber la production ou le rôle des médiateurs chimiques responsables de l'apparition de l'œdème.

L'effet analgésique des extraits est évalué par le test de l'inhibition des crampes dues à l'acide acétique. Après injection d'acide acétique dans la cavité péritonéale, plusieurs médiateurs, dont les prostaglandines (PG), la bradykinine, l'histamine, la sérotonine et la substance P, sont libérés, ce qui stimule les nocicepteurs afférents primaires et contribue à l'induction de contractions abdominales (Hajhashemi *et al.*, 2017, Kouakou *et al.*, 2010). Les propriétés nociceptives de l'acide acétique pourraient également être dues à la libération de cytokines sécrétées par les macrophages et les mastocytes résidents en péritoine, telles que le TNF α , l'interleukine-1 β et l'interleukine-8 (Mogosan *et al.* 2017). Les résultats de notre étude révèlent que les extraits EAqM et EAqL ont un effet analgésique remarquable essentiellement avec les doses 250 et 500 mg /kg. Le mécanisme d'action analgésique des extraits pourrait être basé sur l'inhibition des cyclo-oxygénases, les lipo-oxygénases et la production des médiateurs inflammatoires (Chavan *et al.*, 2010). Ces résultats sont en accord avec l'étude faite par Boussouf *et al.*, (2017) qui ont montré que l'extrait hydrométhanolique de la plante *M. rotundifolia* possède un bon effet anti-inflammatoire, évalué par le test à la λ -carraginine, et analgésique éprouvé par le test des contractions induites par le xylène.

Il a été rapporté par El-Hela *et al.*, (2016) que l'extrait méthanolique de *L. amplexicaule* présente une activité anti-inflammatoire remarquable.

Le concept d'immunomodulation concerne l'activation non spécifique de la fonction et de l'efficacité des macrophages, granulocytes, complément, cellules tueuses naturelles et lymphocytes ainsi que la production de diverses molécules effectrices générées par les cellules activées. Il est prévu que la recherche de molécules ou de plantes ayant un effet immunomodulateurs constitue une alternative de la chimiothérapie conventionnelle (Sultana *et al.*, 2011). L'effet immunomodulateur des extraits aqueux et acétoniques des plantes *M.*

rotundifolia et *L. amplexicaule* est conduit sur des cellules macrophages activées par le LPS. L'activation des macrophages est induite par l'activation des cascades MAPK et NF-KB résultant de la reconnaissance des substances étrangères par les PRR. Toll like récepteur (TLR) est l'une des plus caractéristiques familles du PRR dans les macrophages. le lipopolysaccharide (LPS)- un composant principal de la membrane externe des bactéries gram négatif- se lie au TLR₄ de la surface cellulaire des macrophages et conduit à l'activation des macrophages via les cascades MAPK et NF-Kb (Ishida *et al.*, 2019). Les résultats obtenus montrent qu'en présence de LPS les quatre extraits n'ont aucun effet sur la prolifération des macrophages. Concernant, l'effet sur la production des nitrites les extraits EAqM et EAqL n'ont présenté aucun effet. Par contre, les extraits EAcM et EAcL ont augmenté significativement leur concentration. Cette activité suggère que ces extraits contiennent une ou plusieurs substances actives.

A la lumière des résultats obtenus de l'ensemble de ces tests, on peut déduire que les extraits EAqM et EAqL possèdent une bonne activité anti-inflammatoire. La richesse de nos extraits en composés phénoliques et leurs bon effet scavenger et antioxydant peut expliquer leur activité anti-inflammatoire.

Selon Taverniti *et al.*, (2016) la capacité anti-inflammatoire des polyphénols est partiellement attribuée à une action directe sur le système immunitaire en interférant avec les voies immunologiques et la production des médiateurs inflammatoires. En fait, divers composés phénoliques (par exemple, kaempférol, quercétine, génistéine, lutéoline) sont connus par leur effet anti-inflammatoires. Par conséquent, il a été proposé que ces composés réduisent le risque du développement d'une inflammation chronique.

Pendant l'inflammation, l'activation des mastocytes, les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles se traduit par la production de plusieurs ROS comme le radical superoxyde et le radical hydroxyle... Ces radicaux peuvent également agir comme messagers secondaires, provoquant ainsi la production d'autres médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire. De plus, les ROS participent à l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandines et cytokines (Jin-Yao *et al.*, 2016).

Conclusion et perspectives

Dans la présente étude, deux plantes, *Mentha rotundifolia* et *Lamium amplexicaule*, ont été choisies afin d'explorer de nouvelles voies d'application dans les domaines pharmaceutique, alimentaire ou cosmétique. L'objectif principal était de déterminer la composition chimique, la toxicité, l'effet hépatoprotecteur et l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux et acétoniques de ces deux plantes

Dans une première étape, la composition chimique des quatre extraits est déterminée par LC-MS/MS, en montrant leur richesse en différents composés phénoliques. Ensuite, l'activité antioxydante *in vitro* a été étudiée. Les résultats montrent un effet antioxydant intéressant.

La toxicité des extraits évaluée *in vitro* et *in vivo*, n'a montré aucun signe de toxicité remarquable.

L'effet hépatoprotecteur des extraits aqueux est étudié *in vivo*, une atténuation de la toxicité induite par le CCl₄ est enregistrée chez les rats traités par les différentes doses des extraits par rapport aux rats intoxiqués par le CCl₄. Cette activité est traduite par l'amélioration des taux des indicateurs biochimiques et de la structure histologique du foie, elle serait probablement due aux activités anti-oxydantes des extraits.

Finalement, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée par plusieurs tests, les résultats montrent que les extraits aqueux des deux plantes possèdent une activité anti-œdémateuse et analgésique importante.

Les résultats de la présente étude supporte l'usage traditionnel des deux plantes dans la prise en charge de diverses pathologies hépatiques et inflammatoires.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, en élucidant les mécanismes d'action sur les systèmes pro-oxydant-antioxydants *in vivo*, le système immunitaire, les enzymes et les molécules impliquées dans le traitement des maladies hépatiques et enfin élargir le spectre d'activités.

Références bibliographiques

- **Abdulkhaleq L A, Assi M A, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap Y H, Hezmee M N M.** (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*. 11(9):627- 635.
- **Afsar U A.** (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Front. Biol.* 6(4): 274-281.
- **Aliyu M, Samaila S C.** (2015). Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of rheumatic tea formula (RTF) in rats and mice. *International Journal of Herbs and Pharmacological Research*. 4(2): 17-24.
- **Arika WM, Nyamai DW, Osano KO, Ngugi MP, Njagi ENM.** (2016). Biochemical Markers of *In Vivo* Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. 6: 2.
- **Ates B, Abraham L, Ercal N.** Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radical Res.*2008; 42(4): 372-7.
- **Azimishad, Fatemeh & Sheidai, Masoud, Talebi, Seyed.** (2018). Biosystematic study and population genetic analysis in *Lamium amplexicaule* L. (Lamioideae, Lamiaceae). *Genetika*. 50. 10.2298/GENSR1802533A.
- **Azwanida N N.** (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4(3): 3-6.
- **Bailey-Shaw Y A, Williams L A D, Green1 C E, Rodney S, Smith A M.** (2017). Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential of Selected Jamaican Plant Extracts using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 47(1): 145-153.
- **Bender O, Atalay A.** (2018). Evaluation of anti-proliferative and cytotoxic effects of chlorogenic acid on breast cancer cell lines by real-time, label-free and high-throughput screening. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 22 (2): 173-179.
- **Bhatt R, Mishra N, Bansal B K.** (2016). Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 2 (2): 28-34.
- **Boll M, Weber I W D, Becker E, Stampfl A.** (2001). Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*. 56: 649-659.
- **Bond W, Davies G, Turner R.** The biology and non-chemical control of Henbit Dead-nettle (*Lamium amplexicaule* L.). *The organic organization*. <http://www.gardenorganic.org.uk/organicweeds>.
- **Brada M, Bezzina M, Marlier M, Carlier A A, Lognay G.** (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11(1): 3-7.
- **Brazil J C, Nusrat A, Parkos C A.** (2019). Innate immune cell–epithelial crosstalk during wound repair. *The Journal of Clinical Investigation*.129(8):2983-2993.

- **Belhattab R, Larous L, Kalantzakis G, Bouskou D, Exarchou V.** (2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir.* 2: 63-69.
- **Beyhan O, Elmastas M, Gedikli F.** (2010). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Accasellowiana*, Myrtaceae). *J. Med. Plants Res.*;4(11): 1065-72.
- **Boussouf L, Boutennoune H, Kebieche M, Adjerouda N, Al-Qaoud K, Madani K.** (2017). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of phenolic compound from Algerian *Mentha rotundifolia* L. leaves on experimental animals. *South African Journal of Botany.* 113: 77–83.
- **Brahmi F, Hauchard D, Guendouze N, Madani K, Kiendrebeogo M, Kamagaju L, Stévigny C, Chibane M, Duez P.** (2015). Phenolic composition in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products.* 74: 722–730.cess
- **Punchard N A, Whelan C J, Adcock I.** (2004). Editorial The Journal of Inflammation . *The Journal of Inflammation.*, 1:1 doi:10.1186/1476-9255-1-1.
- **Carocho M, Ferreira I C F R.** (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology.* 51: 15–25.
- **Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Čustić M H, Satovic Z.** (2016). Medicinal plants of the family lamiaceae as functional foods – a review. *Czech J. Food Sci.*34, (5): 377–390.
- **Chatterjee S, Dey A, Dutta R, Dey S, Acharya.** (2011). Hepatoprotective effect of the ethanolic extract of *Calocybe indica* on mice with CCl₄ hepatic intoxication. *International Journal of PharmTech Research.* 3(4): 2162-2168.
- **Chavan B M J, Wakte P S, Shinde D B.** (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine.* 17: 149–151.
- **Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J et al.**(2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 9 (6): 7204-7218.
- **Grzeszczuk M, Jadczyk D.** (2009). Estimation of biological value of some species of mint (*Mentha* L.). *Herba botanica.* 55 (3):194-196.
- **Derwich E, Benziane Z, Taouil R, Senhaji O, Touzani M.** (2010). Comparative essential oil composition of leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a traditional herbal medicine in Morocco. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 4(1): 47-54.
- **Diezi J.** (1989). Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. in "pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Ed.Slatkine-Geneve, p 33-44.
- **Dröge W.** (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews.* 82(1): 47–95.
- **El Arch M, Satrani B, Farah A, Bennani L, Boriky D, Fechtal M, Blaghen M, Talbi M.** (2003). Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc. *Acta Botanica Gallica.* 50(3): 267-274.

- **El-Hela A A, Abdel-Hady N M, Dawoud G T M, Ghoneim M M.** (2016). HPTLC fingerprint profile of triterpenes of *Lamium amplexicaule* benth. and *Ajuga iva* L. (Lamiaceae) monitored with screening of their anti-inflammatory effect. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(6): 176-181.
- **Elion Itou R D G, Etou Ossibi A W, Epa C, Nsondé Ntandou G F, Bokia C B, Ouamba, J. M, Abena A A.** (2017). Anti-inflammatory and analgesic effects of leaves of *Chromolaena odorata* L. (King and Robinson). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 11 (17): 217-223.
- **Erum S, Naemullah M, Masood S.** (2012). Phenotypic variation among *Mentha* spp. *Pakistan J. Agric. Res.* 25(1):56-62.
- **Etame L G, Yinyang J, Okalla E C, Makondo B V, Ngaba G P, Mpondo M E, Dibong S D.** (2017). Etude de la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn. *Journal of Applied Biosciences*.120: 12077-12085.
- **Farzaei M H, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny F F, Marmouzi I, Coy-Barrera E, et al.** (2018). Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. *Nutrients*, 10 : 855.
- **Faure S.** (2009). Anti-inflammatoires stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*. 487 : 51-58.
- **Favier A.** (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 108-115.
- **Gardés-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D.** (2003). Espèces réactives de l'oxygène: comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actualité Chimique*: 91-96.
- **Gabay C.** (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* . 8: 2
doi:10.1186/ar1917.
- **Gowda S, Desai P B, Hull V V, Math A A K, Vernekar S N, Kulkarni S S.** (2009). A review on laboratory liver function tests. *Panafrikan medical journal*.
- **Gupta D.** (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *international journal of pharmaceutical sciences and research*.6(2).546-66.
- **Habtemariam S.** (2018). Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvanolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 458; 1-25
- **Hossan S, Rahman S, Bashar A, Jahan R, Al-Nahain A, Rahmatullah M.** Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014 ; 3(9) : 57-70.
- **Hajhashemi V, Fahmideh F, Ghanadian M.** (2018). Antinociceptive effect of methanolic extract and alkaloid fractions of *Berberis integerrima* root in animal models. *Avicenna Journal Phytomed*. 8(3): 227-236.
- **Ifeanyi O E.** (2018). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*. 4(2): 123-133.
- **Erhirhie E O, Ihekwereme C P, Iodigwe E E.** (2018). Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol*. 11(1): 5–12.
- **Ishida M, Takekuni C, Nishi K, Sugahara T.** (2019). Anti-inflammatory effect of aqueous extract from Kawachi-bankan (*Citrus maxima*) peel in vitro and in vivo. *Cytotechnology*. 71: 797–807.

- **Itou E, Ossibi E, Epa C, Ntandou N, Bokia C B, Ouamba J M, Abena A A.** (2017). Anti-inflammatory and analgesic effects of leaves of *Chromolaena odorata* L. (King and Robinson). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 11(17): 217-223 .
- **Jin-Yao S, Cui-Yu Y, Kai D, Hai-Sheng Y, Jian-Feng X.** (2016). Anti inflammatory, analgesic and antioxidant activities of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid. *Pharmaceutical Biology*. 54 (10): 2282-2287.
- **Jones C D, Woods K E, Setzer W N.** (2012). A chemical ecological investigation of the allelopathic potential of *Lamium amplexicaule* and *Lamium purpureum*. 2(4): 167-177.
- **Jung H, Im S, Song D, Bae J.** (2017). Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. *BMB Rep.*; 50 (6): 323-328.
- **Kamisan F H, Yahya F, Ismail N A, Din S S, Mamat S S, Zabidi Z.** (2013). Hepatoprotective activity of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaf in rats. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 6(1):52-55.
- **Kariawasam KWJC, Pathirana RN, Ratnasooriya WD, Handunnetti S, Abeysekera WPKM.** (2017). Phytochemical profile and in vitro anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Sri Lankan variety of *Psidium guajava* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6 (4): 22-26.
- **Khadraoui A, Khelifa A, Hamitouche H, Mehdaoui R.** (2013). Inhibitive effect by extract of *Mentha rotundifolia* leaves on the corrosion of steel in 1MHCl solution. *Res Chem Intermed*. DOI: 10.1007/s11164-012-1014-y.
- **Khan R A, Khan M R, Sahreen S, Bokhari J.** (2010). Prevention of CCl₄-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2469–2476.
- **Kouakou S L., Kouakou G S, Laba I D, Brou J K.** (2010). Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiacees), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *International journal of biological and chemical sciences*. 4(2): 456-463.
- **Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knezevic S.** (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm.* 54: 65-72.
- **Koster R, Anderson M, De Beer J.** (1959). Acetic acid for analgesic screening, *Federal Proceeding*, 8, 412–417.
- **Kothe H W.** (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed *terres*. pp: 201.
- **Krishna M.** (2017). Patterns of Necrosis in Liver Disease. *Clinical liver disease*, 10: (2).
- **Ladjel S, Gherraf N, Hamada D.** (2011). Antimicrobial effect of essential oils from the algerian medicinal plant *Mentha rotundifolia* l. *Journal of Applied Sciences Research*. 7(11): 1665-1667.**The**
- **Laggoune S, Boutaghane N, Kabouche A, Kabouche Z, Ait-Kaki Z, Ait-Kaki B.** (2008). Components and antimicrobial activity of *Lamium amplexicaule* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*. 44 (3).
- **Larrey D.** (2003). Stéato-hépatite non alcoolique histoire naturelle et diagnostique. *Gastroenterol clin biol*.27: 793-795.
- **Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Ramakrishna, Naidu VGM, Talla V, Vinod V, Navrinder K, Ravinder N.** (2013). Anti-Inflammatory Treatments for Chronic Diseases: A Review. *Inflammation & allergy drug targets*. 12: 349-361.

- **Lawrence T, Willoughby D, Gilroy D. (2002).** Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology*. 2: 787-795.
- **Le K, Chiu F, Ng K.** Identification quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food chem.* 2007; 105: 353-363.
- **Lee H, Lee G, Yoon Y, Chae H R. (2019).** *verniciiflua* and *E. ulmoides* Extract (ILF-RE) Protects against Chronic CCl₄-Induced Liver Damage by Enhancing Antioxidation. *Nutrients*, 11: 382: 1-17.
- **Li H B, Cheng KW, Wong C C, Fan K W, Chen F, Jiang Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* **102**: 771-776.
- **Liu T, Stern A, Roberts J L, Morrow J D. (1999).** Isoprostanes: Novel Prostaglandin-Like Products of the Free Radical-Catalyzed Peroxidation of Arachidonic Acid. *Journal Biomedical Science* .6:226-235.
- **Lobo V, Patil A, Phatak A and Chandra N. 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmaconosy review*. 4(8): 118-126.
- **Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Congueral S. (2002).** Essential oils of *Mentha plegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian archives of biology and technology* 45(4): 519-524.
- **Mandal A, Viswanathan C.** Natural killer cells: in health and disease. (2014). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006>.
- **Manga H M, Brkic D, Marie D E P, Quetin-Leclercq J. (2004).** *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 209–214.
- **Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K. et al.** The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* **8**, 13995 (2018).
- **Miraliakbari H, Shahidi F. (2008).** Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*. 111: 421-7.
- **Mogosan C, Vostinaru O, Oprean R, Heghes C, Filip L, Balica G, Moldovan R I. (2017).** A Comparative Analysis of the Chemical Composition, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Effects of the Essential Oils from Three Species of *Mentha* Cultivated in Romania. *Molecules*. 263 (22): 1-11.
- **Moharram H, Youssef M M. (2014).** Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 11: 31-42.
- **Nabavi S M, Nabavi S F, Eslami S, Moghaddam A H. (2012).** In vivo protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chemistry*. 132: 931–935.
- **Nadipelly J. (2017).** Molecular Mechanisms Involved in Inflammatory Cascade: A Review. *texila international journal of basic medical sciences*. 2: 1-12.
- **Okoli C O, Akah P A, Nwafor S V, Anisiobi A I, Ibegunam I N, Erojikwe O. (2007).** Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 219–225.
- **Orakpoghenor O, Avazi D O, Markus T P and Olaolu O S. (2019).** Lymphocytes: a brief review. *Scientific Journal of Immunology & Immunotherapy*. 3(1): 004-008.

- **Ouattara Y, Sakandé B, Simporé J, Kaboré I Z, Guissou I P, Sawadogo L.** (2003). Evaluation de l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux de plantes médicinales face à une hépatotoxicité létale induite chez la souris. *Annales de l'Université de Ouagadougou*. 01: 16-40.
- **Ozer J, Ratner M, Shawc M, Bailey W, Schomaker S.** The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 245 : 194-205.
- **Pandit A, Sachdeva T, Bafna P.** (2012). Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (05): 233-243.
- **Peres M F S, Ribeiro F V, Ruiz K G S, Nociti F H, Sallum E A, Casati M Z.** (2012). Steroidal and non-steroidal cyclooxygenase-2 inhibitor anti-inflammatory drugs as pre-emptive medication in patients undergoing periodontal surgery. *Braz Dent J* 23(6): 621-628.
- **Phaniendra A, Jestadi D B, Periyasamy L.** (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*. 30(1):11–26
- **Pino J A, Rosado A, Fuentes V.** (1999). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 11: 241-242.
- **Pipet A, Colas H, Wessel F, Magnan A.** (2012). Réactions d'hypersensibilité aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez l'enfant. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 25: 249-254.
- **Popovici C, Saykova I, Tylkowski B.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4: 25-39.
- **Povi L, Aboudoulatif D, Batomayena B, Serge M, Kwashie E, Kodjo A, Edmond C, Mensanvi G.** (2015). Cytotoxicity of plant extract on Neuro-2a, Caco-2 and Vero cell lines by using MTT assay and Neutral Red uptake test. *Annals of Pharma Research*. 3 (07): 129-131.
- **Que F, Mao L, Pan X.** (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res. Inter*. 39: 581-7.
- **Quezel P, Santa S.** (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifique: Paris (France), pp. 34, 132.
- **Rahmani S, Belboukhari N, Sekkoum K, Cheriti A.** (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (*Plumbaginacea*). *Algerian journal of arid environment*. 6(1): 80-86.
- **Rangel J C, Benavides J, Heredia B, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez D A.** (2003). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 5: 5990–5999.
- **Refaey M S, Mustafa M A H, Mohamed A M, Ali A A.** (2015). Hepatoprotective and antioxidant activity of *Odontonema cuspidatum* (Nees) Kuntze against CCl₄-Induced Hepatic Injury in Rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(2): 89-96.
- **Renugadevi J, Prabu S M.** (2009). Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*. 256: 128–134.
- **Riahi L, Chakroun H, Klay I, Masmoudi A S, Cherif A, Zoghalmi N.** (2018). Metabolomic fingerprint of *Mentha rotundifolia* L. Leaf tissues promotes this species as a potential candidate for

- sustainable production of biologically active molecules. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. DOI: 10.1515/jcim-2018-0048.
- **Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R et al.** (2015). Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 116: 398–413.
 - **Salehi, B, Armstrong L, Rescigno A, Yeskaliyeva B, Seitimova G, Beyatli A et al.** (2019). Lamium Plants-A Comprehensive Review on Health Benefits and Biological Activities. *Molecules*. 24: 1913. doi:10.3390/molecules24101913.
 - **Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B.** (2011). Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *La Revue de médecine interne*. 32: 292–301.
 - **Shimizu B S.** (1956). Studies of the essential oil of *Mentha rotundifolia* Part I. Isolation of Rotundifolone, a New Terpenic Ketone. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*. 20(2): 84-88.
 - **Sibulesky L.** Normal liver anatomy. (2013). *Clinical Liver Disease*. 2(S1).
 - **Sivakumar C H V, Meera I.** (2013). Antioxidant and Biological Activities of Three Morphotypes of *Murraya koenigii* L. from Uttarakhand. *Food Processing & Technology*. 4(7): 1-7.
 - **Stankov V S.** (2012). Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. *The Open Inflammation Journal*. 5:1-9.
 - **Stanojković T, Kolundžija B, Ćirić A, Soković M, Nikolić D, Kundaković T.** (2013). Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff (Lamiaceae). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 8(2):845–854.
 - **Sultana R, Khanam S, Devi K.** (2011). Immunomodulatory effect of methanol extract of *Solanum xanthocarpum* fruits. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2(2): 93-97.
 - **Suva M A.** (2014). A brief review on liver cirrhosis: epidemiology, etiology, pathophysiology, symptoms, diagnosis and its management. *Inventi Rapid. Molecular Pharmacology*. 2: 1-5.
 - **Sylvester J.** (2019). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Basic sciences*. 405: 1-5.
 - **Taverniti V, Fracassetti D, Del Bo C, Lanti C, Minuzzo M, Klimis-Zacas D, Riso P, Guglielmetti S.** (2014). Immunomodulatory Effect of a Wild Blueberry Anthocyanin-Rich Extract in Human Caco-2 Intestinal Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 8346–8351.
 - **Thapa B R, Walia A.** Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*. 74: 663-671.
 - **Thompson M, Jaiswal Y, Wang I, Williams L.** (2017). Hepatotoxicity: Treatment, causes and applications of medicinal plants as therapeutic agents. *The Journal of Phytopharmacology*. 6(3): 186-193.
 - **Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H.** (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98-106.
 - **Tourandokht B, Mehrdad R, Kazemloo P.** 2013. Rosmarinic acid mitigates learning and memory disturbances in amyloid β (25–35)-induced model of Alzheimer’s disease in rat. *Journal of basic and clinical pathophysiology*. 2(1): 7-13.

- **Tsai M T, Chen C Y, Pan Y H, Wang S H, Mersmann H J, Ding S T.** (2015). Alleviation of carbon-tetrachloride-induced liver injury and fibrosis by betaine supplementation in chickens. *Hindawi*. DOI: 10.1155/2015/725379.
- **Valla D C.** (2013). Cholestase. *Hepato-gastro et Oncologie digestive*. 20: 618-627.
- **Van den Ende W, Peshev D, De Gara L.** (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*. 22(12): 689–697.
- **Vanlalhruai I, Malsawmtluangi C, Lalhlenmawia H.** (2019). Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of the spadix of *Colocasia affinis*. *science vision*. 19 (2): 30–34.
- **Vetriselvan S, Subasini U, Velmurugan C, Muthuramu T, Shankar J R.** (2013). Anti-inflammatory activity of *cucumis sativus* seed in carrageenan and xylene induced edema model using Albino Wistar rats. *International Journal of Biopharmaceutics*. 4(1): 34-37.
- **Vina J.** (2019). The free radical theory of frailty: Mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging. *Free Radical Biology and Medicine* 134: 690–694.
- **Umamoto K.** (1998). Two New Stereoisomers of 1, 2- Epoxymenthyl acetate from self- pollinated plant oils of *Mentha rotundifolia*. *Natural Product Letters*. 11:161-165.
- **Wang B J, Liu C T, Tseng C Y, Wu C P, Yu Z R.** (2004). Hepatoprotective and antioxidant effects of Bupleurum kaioi Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄-induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. 42: 609-617.
- **Watanabe S, Misharin A V, Budinger S G R.** (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 129(7):2619-2628.
- **Williams LAD, Connar AO, Latore L, Denis O, Ringer S , Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W.** (2008).The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and nonsteroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*. 57(4): 327-331.
- **Woreta T A, Alqahtani S A.** (2014). Evaluation of abnormal liver tests. *Med Clin N Am* 98: 1–16.
- **Xue N, Zhou Q, Ji M, Jin J, Lai F, Chen J, Zhang M, Jia J, Yang H, Zhang J, Li W, Jiang J, Chen X.** Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. *Scientific Reports*. 7:39011.
- **Yang M, Shen Q, Li L, Huang Y, Cheung H.** (2015). Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis* . *Food Chemistry*. 177: 304–312.
- **Yousuf P H, Noba N Y, Shohel M, Bhattacharjee R, Das B K.** (2013). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effect of *Mentha spicata* (Spearmint). *British Journal of Pharmaceutical Research*. 3(4): 854-864.
- **Yumrutas O, Saygideger S D.** (2010). Determination of *in vitro* antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish et Mey. and *Lamium amplexicaule* L. from South east of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* . 4(20): 2164-2172.

Références bibliographiques

- **Zhou F G, Chen Y, Liu S, Yao X, Wang Y.** (2013). In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.). *Journal of Ethnopharmacology*. 148: 664–670.
- **Ziltner J L, Leal S, Fournier P E.** (2010). Non steroidal anti-inflammatory drogue for athlete an update. *Annal physical rehabilitation medicine*. 53: 278-288.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التركيب الكيميائي ودراسة السمية، النشاط المضاد للأكسدة، التأثير الواقي من التسمم الكبدى و المقاومة للالتهاب للمستخلصين المائى و الأستونى للنبتين *Mentha rotundifolia* و *Lamium amplexicaule*. أظهرت دراسة التركيب الكيميائي النباتي أن محتوى المستخلص المائي لكنتا النبتتين من حيث عديدات الفينول والفلافونويدات أكثر غنى من مستخلص الأستون، كما كشف التحليل الكيميائي النباتي بواسطة LC-MS/MS أن المركبين الرئيسيين هما: حمض الروزمارنيك و حمض الكلوروجينيك بالنسبة لـ *M. rotundifolia* و *L. amplexicaule* على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في الزجاج باستخدام عدة اختبارات: التأثير الإزاحى لجذور ABTS، DPPH، OH⁻، استخلاص أيونات الحديد، اختبار بيتا كاروتين- حمض الثيولبيك، اختبار القدرة الإرجاعية. أظهرت النتائج امتلاك المستخلصات الأربعة لنشاط مضاد للأكسدة مهم. كما تم اختبار سمية المستخلصين المائين على الفئران. لم يظهر كلا المستخلصين أي آثار لسمية بعد 14 يوم من إعطاء جرعات 2 و 5 مغ/كغ. تم تأكيد الدراسة باختبار السمية الخلوية على خلايا Caco2. قيم النشاط الواقي للكبد باختبار السمية المحرصة برباعي كلوريد الكاربون، سببت المعالجة الوقائية للفئران بالمستخلصين EAQl و EAQm تحسنا ملحوظا للمؤشرات البيوكيميائية للبالازما بالإضافة إلى خفض ملحوظ لإصابات الكبد الناتجة عن سمية رباعي كلوريد الكاربون، تم كذلك تقييم النشاط المضاد للالتهاب حيويًا و في الزجاج بعدة اختبارات. فيما يخص اختبار تخريب البروتينات أظهرت المستخلصات قدرة عالية على حماية ألبمين المصل. كذلك فيما يخص اختبار وئمة الأذن المحرصة ب Xylène و اختبار انتفاخ الرجل المحفزة ب λ- كراجينين، انخفاض ملحوظ في حجم الورم لوحظ عند العينات المعالجة بالمستخلصين المائين، بينت دراسة النشاط المضاد للألم المحفز بالأستون عند الفئران قدرة عالية للمستخلصات. تم كذلك دراسة تأثير المستخلصات على النشاط المناعي باستعمال الخلايا البالعة حيث لم يتم تسجيل أي تأثير سواء على تكاثر البالعات أو على إنتاجها لحمض النتريك. في الختام، أظهرت نتائج هذه الدراسة غنى النبتتين *M. rotundifolia* و *L. amplexicaule* بالمركبات النشطة و التي يمكن استخدامها في تطوير أدوية جديدة لمعالجة أمراض الكبد والأمراض الالتهابية.

الكلمات المفتاحية: *Mentha rotundifolia*، *Lamium amplexicaule*، عديدات الفينول، LC-MS/MS، مضادات الأكسدة، تسمم الكبد، مضادات الالتهاب.

Résumé

La présente étude a pour objectifs l'évaluation de la composition phytochimique, la toxicité, les activités antioxydante, hépatoprotectrice et anti-inflammatoire des extraits aqueux et acétonique des plantes *Mentha rotundifolia* et *Lamium amplexicaule*. L'étude phytochimique a montré que les extraits aqueux des deux plantes sont plus riches en polyphénols et flavonoïdes que les extraits acétoniques. L'analyse phytochimique par LC-MS/MS a révélé la présence de l'acide rosmarinique et l'acide chlorogénique comme composés majoritaires chez *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par l'utilisation des tests de scavenging du DPPH, ABTS, l'inhibition du radical hydroxyle, chélation du fer ferreux, blanchissement du β-carotène/acide linoléique, test du pouvoir réducteur. Les résultats obtenus montrent que les quatre extraits sont dotés d'un effet antioxydant important. L'évaluation de la toxicité des extraits aqueux EAQm et EAQl a été conduite sur des souris. Les deux extraits n'ont manifesté aucun signe de toxicité après 14 jours de l'administration des doses de 2 et 5 g/Kg. L'étude *in vivo* est confirmée par le test de cytotoxicité mené sur des cellules Caco2. L'activité hépatoprotectrice est évaluée par le test d'hépatotoxicité induit par le CCl₄ chez le rat. L'administration des extraits EAQm et EAQl a montré une amélioration significative des marqueurs biochimiques plasmatiques ainsi qu'une diminution des signes d'affection hépatique résultant de l'intoxication au CCl₄. L'activité anti-inflammatoire est évaluée *in vitro* et *in vivo* par plusieurs tests. Concernant le test d'inhibition de la dénaturation des protéines, les extraits ont pu protéger significativement la BSA. De même pour le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte induit par la λ-carragénane, une réduction remarquable de l'épaisseur de l'œdème a été observée. L'activité analgésique conduite sur des souris, par le test de torsion induit par l'acide acétique, était appréciable. L'effet immunomodulateur des extraits utilisant la lignée cellulaire de macrophages RAW 264, n'a manifesté aucun effet sur la prolifération ou la production d'oxyde nitrique. En conclusion, les résultats révèlent que les plantes *M. rotundifolia* et *L. amplexicaule* pourraient être exploitées comme source potentielle de composés bioactifs pour développer de nouveaux médicaments naturels pour le traitement de certains troubles hépatiques et inflammatoires.

Mots-clés: *Mentha rotundifolia*, *Lamium amplexicaule*, polyphénols, LC-MS/MS, antioxydants, hépatotoxicité, anti-inflammatoires.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the phytochemical composition, toxicity, antioxidant, hepatoprotective and anti-inflammatory activities of aqueous and acetonic extracts from two plants *Mentha rotundifolia* and *Lamium amplexicaule*. The phytochemical study has shown that the aqueous extracts of the two plants are richer in polyphenols and flavonoids than the acetonic extracts. Phytochemical analysis by LC-MS/MS revealed the presence of rosmarinic acid and chlorogenic acid as major compounds in *M. rotundifolia* and *L. amplexicaule* respectively. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* by different tests, DPPH, ABTS, inhibition of hydroxyl radical, chelation of ferrous iron, β-carotene/linoleic acid-bleaching test and reducing power. The results obtained show that the four extracts have a significant antioxidant effect. The toxicity of aqueous extracts EAQm and EAQl was evaluated in mice. The two extracts did not show any sign of toxicity following 14 days after administration of 2 and 5 g / Kg doses. The *in vivo* study was confirmed by the cytotoxicity test carried out on Caco2 cells. The hepatoprotective activity was evaluated by CCl₄ induced hepatotoxicity test in rats. Administration of EAQm and EAQl extracts has shown a significant improvement in biochemical markers of plasma as well as a decrease in signs of liver alteration resulting from CCl₄. The anti-inflammatory activity was evaluated *in vitro* and *in vivo* by several tests. Concerning the inhibition of protein denaturation test, the extracts were able to significantly protect BSA. Similarly for the xylene-induced ear edema test and λ-carraginan-induced paw edema, a remarkable reduction in the thickness of edema was observed. The analgesic activity carried out on mice by the torsion test induced by acetic acid was appreciable. The immunomodulatory effect of extracts using the RAW 264 macrophage cell line did not show any effect on the proliferation or production of nitric oxide. In conclusion, the results reveal that *M. rotundifolia* and *L. amplexicaule* plants could be exploited as a potential source of bioactive compounds to develop new natural drugs for the treatment of certain liver and inflammatory disorders.

Keywords: *Mentha rotundifolia*, *Lamium amplexicaule*, polyphenols, LC-MS/MS, antioxidants, hepatotoxicity, anti-inflammatories.

