

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ferhat Abbas University, Setif 1
Faculty of Nature and Life
Sciences de



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2024

THÈSE

Présentée par

Imene ROUMILI

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{EME} CYCLE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : BIOCHIMIE

THÈME

**Propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et
immunomodulatrice des extraits de *Salix alba* et
*Equisetum arvense***

Soutenue publiquement le 30/01/ 2024

DEVANT LE JURY

Président	Pr Nouredine CHAREF	Prof	Univ. F A Sétif 1
Directeur	Pr Lekhmici ARRAR	Prof	Univ. F A Sétif 1
Examineurs	Dr Abdelouahab DIAFAT	MCA	Univ. MBI BBA
	Dr Nadia BENZIDANE	MCA	Univ. F A Sétif 1
	Dr Asma MOSBAH	Prof	Univ. F M Constantine

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce modeste travail:

À celui qui a été toujours le meilleur guide de ma vie et le plus près de mon cœur, mon Père Abdelkrim qui n'a jamais hésité de faire les plus grands sacrifices pour arriver à mon but.

À la prunelle de mes yeux, le plus grand amour dans mon cœur, qui n'a jamais cessé de m'encourager, ma mère.

À mon mari Oussama, pour sa patience, son soutien et ses nombreux encouragements ainsi qu'à ma belle mère et mon beau père.

À mes deux petits princes Ilyan et Iyas qui m'ont porté bonheur.

*À mes chers frères Bilel et Oussama, leurs femmes et mon neveu Yahya
À toute la famille.*

Imene

Remerciements

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

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

Je remercie vivement **Pr Nouredine CHAREF** pour son aide et ses conseils qui m'ont été d'une grande utilité tout au long de mon travail de recherche et d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie **Dr Abdelouahab DIAFAT**, Université Bordj Bouarréridj, **Dr Nadia BENZIDANE**, Université Sétif 1 et **Dr Asma MOSBAH**, Université de Constantine 1 pour avoir accepté de juger ma thèse.

Je tiens à remercier **Pr Abderrahmane BAGHIANI**, Professeur au département de Biologie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je voudrai s'exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire de Biochimie Appliquée de Sétif, en particulier, **Nacer Amraoui**, **Thoraya Guemmaz**, **Sara Chadi**, **Wafa Cheniti** et **Katia Abdelouhab** qui m'ont soutenue au cours de la réalisation de cette thèse.

Un grand merci à mes amis et collègues à l'université de Sétif **Intissar Serrai**, **Khadija Lattafi** et **Samira Ghedjati**, **Sarra Roumili**.

Liste des travaux

Les résultats de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications scientifiques :

Publications

I Roumili, N Mayouf, N Charef, L Arrar, A Baghiani (2022) HPLC analysis, acute toxicity and anti-inflammatory effects of *Salix alba* L. barks extracts on experimental animal models. *Indian Journal of Experimental Biology*. 60, 842-850 (Catégorie A; IF = 0,555)

I Roumili, W Cheniti, A Baghiani, N Charef, L Arrar (2022). HPLC Analysis, Acute toxicity and Assessment of Antioxidant and Anti-inflammatory Capacity of different Extracts of *Equisetum arvense*. *South Asian Journal of Experimental Biology* 12 (3), 318-326 (Catégorie B).

Communications:

Roumili I, Arrar L, Baghiani A, Charef N, 2021, Evaluation of polyphenols and flavonoids, and antioxidant proprieties of bark extract of *Salix alba*, 1er Séminaire International Perturbateurs Endocriniens Environnement & Reproduction (PEER), 07-08 Juillet, Blida, Algeria.

Roumili I, Arrar L, 2019, Antioxidant properties and in vivo antinflammatory activity of *Equisetum arvense*, methanolic extract, 1^{er} Séminaire National de l'Apport des Biotechnologies Sur La Protection De l'Environnement, 15-16 Décembre, M'Sila. Algeria.

Roumili I, Arrar L, 2020, Evaluation of polyphenols and flavonoids, and antioxidant proprieties of bark aqueous extract of *Salix alba*, Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM), 25-27 February, Tebessa, Algeria.

Roumili I, Baghiani A, Charef N, Arrar L, 2018, Contenu en polyphenols et activité antioxydante de l'extraits d'*Equisetum arvense*, Séminaire National de Biologie, Environnement et Santé (SNBES 2018), 08 - 09 Octobre, Skikda, Algeria.

Roumili I, Arrar L, Baghiani A, 2019, Evaluation of polyphenols and flavonoids, and antioxidant proprieties of bark methanolic extract of *salix alba*, Séminaire international environnement et toxicologie (SINENTOX 2019), 18 – 19, Constantine, Algeria.

Roumili I, Arrar L, Baghiani A, Charef N, Evaluation of polyphenols and flavonoids, and antioxidant proprieties of extract of *Equisetum arvense*, Séminaire International Avancées sur Les Antioxydants Naturels: Sources, Mécanismes D'action et Valorisation en Santé, 16 et 17 Octobre 2019 Université de Bejaia, Algérie.

ملخص

تستخدم نبتتا *Salix alba* و *Equisetum arvense* بكثرة في الطب الشعبي لخصائصهما العلاجية. لهذا الغرض، تم تصميم هذه الدراسة لتقييم سمية المستخلصات الميثانولية (ME) والمائية (QE) لهاتين النبتتين ودراسة نشاطاتها المضادات للأكسدة، وللتهاب والمنظمة للمناعة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المختلفة من خلال عدة اختبارات منها اختبار DPPH، واختبار القدرة الارجاعية، وإزاحة جذور الهيدروكسيل واختبار انحلال الكريات الحمراء. أظهرت النتائج أن المستخلصات المختبرة لها نشاط قوي مضاد للأكسدة الذي قد يعود إلى نوعية وكمية المركبات الفينولية والفلافونويد. لم تؤد السمية الحادة لمستخلصات *Equisetum arvense* والمستخلص المائي من *Salix alba* الى حدوث وفيات أو آثار جانبية وهذا يشير إلى أن الجرعة المميتة 50 (LD₅₀) تفوق 5000 مغ/كغ، بينما تسببت الجرعات البالغة 5000 مغ/كغ من المستخلص الميثانولي لـ *Salix alba* الى موت جميع الحيوانات. تمت دراسة التأثيرات المضادة للالتهابات والمنظمة للمناعة في الجسم الحي في نماذج حيوانية. وأظهر كل من اختباري التهاب المحرض بالكاراجينان، (Carrageenan-Induced Paw Edema : CIPE) والمحرص بالكزيلان (Xylen-Induced Ear Edema : XIEE) أن المستخلصات SAME و SAQE و EAME و EAQE أعطت بعد 6 ساعات تأثيراً كبيراً مضاداً للوذمة ($p < 0.001$) بجرعة 500 مغ/كغ في CIPE (88.62%، 87.56%، 77.48%، 67.31% على الترتيب). كما تسببت المستخلصات SAME و SAQE و EAME و EAQE (250 و 500 مغ/كغ) في تثبيط كبير لـ XIEE. في التهاب المفاصل الناجم عن الفورمالين في أرجل الجرذان، أظهرت المعالجة الفموية بـ 250 أو 500 مغ/كغ من المستخلصات تثبيطاً كبيراً لتورم المخالب. تم تقييم تأثير المستخلصات الميثانولية والمائية على جهاز المناعة من خلال المعالجة بـ 250 أو 500 مغ/كغ فأدى هذا الى تحفيز مناعي كبير لإنتاج الأجسام المضادة في الفئران الممنعة بواسطة كريات الدم الحمراء للخروف. في الختام، تُظهر المستخلصات المائية والميثانولية لـ *Salix alba* و *Equisetum arvense* خصائص مثيرة للاهتمام مضادة للالتهابات ومضادة للأكسدة ومضادة للتهاب المفاصل ومحفزة للمناعة. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذين النباتين لعلاج بعض الاضطرابات المرضية ويمكن أن توفر أساساً دوائياً للاستخدام العلاجي في حالات الالتهاب ونقص المناعة.

الكلمات المفتاحية: مضادات الالتهابات، مضادات الأكسدة، التنظيم المناعي، *Salix alba* ، *Equisetum arvense*

Résumé

Salix alba (SA) et *Equisetum arvense* (EA) sont deux plantes largement utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés thérapeutiques. A cet effet, notre thématique de recherche a pour objectifs d'établir le profil toxicologique, d'évaluer l'effet antioxydant et des effets anti-inflammatoire et immunomodulateur *in-vivo* des extraits méthanoliques (ME) et aqueux (QE) des deux plantes. L'activité antioxydante des différents extraits a été déterminée par plusieurs tests tels que le test du DPPH, pouvoir réducteur, OH[•] scavenging et le test d'activité anti-hémolytique. Les résultats ont montré que les extraits possèdent une forte activité antioxydante qui peut être essentiellement attribuée à la qualité et la quantité des composés phénoliques et flavonoïdes. L'évaluation toxicologique des différents extraits d'*Equisetum arvense* et l'extrait aqueux de *Salix alba* aux doses de 2000 et 5000 mg/kg a permis de démontrer que leur administration aiguë n'induit ni mortalité ni effets indésirables indiquant que la DL₅₀ est supérieure à 5000 mg/kg. Par contre, la dose 5000 mg/kg de l'extrait méthanolique d'écorce de *Salix alba* a provoqué une mortalité de tous les animaux. Les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs ont été étudiés *in vivo* sur des modèles animaux. Les deux tests d'inflammation induite, par le Carraghénane (Carrageenan-Induced Paw Edema : CIPE) et par le xylène (Xylen-Induced Ear Edema : XIEE) ont montré que les extraits SAME, SAQE, EAME et EAQE ont produit un effet antioedématogène significatif ($p < 0,001$) avec la dose de 500 mg / kg pour le CIPE après 6 h (88,62%, 87,56%, 77,48%, 67,31%, respectivement). Les extraits SAME, SAQE, EAME et EAQE (250 et 500mg/kg) ont montré une inhibition significative pour le XIEE. Dans l'arthrite induite par la formaline chez les rats, le traitement par voie orale par 250 ou 500 mg/kg, a révélé une inhibition significative du gonflement des pattes. L'effet des extraits méthanoliques et aqueux sur le système immunitaire a été évalué par un traitement des souris immunisées par les globules rouges de mouton par les extraits à des doses de 250 ou 500 mg/kg. Ce traitement a conduit à une stimulation immunitaire significative de la production d'anticorps.

En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques d'*Equisetum arvense* et de *Salix alba* possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antiarthritiques et immunostimulatrices intéressantes. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certaines maladies et pourrait constituer une base pharmacologique pour son utilisation thérapeutique dans les cas d'inflammation et d'immunodéficiences.

Mots clés : Anti-inflammatoires, Antioxydants, Immunomodulation, *Salix alba*, *Equisetum arvense*.

Abstract

Salix alba (SA) and *Equisetum arvense* (EA) are two plants widely used in folk medicine for their therapeutic properties. Our research theme aims to establish the toxicological profile, to evaluate the antioxidant potential, and the anti-inflammatory and immunomodulatory effects *in vivo* of the methanolic (ME) and aqueous (QE) extracts of the two plants. The antioxidant activity of the different extracts was determined by several tests such as the DPPH test, reducing power, OH• scavenging and the anti-hemolytic activity test. The results showed that the extracts possess strong antioxidant activity, which can be mainly attributed to the quality and quantity of phenolic and flavonoid compounds. The toxicological evaluation of the various extracts of *Equisetum arvense* and the aqueous extract of *Salix alba* at doses of 2000 and 5000 mg/kg demonstrated that their acute administration induces neither mortality nor adverse effects indicating that the LD50 is higher than 5000 mg/kg. On the other hand, the 5000 mg/kg dose of the methanolic extract of *Salix alba* bark caused mortality of all animals. The anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been studied *in vivo* in animal models. The two induced inflammation tests, by Carrageenan (Carrageenan-Induced Paw Edema: CIPE) and by xylene (Xylen-Induced Ear Edema: XIEE) showed that the SAME, SAQE, EAME and EAQE extracts produced a significant anti-edematogenous effect ($p < 0.001$) with the 500 mg/kg dose for CIPE after 6 h (88.62%, 87.56%, 77.48%, 67.31%, respectively). SAME, SAQE, EAME and EAQE extracts (250 and 500 mg/kg) showed significant inhibition for XIEE. In formalin-induced arthritis in rats, oral treatment with 250 or 500 mg/kg showed significant inhibition of paw swelling. The effect of the methanolic and aqueous extracts on the immune system was evaluated by treating mice immunized with sheep red blood cells with the extracts at doses of 250 or 500 mg/kg. This treatment led to significant immune stimulation of antibody production. In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *Equisetum arvense* and *Salix alba* have interesting anti-inflammatory, antioxidant, antiarthritic and immunostimulatory properties. This study supports the traditional use of this plant to treat certain diseases and it could constitute a pharmacological basis for its therapeutic use in cases of inflammation and immunodeficiencies.

Keywords: Anti-inflammatories, Antioxidants, Immunomodulation, *Salix alba*, *Equisetum arvense*.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire.....	6
Tableau 2 : Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans les remèdes anti-inflammatoires dans la région de Sétif.	42
Tableau 3 : Modes de préparation traditionnelle des plantes <i>S. alba</i> et <i>E. arvense</i>	43
Tableau 4. Aspects, couleurs, rendements d'extraction et teneurs des extraits méthanolique et aqueux de <i>S. alba</i> et <i>E. arvenus</i> en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	45
Tableau 5. Analyse par HPLC des polyphénols totaux des extraits de <i>S. alba</i> et <i>E. arvenus</i> ...	46
Tableau 6. Effet de la prise unique des extraits (A) SAME, SAQE et (B) EAME et EAQE sur le poids corporel des souris mâles.	57
Tableau 7. Poids relatif des organes des souris traitées par les extraits (A) SAME, SAQE et (B) EAME et EAQE.	58
Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème plantaire chez les rats traités par les extraits SAME, SAQE, EAME, EAQE et du Diclofenac (20 mg).	65

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les étapes de la réaction inflammatoire aiguë	4
Figure 2. Mécanisme oxydatif et enzymatique du neutrophile durant la phagocytose.	7
Figure 3. Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens.	9
Figure 4. Inflammation de la membrane synoviale	16
Figure 5. Carte de la zone d'étude (région de Setif).	28
Figure 6. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.	31
Figure 7. Droite d'étalonnage de la Quercétine.	32
Figure 8. Principales étapes d'isolement des SRBC à partir du sang de mouton	40
Figure 9. Profils chromatographiques du standard (a), SAME (b) et SAQE(c) obtenus par HPLC.	48
Figure 10. Profils chromatographiques d'EAME (a) et EAQE(b) obtenus par HPLC.	50
Figure 11. Activité anti radicalaire des extraits aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) de <i>Salix alba</i> et <i>Equisetum arvense</i>	51
Figure12. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>Salix alba</i> et <i>Equisetum arvense</i>	53
Figure 13. La capacité des différents extraits aqueux et méthanolique de <i>Salix alba</i> et <i>Equisetum arvense</i> à piéger le radical hydroxyle.	54
Figure 14. L'inhibition de l'hémolyse par les extraits aqueux et méthanoliques de <i>Salix alba</i> et <i>Equisetum arvense</i>	55
Figure 15. Paramètres biochimiques des souris mâles traités avec des doses uniques de l'E.Met et E.Aq de <i>S. alba</i> (2000 et 5000 mg/kg).	60
Figure 16. Paramètres biochimiques du contrôle et des souris traitées avec <i>E. arvense</i> mesurés au cours de la toxicité aiguë.	61
Figure 17. Effet anti-inflammatoire des extraits aqueux et méthanolique de <i>S. alba</i> et <i>E. arvense</i> sur l'oedème auriculaire induit par le xylène chez la souris.	63
Figure 18. Evolution de l'inflammation (oedème plantaire) en fonction du temps pour les différents groupes.	67
Figure19. Effet anti-inflammatoire des extraits SAME (A), SAQE (B), EAME(C), EAQE (D) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la formaline.	68
Figure 20. Effet des extraits sur le titre des anticorps chez les souris.	70

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAPH** : (2, 2 - a z o - b i s (2-amidinopropane) dihydrochloride)
- AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AIS** : Anti-inflammatoires stéroïdiens
- ALT** : Alanine aminotransférase
- ASAT**: Aspartate transaminase
- BHT**: Hydroxytoluène butylé
- COX**: Cyclooxygenase
- DL₅₀** : Dose létale 50
- DPPH** : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- EAG** : Equivalent d'acide gallique
- E.Aq** : Extraits aqueux
- EI** : Effets indésirables
- E.Met** : Extraits méthanoliques
- EQ**: Equivalent quercétine
- HA**: Hémagglutination
- HPLC**: Chromatographie liquide à haute performance
- HT50**: Half-hemolysis time
- IA**: Arthrite inflammatoire
- IC₅₀**: Concentration inhibitrice à 50%
- IL**: Interleukine
- Nd**: Néant
- NFκB**: Nuclear factor-kappa B.
- NO** : Nitric Oxyde
- OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economiques
- PG** : Prostaglandine
- PNN** : Les polynucléaires neutrophiles
- ROS**: Reactive oxygen species
- SD**: Standard deviation
- SEM** : Erreur standard de la moyenne
- SRBC**: Sheep Red Blood Cells
- TNFα** : Facteur de nécrose tumorale

Sommaire

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : Inflammation et Arthrites Inflammatoires	
1 Inflammation	3
1.1. Inflammation aiguë	3
1.2. Inflammation chronique	5
1.3. Médiateurs de l'inflammation	5
1.4. Rôle du neutrophile dans la réaction inflammatoire	6
1.5. Anti-inflammatoires	8
1.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	8
1.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	8
1.5.3. Effets indésirables des anti-inflammatoires de synthèse	9
1.5.4. Anti-inflammatoires d'origine végétale	12
2. Arthrites Inflammatoires	15
2.1. Symptômes des arthrites inflammatoires	15
2.2. Prise en charge thérapeutique	16
CHAPITRE II : Immunomodulation	
1. Définition	17
2. Immunomodulateurs	17
CHAPITRE III. Plantes étudiées	
1. <i>Salix alba</i>	19
1.1. Description et classification botanique	19
1.2. Composition chimique	20
1.3. Usage traditionnel	21
1.4. Pharmacologie	22
2. <i>Equisetum arvense</i>	22
2.1. Classification d' <i>Equisetum arvense</i>	23
2.2. Composition phytochimique	25
2.3. Usage traditionnel	25

2.4. Pharmacologie	25
--------------------	----

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	27
1.1. Matériel végétal	27
1.2. Animaux	28
1.3. Sang de mouton	29
2. Méthodes	29
2.1. Description et Choix des localités de l'enquête	29
2.2. Préparation des extraits	30
2.2.1. Extraits méthanoliques	30
2.2.2. Extraits aqueux	30
2.3. Analyses phytochimiques	30
2.3.1. Dosage des polyphénols totaux	30
2.3.2. Dosage des flavonoïdes	31
2.3.3. Analyse par HPLC	32
2.4. Etude de la Toxicité aigüe	33
2.4.1. Observations	33
2.4.2. Préparation du plasma et analyse biochimique	34
2.4.3. Poids des organes	34
2.5. Evaluation des activités antioxydantes	34
2.5.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH	34
2.5.2. Test du pouvoir réducteur	35
2.5.3. Test du piégeage du radical hydroxyle	35
2.5.4. Test d'activité anti-hémolytique	36
2.6. Activités anti-inflammatoires <i>in vivo</i>	37
2.6.1. Induction de l'œdème de l'oreille par le xylène	37
2.6.2. Induction de l'œdème de la patte par le carraghénane	37
2.6.3. Induction de l'inflammation par la formaline	38
2.7. Activités immunomodulatrices	39
2.7.1. Préparation des globules rouges de mouton (sheep red blood cells : SRBC)	39
2.7.2. Évaluation de la réponse humorale	40

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude ethnobotanique	41
--------------------------------	----

2. Analyse phytochimique	43
2.1. Teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes	43
2.2. Caractérisation phytochimique par HPLC	45
3. Activités antioxydantes des extraits	50
3.1. Piégeage du radical DPPH	51
3.2. Pouvoir réducteur	52
3.3. Piégeage du radical hydroxyle	53
3.4. Test d'activité anti-hémolytique	54
4. Evaluation de la toxicité aiguë	56
4.1. Progression du poids corporel	57
4.2. Poids relatif des organes	57
4.3. Paramètres biochimiques	59
5. Activité anti-inflammatoire <i>in-vivo</i> des extraits	62
5.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène	62
5.2. Effet sur l'œdème induit par le carraghénane	64
5.3 Effets des extraits sur l'arthrite induite par la formaline	68
6. Effets immunomodulateurs <i>in vivo</i>	69
Conclusion et perspectives	72
Références bibliographiques	75

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, l'incidence des maladies inflammatoires a fortement augmenté et devient un véritable fléau mondial. Dans des conditions normales, l'inflammation est un processus physiologique auto-limitatif. Cependant, dans certains cas pathologiques, l'inflammation peut persister et devenir incontrôlable donnant lieu à l'apparition de diverses maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis, l'athérosclérose et l'arthrite (Bardaa *et al.*, 2020). La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses de types anti-inflammatoires non stéroïdiens ou stéroïdiens (corticoïdes). Ce sont des médicaments largement utilisés, mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (Das *et al.*, 2010). Dans le but de minimiser ces effets secondaires, les laboratoires développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Les vertus thérapeutiques des plantes présentent un regain d'intérêt grâce à l'amélioration des techniques extractives et aux progrès des méthodes d'analyses structurales pour la découverte de nouveaux principes actifs. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle obtenus par héli synthèse ou par modification d'un produit naturel (Newman *et al.*, 2007). Les plantes médicinales constituent une source inépuisable des substances (métabolites secondaires) à activités biologiques et pharmacologiques très variées (Hirasa et Takemasa, 1998). Parmi ces métabolites, on distingue les terpenoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols. Et c'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail qui a pour objectif principal d'évaluer les propriétés antiinflammatoires, antioxydantes et immunomodulateur des extraits de deux plantes médicinales couramment utilisées en médecine traditionnelle.

L'écorce de *Salix alba* connu sous le nom 'Safsaf 'et la partie aérienne d'*Equisetum arvense* localement appelé 'Dhayl el Hisann' récoltés entre mars et juin 2017 de la région de Djebel Boutaleb, au sud-ouest de Sétif, ont fait l'objet de cette étude. Ces deux plantes sont largement utilisées dans le traitement des maladies antiinflammatoires, comme le montre l'enquête ethnopharmacologique menée au début de la présente étude.

La présente thèse a pour objectifs :

- La détermination des composés bioactifs par HPLC des extraits méthanoliques et aqueux de deux plantes médicinales choisies après une enquête ethnopharmacologique.
- L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits méthanoliques et aqueux.
- L'évaluation de la toxicité aiguë des extraits pour s'assurer de leurs utilisations pour le traitement de l'arthrite induite.
- L'exploration *in vivo* de l'effet des extraits sur le système immunitaire comme anti-arthritiques et immunomodulateurs.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. INFLAMMATION ET ARTHRITES INFLAMMATOIRES

1. Inflammation

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression par une infection pathogène ou par un traumatisme. Le but de l'inflammation est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (Ashley *et al.*, 2012). Parfois, l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, sa persistance dans le siège de l'inflammation ou par anomalies des régulations du processus inflammatoire.

1.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate de quelques jours à quelques semaines d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Elle se traduit par quatre symptômes cardinaux : oedème, rougeur, douleur et chaleur. Cependant, un échec dans la résolution provoque une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à la progression en inflammation chronique (Lee et Surh, 2012 ; Rathinam et Fitzgerald, 2016). L'inflammation aigue guérit spontanément ou avec un traitement. Elle évolue en 3 phases ; la phase vasculaire commence par une vasodilatation de courte durée causée par l'action du système sympathique et est très rapidement ressentie puisque douloureuse. Cette douleur s'explique par la libération d'histamine, de sérotonine, des prostaglandines et de kinine. L'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux (Bony., 2010). La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité et de l'élévation de la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire. La diapédèse s'ensuit, après l'adhérence des

cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins (Kumar et Jain, 2014 ; Lee et Surh, 2012).

La phase cellulaire correspond à l'arrivée au foyer inflammatoire des leucocytes. Elle débute avec les polynucléaires neutrophiles, qui sont remplacés progressivement par les cellules mononuclées, principalement les macrophages. La libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires et le pouvoir phagocytaire des macrophages permettent la destruction de l'agent pathogène (Diegelmann et Evans, 2004).

Enfin, la phase de résolution est la phase de l'élimination du pathogène, des neutrophiles morts et des produits de la dégradation tissulaire, donc du retour à l'homéostasie. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines (IL-4 et IL-10), des fibroblastes et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire douloureuses (Diallo, 2020).

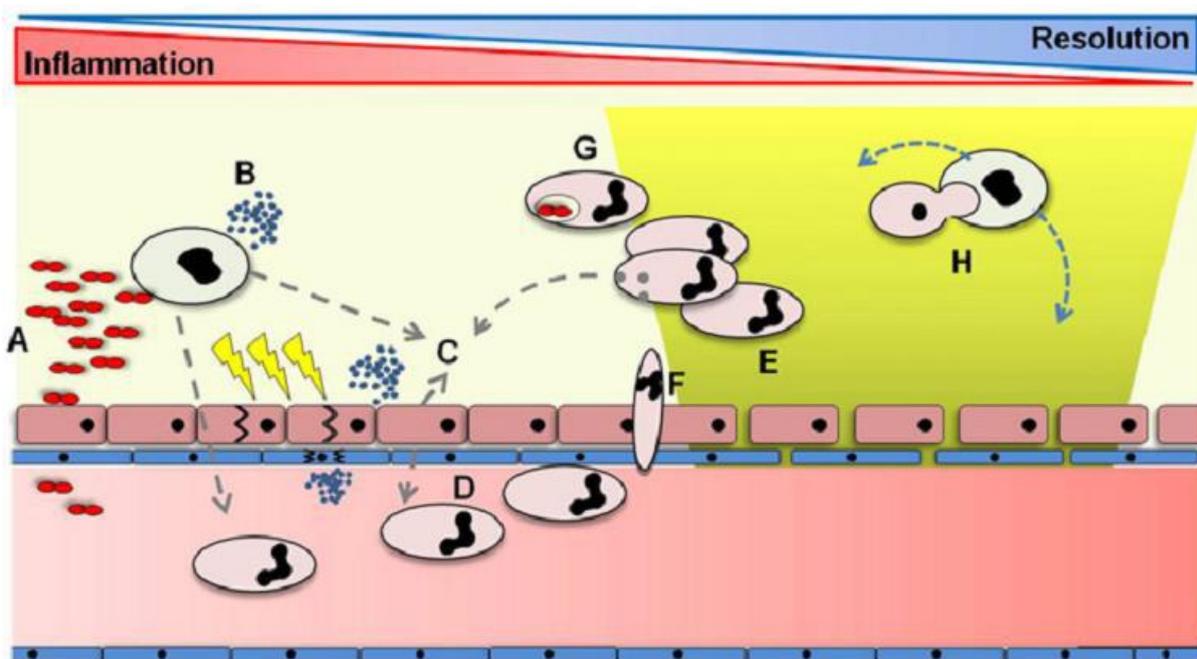


Figure 1. Les étapes de la réaction inflammatoire aiguë. Le processus inflammatoire aiguë est déclenché par l'interaction d'organismes pathogènes (A), ou les produits tissulaires (B), avec des récepteurs de reconnaissance présents sur les cellules inflammatoires résidentes dans les tissus affectés et les cellules épithéliales environnantes. Cela conduit à la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires (C) conduisant à l'activation des cellules endothéliales (D), de la perméabilité vasculaire (E), l'adhésion des neutrophiles, l'activation et la transmigration (F) ainsi qu'à l'activation des plaquettes et des monocytes phagocytose (G) (Dorward *et al.*, 2012).

1.2. Inflammation chronique

La chronicité de l'inflammation se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (Rankin, 2004). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation.

1.3. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur les différentes cellules impliquées dans la réaction inflammatoire (Rankin, 2004). Le **tableau 1** résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs de l'inflammation.

Tableau 1. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (Rankin, 2004 ; Davoine et Lacy, 2014).

Médiateurs	Origines	Effets
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteurs d'activation plaquettaire (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales	Vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule l'agrégation des plaquettes, induit la production des ROS et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Prostaglandine	Essentiellement par les leucocytes	Vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.

Cytokines	Macrophages et les lymphocytes	Elles agissent sur des récepteurs membranaires, elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, ou le TNF α) ou encore anti-inflammatoires
------------------	--------------------------------	--

1.4. Role du neutrophile dans la réaction inflammatoire

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les cellules principales intervenant au premier stade de la réponse inflammatoire aiguë. Attirés par chimiotactisme, les neutrophiles activés sécrètent le contenu de leurs granules cytoplasmiques, aboutissant à la destruction des pathogènes. Les neutrophiles produisent également de grandes quantités de radicaux libres, toxiques pour les pathogènes (Nathan, 2006 ; Prame Kumar *et al*, 2018).

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) représentent 50% à 70% des leucocytes totaux et plus de 95% de la population granulocytaire. Elles sont les principales cellules de l'immunité qui migrent vers les sites inflammatoires, où elles ingèrent et détruisent les microorganismes infectieux (Defranco *et al.*, 2009). Les activités microbicides et cytotoxiques des PNN dépendent de différents mécanismes (**Figure 2**) qui sont d'ailleurs intriqués ; libération d'enzymes protéolytiques stockés dans des granules spécifiques et production rapide et massive de radicaux libres, un processus que l'on appelle l'explosion oxydative des PNN.

Les neutrophiles contiennent en effet quatre types de granules intracellulaires : les granules primaires ou azurophiles (élastase, myeloperoxydase), granules secondaires ou spécifiques, granules tertiaires ou gélatinases et vésicules sécrétaires ou granules riches en phosphatase alcaline. Ces granules peuvent fusionner au phagolysosome à l'intérieur de la cellule et contribuer à la phagocytose ou fusionner à la membrane plasmique et larguer leur contenu dans le milieu extracellulaire par exocytose. C'est la mobilisation contrôlée de ces granules qui permet aux neutrophiles de passer de l'état de cellule circulante passive à celui de cellule immunitaire (Borregaard, 1997 ; Hurtado-Nedelec *et al.*, 2014).

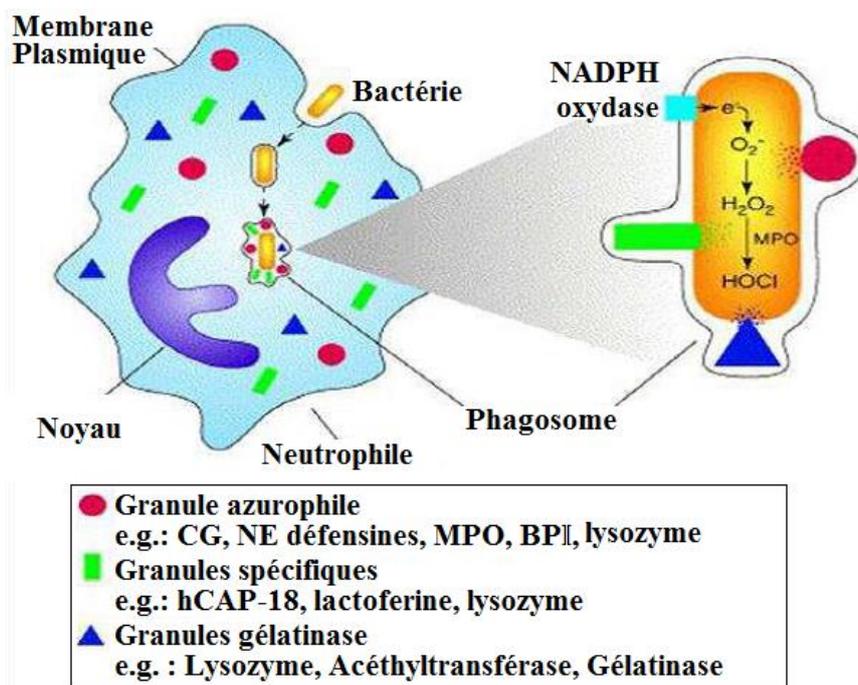


Figure 2. Mécanisme oxydatif et enzymatique du neutrophile durant la phagocytose (Mayer-Scholl et al., 2004).

1.5. Anti-inflammatoires

1.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont une des classes thérapeutiques à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la production des prostaglandines (Bidaut-Russell, 2001). Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), (**Figure 3**), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout générées dans des conditions inflammatoires (Shaikh *et al.*, 2016).

1.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les AIS ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol). Ils sont de puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immunosuppressives et antiallergiques. Leur effet anti-inflammatoire découle principalement de leur possibilité à réprimer l'excès d'expression des gènes pro-

inflammatoires codant pour les cytokines, les chimiokines, les molécules d'adhésion cellulaire, les enzymes inflammatoires et les récepteurs pour atténuer le processus inflammatoire et rétablissant ainsi l'homéostasie (Cruz-Topete et Cidlowski, 2015). Ces corticoïdes représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Payne et Adcock, 2001).

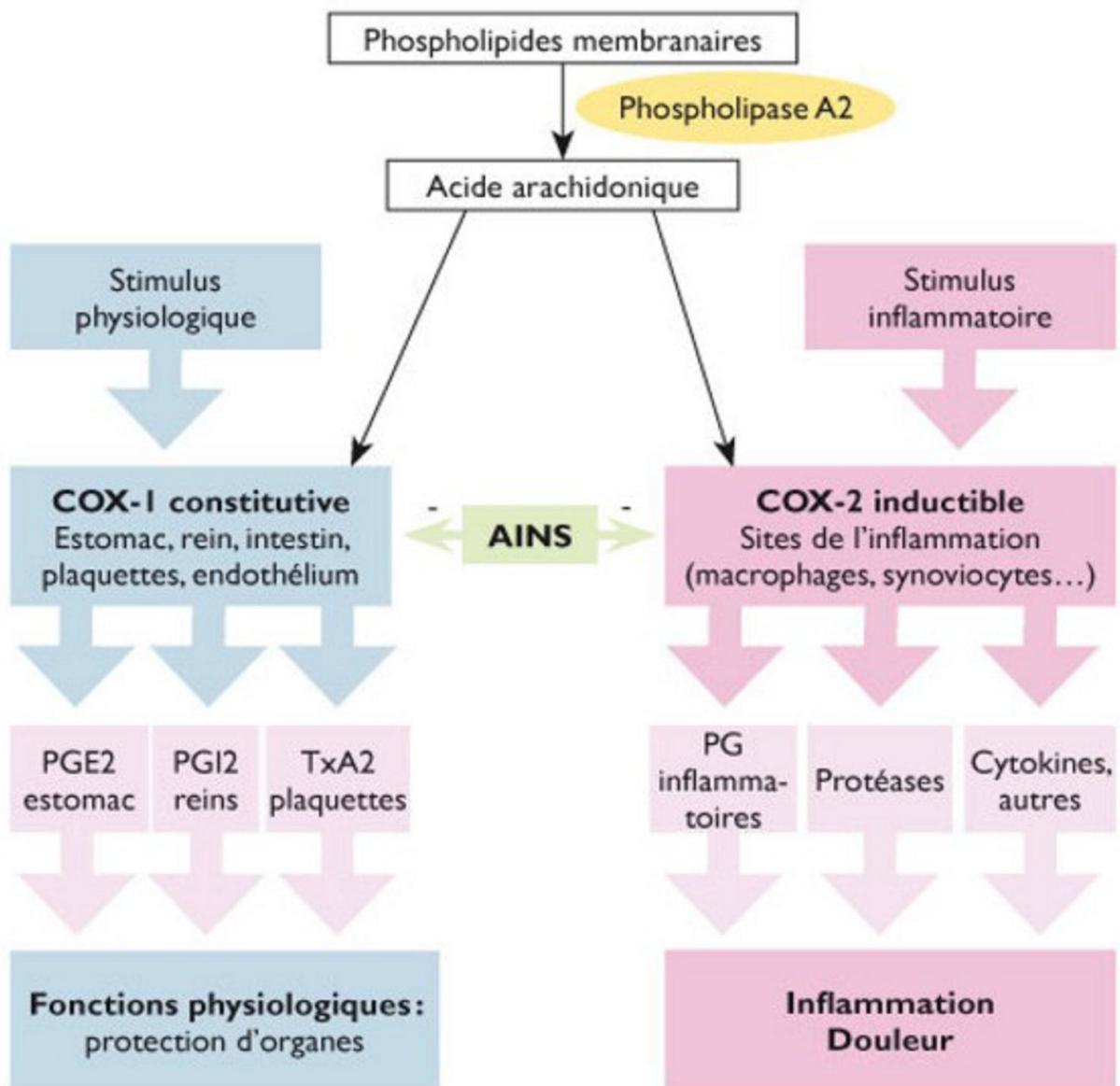


Figure 3. Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Guérin, 2020)

1.5.3. Effets indésirables des anti-inflammatoires de synthèse

1.5.3.1. Troubles digestifs

Les AINS, en agissant sur les COX, inhibent la formation des PG qui ont une activité protectrice sur la muqueuse gastro-intestinale. Les effets indésirables (EI) des AINS peuvent affecter l'ensemble du tube digestif, essentiellement estomac et duodénum, mais aussi œsophage, intestin grêle et colon. De plus, ils augmentent les poussées de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), (Russell, 2021).

1.5.3.2. Réactions cutané-muqueuses et allergiques

Elles peuvent apparaître sous forme de prurit, d'urticaire, d'éruptions diverses ; mais également de rhinite, de bronchospasme voire d'œdème de Quincke ou de choc anaphylactique. A noter que des réactions cutanées avec les AINS topiques sont régulièrement rapportées (essentiellement le kétoprofène), allant de l'eczéma ou la photosensibilisation jusqu'à la réaction bulleuse sévère (Neant, 2017).

1.5.3.3. Troubles rénaux

Les COX 1 interviennent dans la perfusion rénale et le débit de filtration glomérulaire (DFG), alors que les COX 2 jouent un rôle dans l'excrétion du sodium et de l'eau (Hörl, 2010). Leur blocage par les AINS va donc avoir des conséquences sur la fonction rénale. Il peut s'agir d'une rétention hydro-sodée, à l'origine d'œdèmes des membres inférieurs, d'une hausse de la pression artérielle ou d'une décompensation cardiaque (Brunton *et al.*, 2011 ; Hörl, 2010). Les AINS, en diminuant le DFG, exposent également au risque d'insuffisance rénale aiguë.

1.5.3.4. Complications obstétricales et fœtales

Les AINS augmentent le risque d'avortements spontanés durant le premier trimestre de grossesse (Moore *et al.*, 2015). Ils sont contre-indiqués à partir de 24 semaines d'aménorrhée,

également sur de courtes durées ou par voie locale, en raison d'une toxicité fœtale grave. Le blocage de synthèse de PG chez le fœtus expose à des fermetures prématurées du canal artériel, des hypertensions artérielles pulmonaires ou des insuffisances rénales parfois irréversibles voire mortelles (Kassaw et Wabe, 2012).

1.5.3.5. Troubles infectieux

En supprimant la réponse inflammatoire produite par une infection, les AINS peuvent en masquer les premiers signes, retarder le diagnostic et en assombrir le pronostic. Des cas d'aggravation d'infections dentaires, ORL, cutanées, de pneumopathies, de varicelles ou zozonas ont été décrits chez des patients sous AINS (Mikaeloff *et al.*, 2008).

1.5.3.6. Interactions médicamenteuses

Dans certaines situations, les EI des AINS peuvent apparaître en raison d'interactions médicamenteuses avec des traitements courants (Montastruc *et al.*, 2016). C'est le cas notamment des anticoagulants oraux, des antiagrégants plaquettaires, des corticoïdes ou des inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) qui majorent le risque hémorragique s'ils sont associés aux AINS. De même, la prise concomitante d'AINS avec diurétiques, IEC ou ARA II aggrave le risque d'insuffisance rénale aiguë chez les sujets à risque (âgés et/ou déshydratés) (Moore *et al.*, 2015).

1.5.3.7. Troubles cardiovasculaires

Les effets indésirables cardiovasculaires (CV) des AINS ont commencé d'être rapportés au début des années 2000, notamment avec les coxibs. Ces anti-COX 2 sélectifs, développés au départ pour réduire la toxicité digestive, se sont avérés associés à un risque augmenté d'événements vasculaires thrombotiques (Meek *et al.*, 2010)

1.5.3.8. Autres effets indésirables

D'autres effets indésirables plus rares sont rapportés à travers la littérature. Certains peuvent être soulignés comme les troubles hématologiques (cytopénies, effets antiagrégants plaquettaires notamment avec l'aspirine à faible dose), neurosensoriels (céphalées, vertiges, acouphènes...) ou encore hépatiques (Brunton *et al.*, 2012)

1.5.4. Anti-inflammatoires d'origine végétale

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

Certains constituants de *Zingiber officinale*, largement utilisé en médecine asiatique et arabe pour traiter les inflammations et les rhumatismes, inhibent la production du TNF- α (Tumor Necrosis Factor) en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005).

Harpagophytum procumbens, (griffe du diable) plante issue de la médecine traditionnelle africaine, réduit significativement l'œdème de la patte induit par le carraghénane (Catelan *et al.*, 2006). L'activité anti-inflammatoire de *H. procumbens* est peut-être due à sa capacité d'inhiber la synthèse des eicosanoïdes et la production du TNF- α par les monocytes humains ou à son pouvoir de réduire la production de la myelopéroxydase par les neutrophiles (Setty et Sigal, 2005).

Curcuma longa contient des polyphénols qui inhibe la production de la prostaglandine E2 et l'expression de la cyclooxygénase 2 (Madden *et al.*, 2009). Ce polyphénol inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la

production du NO et l'expression de l'enzyme NO Synthase (NOS) inductible (Mathy *et al.*, 2007).

Urtica dioica est une plante largement utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement d'eczéma et les douleurs arthritiques (Lin *et al.*, 2006).

Zygophyllum gaetulum est largement utilisée en médecine traditionnelle pour des indications thérapeutiques très variées, comme les affections gastro-intestinales, hépatiques, antidiabétiques (Bellakhdar, 1997) et principalement comme anti-inflammatoire (Ait El Cadi *et al.*, 2012).

Matricaria pubescens a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter l'estomac douloureux, le syndrome d'intestin irritable et comme une aide douce de sommeil. Elle est aussi utilisée pour traiter des maladies inflammatoires aiguës et chroniques. De ce fait, Bouden *et al.* (2017) ont démontré que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* présente une efficacité sur l'œdème aigu et chronique de la patte des souris induit par le carraghénane et des rats induit par le collagène type II.

Teucrium polium est également très utilisée pour le traitement des œdèmes. Son effet anti-inflammatoire revient à ces composés phénoliques tels que les flavonoïdes, l'acide phénolique et les tannins qui inhibent la synthèse de prostaglandines au niveau périphérique et la formation d'œdème (Krache *et al.*, 2018).

Capparis spinosa est une plante largement utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement des douleurs arthritiques. L'écorce des racines à un pouvoir analgésique. Il est employé aussi dans le traitement du mal de dents. Aichour *et al.* (2018) ont rapporté que le câprier possède un effet anti-inflammatoire, du fait que, la richesse de la plante en poly phénols, flavonoïde, les alcaloïdes, stéroïdes et saponines a inhibé considérablement l'œdème

de la pâte induit par le carraghénane. Benzidane *et al.* (2013) ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux possèdent une activité vasorelaxante.

Asphodelus microcarpus a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter des otites, mycoses cutanées, d'abcès, eczéma, ectoderme (maladies de la peau) et utilisé localement pour soulager les douleurs dentaires. Mayouf *et al.* (2019) ont montré que l'extrait méthanolique d'*Asphodelus microcarpus* présente une efficacité sur l'œdème aigue induit par le xylène et le carraghénane chez les rats.

2. Arthrites inflammatoires

L'arthrite est dérivée du terme grec "maladie des articulations". Elle est définie comme une inflammation articulaire aiguë ou chronique qui coexiste souvent avec des douleurs et des dommages structurels (Ma *et al.*, 2009). L'arthrite n'est pas une maladie unique, mais plutôt un terme générique regroupant environ 100 maladies articulaires douloureuses différentes. Bien qu'il s'agisse d'un groupe diversifié de maladies, en général l'arthrite se subdivise en deux classes : l'arthrose ou l'arthrite dégénérative qui est une arthrite non inflammatoire et l'arthrite inflammatoire (IA) qui regroupe des maladies affectant ~1% de la population. Les arthrites inflammatoires comprennent la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, l'arthrite psoriasique et d'autres types de spondylarthrite (Radner *et al.*, 2012). Lorsque vous souffrez d'arthrite inflammatoire, votre système immunitaire, qui combat normalement les infections, attaque vos articulations. L'IA se caractérise par une évolution progressive de l'inflammation synoviale conduisant à la destruction de l'articulation (Drossaers-Bakker 1999)

2.1. Symptômes des arthrites inflammatoires

L'arthrite inflammatoire est généralement associée aux symptômes classiques de l'inflammation : douleurs articulaires, gonflement, chaleur et sensibilité dans les articulations et raideur matinale (Ledingham *et al.*, 2017). La synoviale enflammée et hypertrophique, le pannus, est la caractéristique pathologique archétypale de l'IA (**Figure 4**), (Smolen *et al.*, 2018). Le nombre accru de cellules et de substances inflammatoires à l'intérieur de l'articulation peut l'irriter, entraînant à son tour l'usure du cartilage et le gonflement de la synovie (Pooja Poudel *et al.*, 2022)

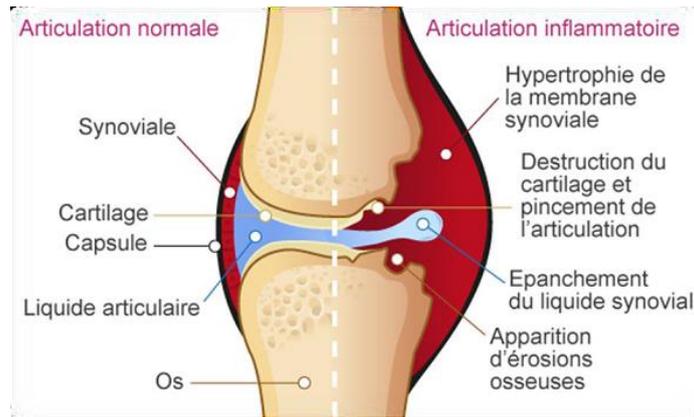


Figure 4. Inflammation de la membrane synoviale (Choy et Panayi, 2001).

2.2. Prise en charge thérapeutique

2.2.1. Analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont capables de réduire la douleur mais n'ont aucun effet sur les dommages articulaires. Ils agissent principalement par inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (COX-1 et 2), inhibant ainsi la formation des prostaglandines et des thromboxanes à partir de l'acide arachidonique (Kumar et Banik, 2013 ; Malekzadeh, 2017).

Le paracétamol est le principal analgésique utilisé en raison de ses faibles effets secondaires. Les AINS les plus récemment prescrits sont Celecoxib et Refecoxib, inhibiteurs sélectifs de l'enzyme COX-2, les rendant plus intéressants par rapport au diclofenac et l'indométacine les plus anciennement utilisés. Les principaux effets indésirables de ces molécules sont les troubles gastriques, l'élévation des enzymes hépatiques et le risque de troubles cardiovasculaires (Kumar et Banik, 2013 ; Malekzadeh, 2017).

2.2.3. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes capables de se lier aux récepteurs du cortisol exerçant ainsi leurs actions anti-inflammatoire et immunosuppressive. Ils sont prescrits pour une courte période de traitement en raison de leurs nombreux effets

secondaires, en particulier le gain de poids, l'hypertension artérielle, l'ostéoporose, l'ulcère gastro-intestinal et le risque d'infections (Kumar et Banik, 2013 ; Quan, 2013).

2.2.4. Anti-rhumatismaux modificateurs de la maladie

Les antirhumatismaux modificateurs de la maladie, « Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) », ciblent l'inflammation et réduisent la progression des dommages articulaires. Ils sont classés en deux catégories ; les DMARDs synthétiques (conventionnels et ciblés) et biologiques (Aletaha et Smolen, 2018).

CHAPITRE II : IMMUNOMODULATION

1. Définition

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la défense de l'organisme. Il a la capacité de reconnaître les agents étrangers, mettant en jeu deux types de mécanisme : l'immunité non spécifique (ou naturelle ou innée) et l'immunité spécifique (ou acquise ou adaptative) impliquant des facteurs cellulaires et humoraux qui régulent la réponse à l'antigène. La modulation du système immunitaire (immunosuppresseur ou immunostimulation) pour atténuer la maladie présente un aspect important de la recherche depuis de nombreuses années (Kumar *et al.*, 2017). En effet, l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire peut engendrer des conséquences néfastes pour l'hôte.

L'immunomodulant est une substance d'origine naturelle ou synthétique qui peut moduler les composantes du système immunitaire par une stimulation spécifique ou un effet suppresseur (Juyal et Singla, 2001). Les adjuvants naturels, les composés synthétiques et les molécules biologiques tels que des anticorps et les cytokines sont utilisées comme immunosuppresseur ou immunostimulants (Sagrawat et Khan, 2007).

2. Immunomodulateurs

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

leurs modes d'action : les immunosuppresseurs qui suppriment l'activité du système immunitaire et les immunostimulateurs qui stimulent son activité (Odette *et al.*, 2013). La modulation de la réponse immunitaire par stimulation ou la suppression permet la prévention des maladies et l'amélioration de la résistance naturelle du corps à divers infections (Wagner, 1984).

Les médicaments immunostimulants impliquent principalement la stimulation de cellules spécifiques et non spécifiques telles que les granulocytes, les macrophages et le complément, certains lymphocytes T et différentes cellules effectrices. (Jayathirtha et Mishra, 2004 ; Vinod Prabhu and Guruvayoorappan, 2012). De nombreux troubles pourraient être traités à l'aide de certains immunostimulants tels que les infections virales et cancer (Shahbazi et Bolhassani, 2016).

Les immunosuppresseurs pourraient être utilisés pour contrôler la réponse immunitaire pathologique, telles que, lerejet de greffe, les allergies immédiate et réactions immunitaires d'hypersensibilité de type retardé (DTH), (Pereira *et al.*, 1999 ; Juyal et Singla, 2001).

CHAPITRE III : PLANTES ETUDIÉES

L'écorce *Salix alba* et la partie aérienne d'*Equisetum arvense* ont été choisis selon trois critères : l'origine géographique commune (Djbel Boutaleb, Setif), l'utilisation en médecine traditionnelle et les recherches non approfondies sur ces plantes.

1. *Salix alba*

Le genre *Salix* a apporté de précieux avantages à la société humaine depuis l'aube de l'histoire (Markus-Michalczyk, 2020). Il compte plusieurs centaines d'espèces (environ 500), (Gligorić, 2019). Le Saule blanc, *Salix alba*, localement appelé 'Safsaf Labyadh', appartient à la famille des Salicaceae. On le trouve dans toutes les zones tempérées et humides en Europe mais aussi en Afrique du Nord (Maroc et Algérie) et en Asie centrale (Houston - Durrant, 2016).

1.1. Description et classification botanique

C'est un arbre qui mesure environ 25 mètres de haut, au tronc court et droit, à l'écorce grège et à la cime large formée de longues branches ascendantes et divergentes. Les rameaux sont flexibles, les feuilles caduques, alternes (5 à 15 cm de long, lancéolées, vertes sur la face supérieure et grisâtre en face inférieure. Cet arbre dioïque fleurit d'avril à mai en même temps que la feuillaison. La pollinisation est anémophile ou entomophile. Les fleurs jaunes ou verdâtres sont groupées en chatons cylindriques dressés. Le fruit est une capsule glabre s'ouvrant à maturité en deux valves et laissant échapper de nombreuses graines. De fins poils blancs dressés enveloppent toute la graine et facilitent la dissémination par le vent. L'arbre fructifie de mai à juin. Sa classification est la suivante :

Règne : Plantae
Sous-règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous-classe : Dilleniidae
Ordre : Salicales
Famille : Salicaceae
Genre : Salix
Espèce : *Salix alba*

1.2. Composition chimique

Depuis longtemps, l'écorce du saule blanc est étudiée à cause de la présence des composés actifs comme les catéchines, les flavonoïdes et des glycosides phénoliques (Kompantsev *et al.*, 1974). Dans l'écorce du saule blancs, le principal composé actif décrit dans la littérature est la salicine est le précurseur métabolique de l'acide salicylique, un β -glucoside alcoolique. L'étude phytochimique effectuée par Kammerer (2005) sur l'écorce de *Salix sppa* révélé la présence d'un grand nombre de composés chimiques comme :

- Les dérivés alcooliques salicylés ou Glucosides phénoliques (1,5-11%) en particulier les salicylates (salicine, salicortine, populine, fragiline, trémulacine).
- Les composés phénoliques (glucosides de phénols et d'acides phénols) : ce sont la triandrine, la vimaline, la picéine, la grandidentatine, dérivés aromatiques, saligénine (alcoolsalicylique), p-hdroxybenzoïque, caféique, férulique, Alcool salicylique (saligénine).
- Les flavonoïdes (1- 4%) tels que quercétol, de la lutéoline, de la naringénine, de l'ériodictyol.

Agnoletet *et al.* (2012) ont effectué une analyse complète qui a permis de détecter 16 composés dans l'extrait d'écorce du saule commercial et d'identifier l'ampélopsine, la taxifoline, le 7-O-méthyltaxifolin-3'-O-glucoside et la 7-O-méthyltaxifoline. La détection du nouveau composé, le 1-hydroxy-6-oxocyclohex-2-énecarboxylate d'éthyle, est également décrite. Zaiter *et al.* (2016) ont montré que l'écorce de *S. Alba* renferme aussi trois tanins condensés.

1.3. Usage traditionnel

Salix alba est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies en raison de ses puissantes propriétés antipyrétiques, analgésiques et anti-inflammatoires (Islam *et al.*, 2015). Les assyriens de la période sumérienne ont utilisé l'extrait de feuilles de saule pour des maladies rhumatismales inflammatoires (Jack, 1997). Les Babyloniens ont utilisé les extraits de saule en médecine traditionnelle pour traiter la fièvre, la douleur et l'inflammation courantes (Mahdi *et al.*, 2006). Les civilisations chinoise et grecque ont également exploité l'écorce de saule il y a plus de 2000 ans pour soulager la fièvre et la douleur (Riddle, 1999). Les égyptiens connaissaient les propriétés antalgiques de saule. (Lévesque et Lafont, 2000). Hippocrate, considéré traditionnellement comme le « père de la médecine », recommandait une tisane de feuilles de saule pour soulager les douleurs de l'enfantement (Lévesque et Lafont, 2000). Un autre médecin grec, Dioscorides, a également prescrit de l'écorce de saule pour réduire les symptômes de l'inflammation et l'utilisation d'écorce de saule s'est poursuivie en raison de ses propriétés analgésiques et anti-inflammatoires (Jassem G. Mahdi, 2010).

1.4. Pharmacologie

Les études portant sur l'extrait éthanoliques de l'écorce de *S. alba* ont prouvé son pouvoir antioxydant qui est accordé à la présence de composés phénoliques. (Ghassan *et al.*, 2013). En effet, les extraits méthanoliques de *S. alba* exercent une propriété analgésique et

anti inflammatoire (Rajendra *et al*, 2013 ; Khayyala *et al*, 2005) ont démontré l'effet bénéfique d'un extrait d'écorce de *Salix* à la fois sur un modèle d'inflammation aiguë et chronique chez le rat. L'inflammation aiguë est modélisée par la mise en place d'une poche d'air sous la peau pendant 6 jours, une arthrite induite par un adjuvant représente le modèle d'inflammation chronique.

Des travaux récents ont montré que l'extrait d'écorce de *Salix alba* possède l'activité antiprolifératifs et l'apoptose dans les cellules cancéreuses pulmonaires humaines (Hostanska *et al.*, 2007). Les extraits de cette plante ont exhibé une meilleure activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives que les bactéries Gram-négatives (Ghassan *et al.*, 2013). De plus, l'extrait aqueux de *Salix alba* a inhibé la libération des cytokines pro-inflammatoires (TNF α), la COX-2 et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B dans les monocytes pro-inflammatoires activés (Bonaterra *et al.*, 2010).

2. *Equisetum arvense*

Le genre *Equisetum* constitue 30 espèces (Huh et Han, 2015). *Equisetum arvense* est une plante herbacée vivace, qui appartient à la famille Equisetaceae, communément appelé prêles des champs en français, commun horsetail, field horsetail en anglais (Navdeep *et al.*, 2010) et localement il est appelé dhayl el hissan, kothban el-hokol.

E. arvens est de distribution circumpolaire, à travers l'Europe et l'Asie, jusqu'au sud de la Turquie, de l'Iran, de l'Himalaya et à travers la Chine (sauf la partie sud-est), la Corée et le Japon. On le trouve également partout au Canada et aux États-Unis, jusqu'au sud jusqu'en Géorgie, en Alabama, en Arkansas, au Texas, en Arizona, au Nouveau-Mexique et en Californie (Hultén and Fries, 1986).

Cette plante vivace présente deux types de tiges aériennes issues d'un système de tiges rhizomateuses souterraines : une tige fertile de 15 à 20 cm dépourvues de verticilles et portant

à son extrémité un épi, ressemblant à une pousse d'asperges une fois remise, il pousse au même endroit une tige stérile, d'un vert clair, un peu rudes et profondément sillonnées, à petite lacune centrale, qui peut atteindre parfois jusqu'à 60 cm de hauteur. Portant des branches aux noeuds, et de petites feuilles en forme d'écailles nommées microphylls, arrangées en verticilles, à 4 côtes longitudinales.

Ces herbacées vivaces, apparentées aux fougères, ne portent ni fleurs ni graines. Elles se reproduisent plutôt de façon sexuée par des spores qui se développent dans des strobiles, portés sur des tiges fertiles mais se reproduit surtout de façon végétative par ses rhizomes et ses tubercules (Knowlton, 2012).

2.1. Classification d'*Equisetum arvense*

Classification systématique d'*Equisetum arvense* selon (Navdeep *et al.*, 2010).

Régne : Plantae

Sous règne : Tracheophyta

Division : Equisetophyta

Classe : Equisetopsida

Subclassa : Equisetidae

Ordre : Equisetales

Famill : Equisetaceae

Genre : Equisetaceae

Espèce : *Equisetum arvense*

2.2. Composition chimique

L'étude phytochimique réalisé par (Oh *et al.*, 2004), sur des extraits de la partie aérienne de cette plante a révélé la présence de deux pétrosines phénoliques, onitine et onitine-9-O glucoside, ainsi que quatre flavonoïdes, apigénine, lutéoline, kaempférol-3-O-

glucoside et quercétine-3-O-glucoside. L'acide Di-*E*-caféoyl-mso-tartrique a été isolé de l'extrait méthanolique des Tiges stériles d'*Equisetum arvense* comme principal dérivé d'acide hydroxycinnamique (Veit *et al.*, 1991).

Trois nouveaux glycosides phénoliques ont été identifiés dans les pousses fertiles d'*Equisetum arvense* tels que, equisetumoside A (3-méthoxy-11, 12-dihydroxy-phénylhexane-9-one-4-O-beta-D-glucopyranoside), equisetumoside B (3-méthoxy-4, 11- dihydroxy-phénylhexane-9-one-12-O-bêta-D-glucopyranoside) et equisetumoside C (sel de potassium de l'acide cis-férulique 4-O-bêta-D-glucopyranoside), (Chang *et al.*, 2001).

Radulović *et al.* (2006) ont montré que l'*Equisetum arvense* contient 25 composés volatils en utilisant GC, GC / MS et 13C-RMN. Les principaux constituants des composés volatils étaient l'acétone (18,34%), l'acétone cis-géranyle (13,74%), le thymol (12,09%) et le trans-phytol (10,06%). *E. arvense* contient de la silice et d'autres éléments, notamment le calcium, le potassium, le soufre, le sodium, le magnésium, le chlore, et le phosphore (Sola-Rabada *et al.*, 2016).

L'analyse phytochimique préliminaire a montré que l'extrait éthanolique d'*Equisetum arvense* contient des composés phénoliques, tanins, glycosides, alcaloïdes, saponines, terpénoïdes et flavonoïdes (Sinha, 2012 ; Hoffmann-Martins-Do-Monte *et al.*, 2004). Des alcaloïdes tels que la nicotine, la palustrine et la palustrinine ont également été signalés dans cette plante (Cetojevic-Simin *et al.*, 2010).

Takeshi *et al.* (2005) ont rapporté la richesse en vitamines C et E des parties supérieures et corporelles de la prêle des champs. Les travaux de D'Agostino *et al.* (1984) ont abouti à la caractérisation d'un sitostérol (60%), campestérol (32,9%) et isofucostérol (5,9%) dans l'extrait hydroalcoolique de cette plante.

2.3. Usage traditionnel

Equisetum arvense est utilisée en médecine traditionnelle pour les maladies urinaires et prostatiques, la gestion de l'énurésie, la gestion des symptômes irritables du système urinaire, la réparation des tissus pulmonaires après une tuberculose pulmonaire et en d'autres maladies, œdème métabolique ou hormonal, hémorragie, plaies, rhumatismes et engelures (Grieve, 1971).

La plante présente une utilisation populaire comme agent anti-inflammatoire dans le bain pour les maladies de la peau en Europe, en Asie et en Amérique ainsi que comme antiseptique en Turquie et en Amérique (Navdeep *et al.*, 2010)

2.4. Pharmacologie

Takeshi, *et al.* (2005) ont montré que l'extrait éthanolique et aqueux d'*Equisetum arvense* possède une activité de piégeage des radicaux libres, de sorte qu'il est utilisé comme antioxydant. Rezaie *et al.* (2011) ont rapporté que l'extrait d'*Equisetum arvense* possède des effets sédatifs, pré-anesthésiques et anti-anxiété. Il Possède aussi une propriété anti-agrégante plaquettaire (Hassane *et al.*, 2004). Soleiman *et al.* (2005) ont rapporté que l'extrait méthanolique d'*Equisetum arvense* produit une activité antidiabétique chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine.

Les huiles essentielles d'*E. arvense* sont caractérisées par une activité antimicrobienne contre un large éventail de souches (actéries comme *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* et champignons tels *Aspergillus niger* et *Candida albicans*), (Radulovic *et al.*, 2006). L'extrait soluble à l'EtOAc d'*E. arvense* a montré une activité hépatoprotectrice distincte à un niveau de 400 g / ml (Oh *et al.*, 2006)

L'extrait hydroalcoolique de cette plante a exhibé des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'œdème de la patte induit par le carraghénane et effet analgésique induit par l'acide acétique (Fabrício Hoffmann Martins Do Monte *et al.*, 2004).

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériel végétal

Les deux plantes *Salix alba* (Safsaf abyadh) et *Equisetum arvense* (dhayl el hissan) ont été récoltées entre mars et juin 2017 de la région de Djebel Boutaleb, au sud-ouest de Sétif qui est située à 300 Km vers l'est d'Alger. L'identification botanique a été faite par Pr. Laouer H. (Université Ferhat Abbas Sétif-1, Algérie). Les plantes sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante (entre 22 et 25°C). Après broyage, les poudres obtenues ont été stockées dans des bocaux en verre hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

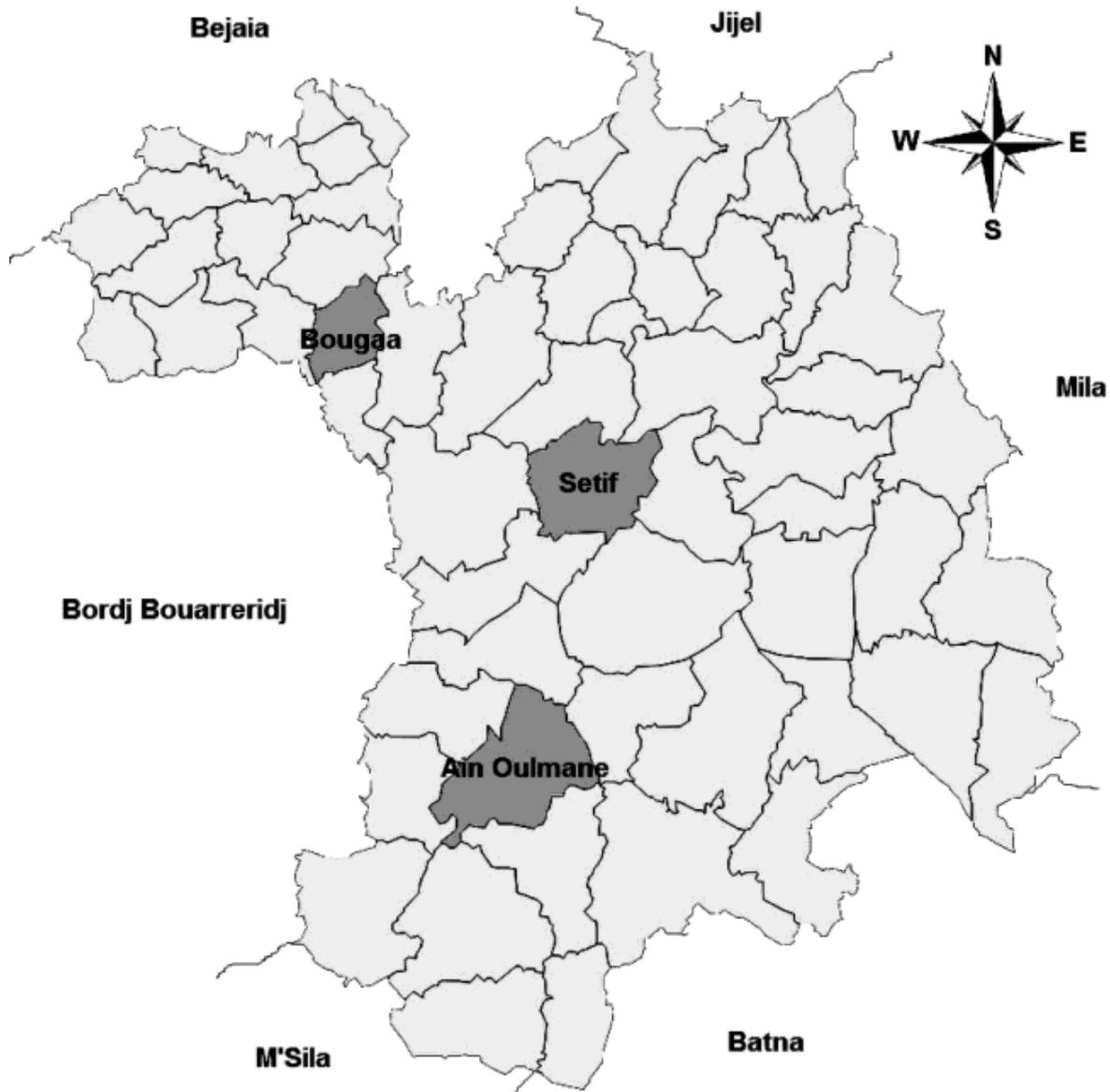


Figure 5. Carte de la zone d'étude (région de Setif)

1.2. Animaux

Des souris *Swiss albinos* mâles et femelles pesant entre 25 et 30 g et des rats *Wistar albino* femelles pesant entre 150 et 200 g, issus de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger) ont été utilisés dans l'étude *in vivo*. Les animaux répartis en groupes ont été hébergés dans des cages en plastique avec accès libre à l'eau et à l'alimentation fournie par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El Kseur (Bejaia). Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux ont été pesés et marqués avant leur utilisation.

1.3. Sang de mouton

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

2. Méthodes

2.1. Description et choix des localités de l'enquête

L'enquête ethnopharmacologique consistait à aller à la rencontre des praticiens traditionnels pour s'enquérir de leur méthode traditionnelle de traitement des maladies. Cette enquête est indispensable dans la mesure où elle nous a orientés afin de cibler certains tests biologiques.

Afin de recenser les plantes utilisées par la population de la région de Sétif, une enquête ethnobotanique a été menée, à l'aide d'un questionnaire (**Annexe 1**). Ce questionnaire a permis d'identifier les noms locaux des plantes médicinales utilisées comme des anti-inflammatoires, les parties utilisées, la prescription et le mode de préparation préconisé par chacun des tradi-thérapeutes, des personnes en contact avec les plantes médicinales ou des herboristes interrogés.

Cette enquête a été réalisée entre le mois de Janvier et Mars 2017. Des tradipraticiens (77 masculins et 27 féminins) étaient interrogés. Cette étude a été réalisée à travers trois sites d'enquête. La ville de Sétif et les communes de 'Ain Oulmene' et 'Bougaa' ont été choisies pour leur facilité d'accès et du fait que les guérisseurs traditionnels sont organisés et réputés pour avoir de bonnes connaissances de l'utilisation des plantes médicinales.

2.2. Préparation des extraits

2.2.1. Extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques (E.Met) des deux plantes sont préparés selon la méthode décrite par Arrar *et al.*, (2013). La poudre de chaque plante est mise dans le méthanol à un rapport de 10 g/100 ml pendant sept jours à l'ombre et à température ambiante. Après filtration, les filtrats sont récupérés. Les résidus sont soumis à une seconde macération pendant cinq jours. Les filtrats ont été mélangés. Les extraits ont été soumis à une évaporation à 40°C utilisant un rotavapor Büchi puis séchés et gardés dans des bocaux en verre hermétiquement fermés.

2.2.2. Extraits aqueux

Les extraits aqueux (E.Aq) sont préparés selon Arrar *et al.*, (2013). Une pesée de 10 g de poudre de chaque plante a été mise à bouillir pendant 20 minutes dans 100 ml d'eau distillée. Après filtration, les extraits récupérés sont soumis à une centrifugation à 3000 rpm (centrifugeuse Hettich) pendant 10 min. Une poudre brune a été obtenue après séchage du surnageant dans une étuve réglée à 40°C.

2.3. Analyses phytochimiques

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques des extraits méthanoliques et aqueux de *S. alba* et *E. arvense* est estimée par le réactif du Folin-Ciocalteu selon Boussoualim *et al.*, (2016). Cette méthode qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de

réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Le test consiste à mélanger 100 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide gallique (standard) avec 500 µl du réactif du Folin-Ciocalteu dilué au 1/10. Après 4 min, 400 µl de Na₂CO₃ (7.5%) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 1 h 30 min d'incubation contre un blanc dépourvu d'extraits à tester qui ont été remplacés par le solvant. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait) et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 6**).

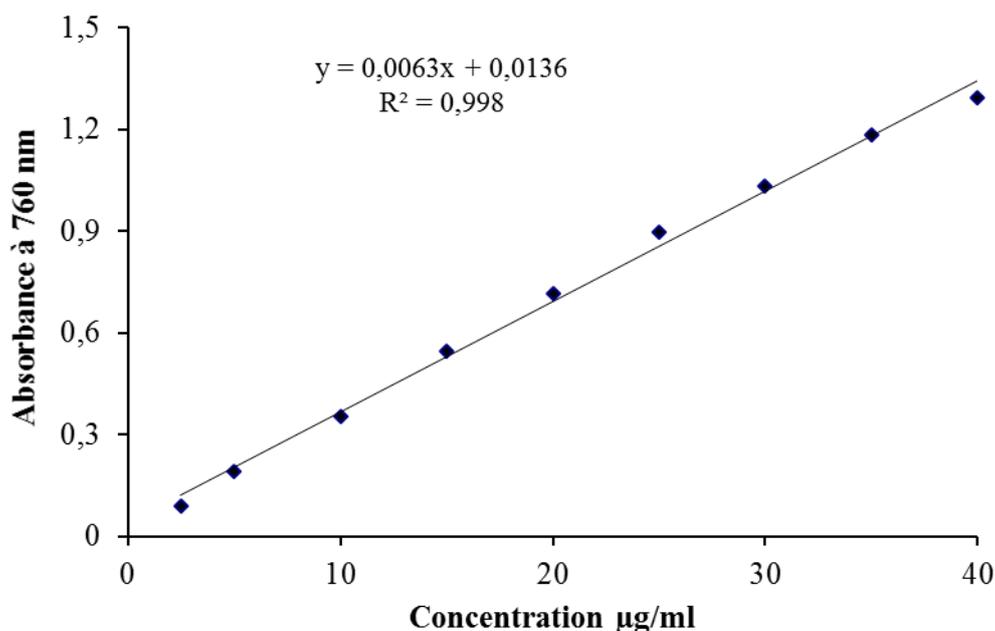


Figure 6 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baghiani *et al.*, 2012) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. Brièvement, 1 ml d'échantillon ou de standard (Quercétine) est ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur

en flavonoïdes totaux des extraits est alors exprimée en μg d'équivalents de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait), (**Figure7**).

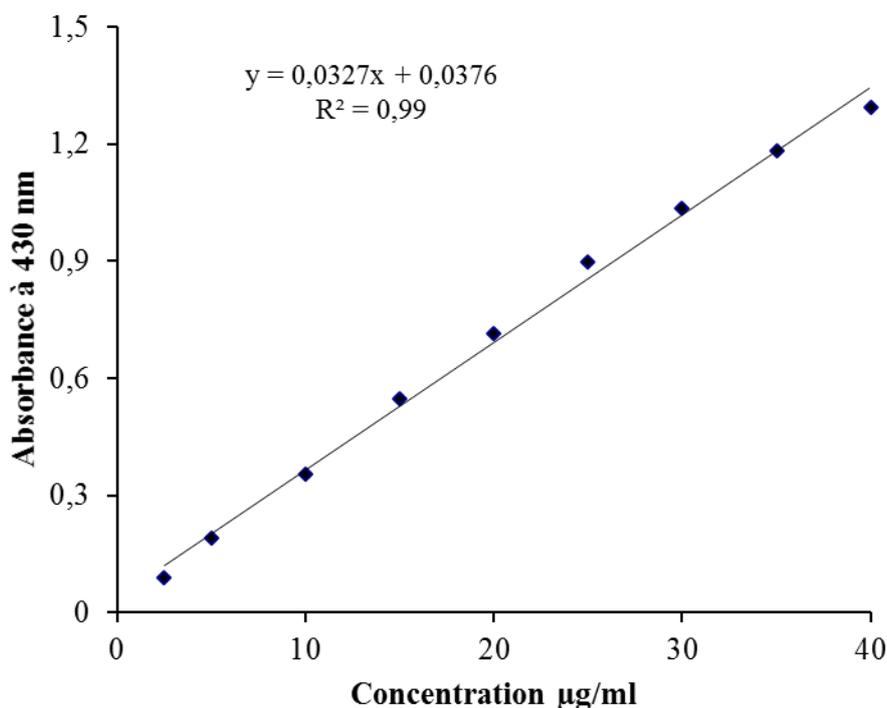


Figure 7. Droite d'étalonnage de la Quercétine.

2.3.3. Analyse par HPLC

La caractérisation des composés phénoliques dans les différents extraits méthanoliques et aqueux est réalisée par chromatographie liquide à haute performance en utilisant un système HPLC Agilent 1260 doté d'une colonne C18 (4.6 mm x 250 mm i.d., 5 μm). La phase mobile est constituée d'eau (A) et d'acide trifloracétique 0,02% dans l'acétonitrile (B). Le gradient d'élution appliqué est de type linéaire comme suit : 0 min (80% A) ; 0 à 5 min (80% A) ; 5-8 min (40% A) ; 8 à 12 min (50% A) ; 12-14 min (80% A) et 14-16 min (80% A). Le volume injecté est 10 μl . Le débit est de 1 ml/min et la température de la colonne est de 35°C. Les échantillons élués et les étalons ont été détectés à 280 nm.

2.4. Etude de la Toxicité aiguë

La toxicité aiguë des extraits des deux plantes a été investiguée conformément à la méthode décrite dans la ligne directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) code 425 (OCDE, 2008) pour déterminer les effets indésirables des extraits sur les organes cibles (foie, rate, reins, cœur, poumons) et les paramètres biochimiques tels que la créatinine, l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT). Pratiquement, les animaux sont répartis en 9 groupes expérimentaux contenant chacun 5 souris de poids homogène. Les animaux ont été mis à jeun la veille de l'expérimentation avec un accès libre à l'eau. Les différents extraits sont solubilisés dans de l'eau distillée. Chaque lot reçoit par gavage une dose unique de l'extrait ou de l'eau distillée selon le protocole suivant :

- **Groupes A. (a1, a2) :** Reçoivent par voie orale l'extrait aqueux des écorces de *Salix alba* aux doses 2000 et 5000 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes B. (b1, b2) :** Reçoivent par voie orale l'extrait méthanolique des écorces de *Salix alba* aux doses 2000 et 5000 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes C. (c1, c2) :** Reçoivent par voie orale l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* aux doses 2000 et 5000 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe D. (d1, d2) :** Reçoivent par voie orale l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* aux doses 2000 et 5000 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe témoin :** Reçoivent par gavage de l'eau distillée.

2.4.1. Observations

L'observation des changements du comportement et des symptômes de toxicité (agitation, convulsions, anorexie, asthénie, diarrhée et mort) a été effectuée durant les quatre

premières heures après l'administration de l'extrait puis régulièrement durant les premières 24 et 48 h et quotidiennement par la suite pendant 14 jours pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de morts pendant 14 jours. Avant l'administration des extraits, nous avons procédé à la prise de poids des animaux et après une semaine de traitement et 24 heures avant le sacrifice. Afin de suivre l'évolution corporelle des souris le long de l'expérimentation

2.4.2. Préparation du plasma et analyse biochimique

Au 14^{ème} jour de l'expérience, les souris ont été sacrifiées afin de récupérer le sang pour des analyses biochimiques. Le sang est récupéré dans des tubes héparines est soumis à une centrifugation à 3000 tr / pendant 10 min. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à froid afin de doser la créatinine, l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT).

2.4.3. Poids des organes

Après dissection, les organes (foie, rate, reins, cœur, poumons) ont été rapidement prélevés et pesés. Le poids relatif des organes de chaque animal a ensuite été calculé

2.5. Evaluation des activités antioxydantes

2.5.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH

Le radical libre stable diphénylpicryl-hydrazyl ayant une couleur violette est réduit par un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants dans le milieu réactionnel en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants (Molyneux, 2004).

Pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de *Salix alba* et *Equisetum arvense*, la méthode de (Trabsa *et al.*, 2014) est utilisée. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 50 µL d'extraits à

différentes concentrations ou de l'antioxydant de référence, l'hydroxytoluène butylé (BHT) est ajouté à 1250 µl de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc de méthanol. L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}] / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100$$

2.5.2. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure en fer ferreux. La forme réduite donne une couleur verte proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait. La mesure du pouvoir réducteur des extraits est réalisée selon Bouaziz *et al.* (2015). Des solutions d'extraits ou d'antioxydant de référence à différentes concentrations sont mélangées avec 400 µl du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 400 µl de ferricyanide de potassium (1% dans l'eau distillée). Le mélange est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min, ensuite 400 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote de 400 µl du surnageant est combiné à 400 µl d'eau distillée et 80 µl d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm. Le BHT a été utilisé comme standard. La CE50 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.

2.5.3. Test du piégeage du radical hydroxyle

L'activité de piégeage du radical hydroxyle par les extraits étudiés a été testée par la méthode de Smirnoff *et al.* (1989) modifiée par Ates *et al.* (2008). En bref, le mélange réactionnel contient 1 ml de FeSO₄ (1,5 mM), 0,7 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM), 0,3 ml de salicylate de sodium (20 mM) et 200 µl d'extraits à différentes concentrations. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 60 min à 37°C. L'absorbance a été ensuite mesurée

à 562 nm contre un blanc sans salicylate de sodium. La vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = 100 \times [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}]$$

2. 5.4. Test d'activité anti-hémolytique

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des plantes à l'attaque radicalaire a été évaluée selon le protocole décrit par Zerargui *et al.* (2015). Les érythrocytes de souris ont été isolés par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min et lavés avec du tampon phosphate (10 mM, pH 7,4) autant de fois jusqu'à ce que le surnageant devient incolore. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire des érythrocytes est dilué avec le tampon phosphate pour donner une suspension à 2% (v / v). Un volume de 80 µl de la suspension érythrocytaire à 2% a été ajouté à 20 µl de chaque extrait (0,1 mg / ml) et la Vit C a été utilisée comme standard. Puis le mélange a été traité par 136 µl de 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate (AAPH, 300 mM). Après incubation avec l'AAPH à 37°C, la cinétique de disparition progressive des hématies a été suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 630 nm, la résistance du sang à l'attaque radicalaire a été exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50 % des érythrocytes (half-hemolysis time ; HT50).

2.6. Activités anti-inflammatoires *in vivo*

2.6.1. Induction de l'œdème de l'oreille par le xylène

L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris (Kou *et al.*, 2005) est utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de *Salix alba* et *Equisetum arvense*. Les souris pesées et reparties en six groupes de six et jeunées pendant une nuit avant l'expérimentation. Les extraits sont administrés par gavage, de la manière suivante :

- **Groupes A. (a1, a2)** : extrait aqueux des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes B. (b1, b2)** : extrait méthanolique des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes C. (c1, c2)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes D. (d1, d2)** : extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- **Groupe standard** : Indométacine (50 mg/Kg).

Une heure après l'administration des extraits ou de l'Indométacine (50 mg/kg), l'inflammation de la face externe de l'oreille droite des souris est induite par l'application de 30 μ L de xylène alors que l'oreille gauche était considérée comme témoin. Après 2 h, l'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital pour chaque souris (Mayouf *et al.*, 2019). Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante : % inhibition de l'œdème = $(\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$, où $\Delta \text{ Témoin}$: différence d'épaisseur pour le groupe témoin, $\Delta \text{ Traité}$: différence d'épaisseur pour le groupe traité.

2.6.2. Induction de l'œdème de la patte par le carraghénane

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode décrite par Buodonpri *et al.* (2009) et Amraoui *et al.* (2019). Une heure avant l'induction de l'œdème, six rats femelles de chaque lot traité reçoivent oralement les extraits de la manière suivante :

- **Groupes A. (a1, a2)** : extrait aqueux des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement

- **Groupes B. (b1, b2)** : extrait méthanolique des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes C. (c1, c2)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe D. (d1, d2)** : extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- **Groupe standard** : Diclofenac (20 mg/kg).

L'inflammation est induite par injection sub-plantaire de 0,1 ml de carraghénane (1%) (Mélange de polysaccharides sulfatés extraits d'algues rouges) au niveau de la patte droite des rats. Le volume des pattes enflammées est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse digital avant puis 1, 2, 3, 4 et 5 heure après l'administration du carraghénane.

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

Δ Témoin : moyenne de l'épaisseur de la patte du groupe témoin au temps (t), Δ Traité : moyenne de l'épaisseur de la patte du groupe traité au même temps.

2.6.3. Induction de l'inflammation par la formaline

Pour évaluer l'effet antiarthritique des extraits *S. alba* et *E. arvense*, un modèle expérimental d'arthrite induite par la formaline (formaldéhyde à 2,5%) chez le rat (Akindele and Adeyemi, 2006 ; Amraoui *et al*, 2019) a été utilisé. Les rats femelles pesées et reparties en dix lots de six ont été mises à jeun 16 h avant l'expérimentation. Les extraits ou standard sont quotidiennement administrés par gavage, pendant dix jours de la manière suivante :

- **Groupes A. (a1, a2)** : extrait aqueux des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.

- **Groupes B. (b1, b2)** : extrait méthanolique des écorces de *Salix alba* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupes C. (c1, c2)** : extrait aqueux de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe D. (d1, d2)** : extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Equisetum arvense* doses 250 et 500 mg/Kg, respectivement.
- **Groupe témoin** : une solution de NaCl (0,9%).
- **Groupe standard** : Diclofenac (4 mg/kg).

Des injections sub-plantaires (intra-articulaires) de 0,1 ml de formaldéhyde à (2,5%) dans une solution saline normale au niveau de la patte droite de chaque animal sont effectuées le premier jour et répétées le troisième jour de l'expérience une heure après l'administration des extraits par voie orale. L'épaisseur de l'œdème est mesurée aux jours 0, 2, 4, 6, 8 et 10 à l'aide d'un pied à coulisse digital.

L'œdème de l'arthrite est estimé en calculant la différence de l'épaisseur de la patte entre le jour 0 et à différents moments.

2.7. Activités immunomodulatrices

2.7.1. Préparation des globules rouges de mouton

La **figure 8** résume les principales étapes d'isolement des globules rouges de mouton (Sheep red blood cells : SRBC) à partir du sang de mouton.

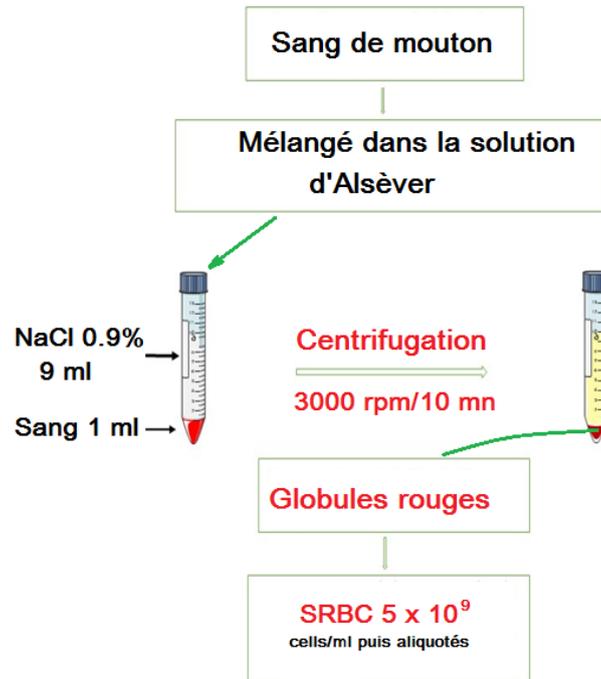


Figure 8. Principales étapes d'isolement des SRBC à partir du sang de mouton (Aichour *et al.*, 2016)

2.7.2. Évaluation de la réponse humorale

La réponse immunitaire anti SRBC des E.Met et E.Aq a été évaluée par le test l'hémagglutination (HA) selon le protocole décrit par Aichour *et al.*, (2016). Les animaux sont divisés en quatre groupes pour chaque extrait, chaque groupe contenant six souris. Les souris sont immunisées par voie intrapéritonéale (ip) avec 5×10^9 SRBC au jour 0. Les souris traitées reçoivent, par voie orale de l'extrait méthanolique ou aqueux (250, et 500 mg/kg) au jour -2, -1, 0, 1 et 2. Le groupe témoin reçoit uniquement de l'eau distillée aux mêmes jours. Les échantillons de sang sont prélevés chez les souris par ponction rétro-orbitale au jour 8 et étaient centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min pour séparer le sérum. Après l'inactivation du sérum par la chaleur à 56°C pendant 30 min, une étape de dilution en série ($\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$) est réalisée dans des plaques de microtitration. En bref, 25 μl du sérum des souris, dilué par le NaCl 0,9% dans des microplaques, est additionnés de 25 μl de 1% (v/v) de la suspension SRBC. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C . Le titre des anticorps (qui est l'inverse de la dilution) est enregistré comme le dernier puits montrant une hémagglutination visible.

CHAPITRE II : RESULTATS & DISCUSSION

1. Etude ethnobotanique

L'interaction entre les humains et les plantes a été décrite depuis longtemps comme l'un des facteurs influençant la civilisation humaine, notamment dans le domaine médical (Yeung *et al.*, 2020). La documentation de l'usage médical des plantes par des études ethnobotaniques permet le développement de médicaments et de traitements contemporains ainsi que la conservation des plantes (Jadid *et al.*, 2020). En Afrique, plus de 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour ses soins de santé primaire (WHO, 2020).

Les investigations réalisées dans la région de Sétif ont permis d'inventorier quatorze espèces réparties en quatorze familles botaniques. La liste des plantes médicinales utilisées dans les remèdes anti-inflammatoires et leurs indications thérapeutiques sont regroupées dans le **tableau 2**. Dans cette étude, les *Capparaceae* représentent la famille majoritairement citées (9 citations) puis *Salicaceae et Zingiberaceae* (8 citations), *Zygophyllaceae, Apiaceae et Asteraceae* (7 citations), *Urticaceae et Equisetaceae* (6 citations), *Malvaceae* (5 citations), *Lamiaceae* (4 citations), *Brassicaceae et Myrtaceae* (3 citations), *Dioscoreaceae et Moringaceae* (2 citations).

Tableau 2. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans les remèdes anti-inflammatoires dans la région de Sétif.

Famille	Nom scientifique	Nom locale	Partie utilisée	Mode de préparation	Citation
<i>Capparaceae</i>	<i>Capparis spinosa</i>	Kabbar	L'écorce de la racine	Infusion Décoction	9
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix alba</i>	Safsafabyadh	L'écorce	Cataplasme, infusion décoction, poudre	8
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiber officinale</i>	Zendjabil	Rhizome	Décoction, tisane	8
<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Peganum harmala</i>	Harmal	Feuilles, racines, tiges	Cataplasme	7
<i>Apiaceae</i>	<i>Thapsia garganica</i>	Dryas	Racine et partie aérienne	Poudre	7
<i>Asteraceae</i>	<i>Inule visqueuse</i>	Amagramane	Partie aérienne	Tisane	7
<i>Urticaceae</i>	<i>Urtica dioica</i>	Horayg	Feuilles	Cataplasme, infusion, décoction	6
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum arvense</i>	Dhaylhiṣān	Partie aérienne	Infusion, décoction	6
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva sylvestris</i>	Khobiza	Feuilles, rameaux, fleurs, fruits	Infusion, décoction	5
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Zaater	Partie aérienne	Décoction, tisane, fumigation, poudre	4
<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtus communis</i>	Rayhane	Feuilles	Infusion, décoction Cataplasme	3
<i>Brassicaceae</i>	<i>Lepidium sativum</i>	Hab rchad	Graines	Fraîchement séchée	3
<i>Dioscoreaceae</i>	<i>Tamus communis</i>	Karma souda	Rhizome	Cataplasme	2
<i>Moringaceae</i>	<i>Moringa oleifera</i>	Mouringa	Feuilles	Infusion, décoction	2

L'utilisation des plantes investiguées par les populations de la région de Sétif, essentiellement dans le traitement des maladies inflammatoires et analgésiques pourrait être en relation avec la prédominance de ces pathologies dans la région.

Les résultats de l'enquête ethnopharmacologique ont révélé que *Salix alba* et *Equisetum arvense* sont parmi les plantes les plus utilisées par la population locale dans les soins des maladies inflammatoires et analgésiques. Dans les recettes recensées, les plantes sont préparées seules mais souvent combinées avec d'autres ingrédients. Les recettes combinées

peuvent renfermer des suppléments de nature végétale (huile, vinaigre et autre plante) ou animale (beurre local, lait, yaourt et miel). Le **Tableau 3** représente les modes de préparation utilisés à des fins thérapeutiques des deux plantes *S. alba* et *E. arvense*.

Tableau 3. Modes de préparation traditionnelle des plantes *S. alba* et *E. arvense*.

Plante	Usage traditionnel
<i>Salix alba</i>	<p>Confection d'une ceinture à partir des écorces et l'enrouler autour du genou. Couvrir ensuite avec un linge ou avec de la cellophane et faire un bandage normal.</p> <p>Boire la décoction ou l'infusion de l'écorce</p> <p>Les écorces tranchées et séchées sont réduites en poudre. Mélanger la poudre avec du miel ou du yaourt.</p> <p>Les écorces broyées sont mélangées avec l'huile d'olive et appliquées sous forme de compresses.</p>
<i>Equisetum arvense</i>	Il est préférable de boire un verre à thé de macération ou de décoction de la partie aérienne

2. Analyses phytochimiques

2.1. Teneurs en polyphénols et des flavonoïdes

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques. Il n'existe pas de méthode d'extraction unique et standard. L'extraction par les solvants est la technique la plus couramment utilisée pour l'extraction des composés phénoliques (Ignat *et al.*, 2011). L'efficacité d'extraction dépend de plusieurs paramètres dont le choix de la méthode d'extraction, le solvant utilisé, la température, le temps d'extraction et la composition en composés phytochimiques (Zhang *et al.*, 2018). Cependant, il est rapporté que le facteur le plus influent est le type de solvants (Azwanida, 2015).

Dans la présente étude, deux méthodes d'extraction ont été utilisées. La décoction qui correspond à l'usage traditionnel des plantes étudiées, permet d'extraire préférentiellement les composés polaires, comme elle peut extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kinghon, 2005). Dans la deuxième méthode, l'extraction est faite par le méthanol, capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). Le choix des solvants d'extraction influence les rendements en métabolites secondaires des extraits.

Après extraction méthanolique et aqueuse, des extraits de couleur brune sont obtenus. L'E.Met et l'E.Aq de l'écorce de *S. alba* représentent un rendement qui est de l'ordre 40.03% et 8.76% respectivement ; tandis que ceux de L'E.Met et l'E.Aq d'*E. arvense* représentent 10.36% et 9.9% respectivement (**Tableau 4**).

Tableau 4. Aspects, couleurs, rendements d'extraction et teneurs des extraits méthanolique et aqueux de *S. alba* et *E. arvense* en polyphénols et flavonoïdes totaux. SAME : *Salix alba* methanolic extract, SAQE : *Salix alba* aqueous extract, EAME *Equisetum arvense* methanolic extract, EAQE : *Equisetum arvense* aqueous extract.

Plante	Extraits Bruts	Aspect	Couleur	Rendement d'extraction	Polyphénols ($\mu\text{gEAG/mg}$ d'extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait)
<i>Salix alba</i>	SAME	Poudre	Marron foncé	40.03%,	$656,95 \pm 0,14$	$18,26 \pm 0.02$
	SAQE	Poudre	Marron clair	8.76%	$440.12 \pm 0,14$	$12,44 \pm 0.004$
<i>Equisetum arvense</i>	EAME	Pâteux	Vert foncé	10.36%	$471,86 \pm 0,36$	16.07 ± 0.01
	EAQE	Poudre	Marron clair	9.9%	$234,82 \pm 0,05$	21.16 ± 0.01

Le dosage des polyphénols totaux montre que les extraits méthanoliques des deux plantes possèdent les teneurs les plus élevées suivies par l'E.Aq de *S. Alba*, et finalement l'E.Aq d'*E. arvenus*. Khoddami *et al.* (2013) ont montré que l'extraction avec le méthanol pur donne une meilleure récupération de composés phénoliques.

2.2. Caractérisation phytochimique

La chromatographie liquide haute pression est sans doute la technique d'analyse, de caractérisation d'extraits en composés phénoliques la plus utilisée. Elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte (Wollgast et Anklam, 2000). De ce fait, cette technique a été optée dans la présente étude dans le but de caractériser qualitativement et quantitativement les composés phénoliques des extraits de *Salix alba* et *Equisetum arvense*.

En fonction de leur structure, les polyphénols peuvent absorber à différentes longueurs d'onde. Les composés phénoliques en général sont détectés entre 240 et 285 nm ; les flavones et flavonols à 350-365 nm et les anthocyanines à 460-560 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Pour réaliser l'identification de chaque polyphénol, ses données spectrales et son temps de rétention

sont comparés avec les données obtenues à partir de standards commerciaux. Le **Tableau 5** résume la quantification des polyphénols totaux des extraits SAQE, SAME, EAQE, EAME.

Tableau 5. Analyse par HPLC des polyphénols totaux des extraits de *S. alba* et *E. arvenus*.

Composés	Tr (min)	Concentration (µg/g)			
		SAQE	SAME	EAQE	EAME
Acide gallique	3,302	7490,65	6465,33	21,548	0
Acide Chlorogénique	4,094	5543,23	12367,34	42,907	0
Catéchine	4,530	24313,09	36957,53	56,027	98,272
Gallate de méthyle	5,731	1291,05	1373,63	0	0
Acide caféique	6,037	0,00	0,00	106,356	53,046
Acide syringique	6,580	3660,90	1205,61	20,616	20,671
Pyrocatecho	7,272	5163,03	5923,67	16,454	43,069
Rutine	7,564	0,00	7278,06	0	0
Acide ellagique	8,220	0,00	0,00	10,782	29,133
Acide-Pcoumarique	9,227	0,00	0,00	1,854	7,089
Vanilline	9,965	0,00	0,00	11,750	30,908
Acide férulique	10,152	5306,63	5448,23	37,136	66,999
Naringinine	10,251	4917,95	8858,23	0	44,707
Taxifoline	12,472	2033,16	4244,94	15,183	20,938
Acide cinnamique	14,388	330,71	152,59	1,384	1,214
Kaempférol	14,755	0,00	1455,98	22,881	14,825

Tr : temps de rétention ; SAME : *Salix alba* methanolic extract ; SAQE : *Salix alba* aqueous extract ; EAME : *Equisetum arvense* methanolic extract ; EAQE : *Equisetum arvense* aqueous extract.

L'extrait de l'écorce de *Salix alba* présente un profil chimique de plusieurs polyphénols incluant des acides phénoliques et des flavonoïdes appartenant à différentes classes (**Figure 9 b, c**). L'extrait aqueux révèle la présence d'une teneur élevée d'acide gallique, acide syringique et acide cinnamique et l'extrait méthanolique est très riche en acide chlorogénique, catéchine, Methyl gallate, pyrocatechol, acide férulique, naringénine, et taxifoline. Il est intéressant de mentionner que l'acide caféique, la rutine, l'acide ellagique, l'acide coumarique, la vanilline et le kaempférol n'ont pas été détectés dans l'extrait aqueux, tandis que l'acide

caféique, l'acide ellagique, l'acide coumarique et la vanilline n'ont pas été trouvés dans l'extrait méthanolique (**Tableau 5** plus haut).

Selon Ewelina Piąteczak *et al.*, (2020), les flavanols et les procyanidines constituent jusqu'à 77,1% de tous les composés phénoliques dans l'écorce de *Salix alba*. Les composés phytochimiques identifiés dans notre étude sont conformes à ceux trouvés dans la littérature publiée par Cosmin *et al.*, (2013). Ils ont constaté que l'extrait d'écorce de *S. alba* était riche en naringénine, catéchine et d'autres flavonoïdes qui n'ont pas été identifiés dans l'étude actuelle. Cela peut être dû à la méthode différente utilisée dans la détermination (Karthikeyan *et al.*, 2012). De plus, la différence entre les résultats rapportés précédemment et les résultats actuels peut probablement être due à l'effet de l'environnement de culture qui a été signalé comme affectant la composition chimique des extraits.

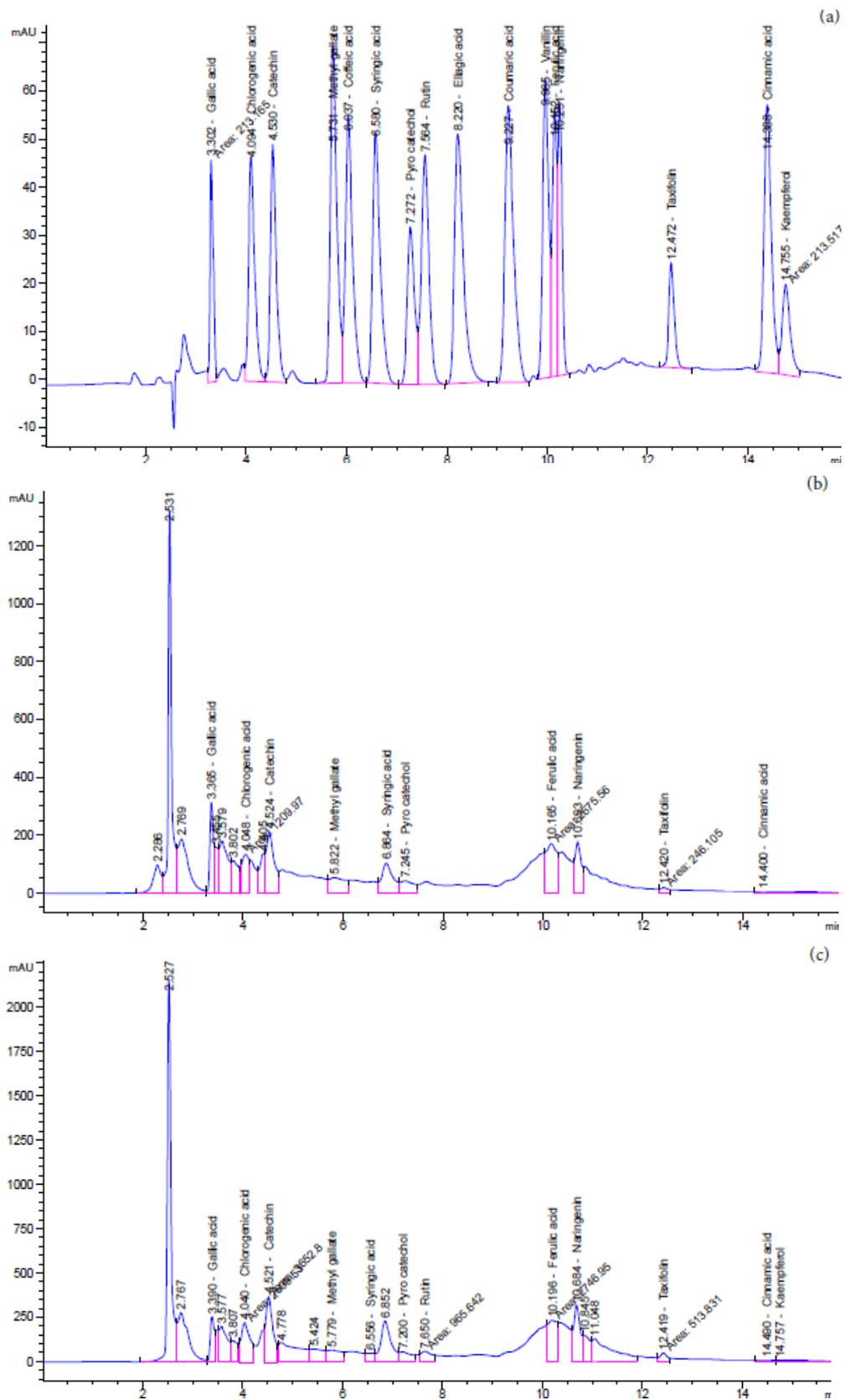


Figure 9. Profils chromatographiques du standard (a), SAME (b) et SAQE(c) obtenus par HPLC

Les résultats de l'analyse de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique *d'Equisetum arvense* révèlent la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes. Les conditions de séparation utilisées ont permis d'obtenir des chromatogrammes bien résolus (**Figure 10 (a), (b)**).

Les deux extraits possèdent deux acides phénols (l'acide caféique et l'acide férulique) en très grande quantité. La catéchine représente le Flavan-3-ols majoritaire. En outre, l'acide coumarique et l'acide Cinnamique sont présents en faible quantité dans l'extrait *d'Equisetum arvense* tandis que, Methyl gallate et Rutine ne sont pas détectées dans les deux extraits. L'Acide chlorogénique et l'acide gallique ne sont détectés que dans l'extrait aqueux *d'Equisetum arvense*.

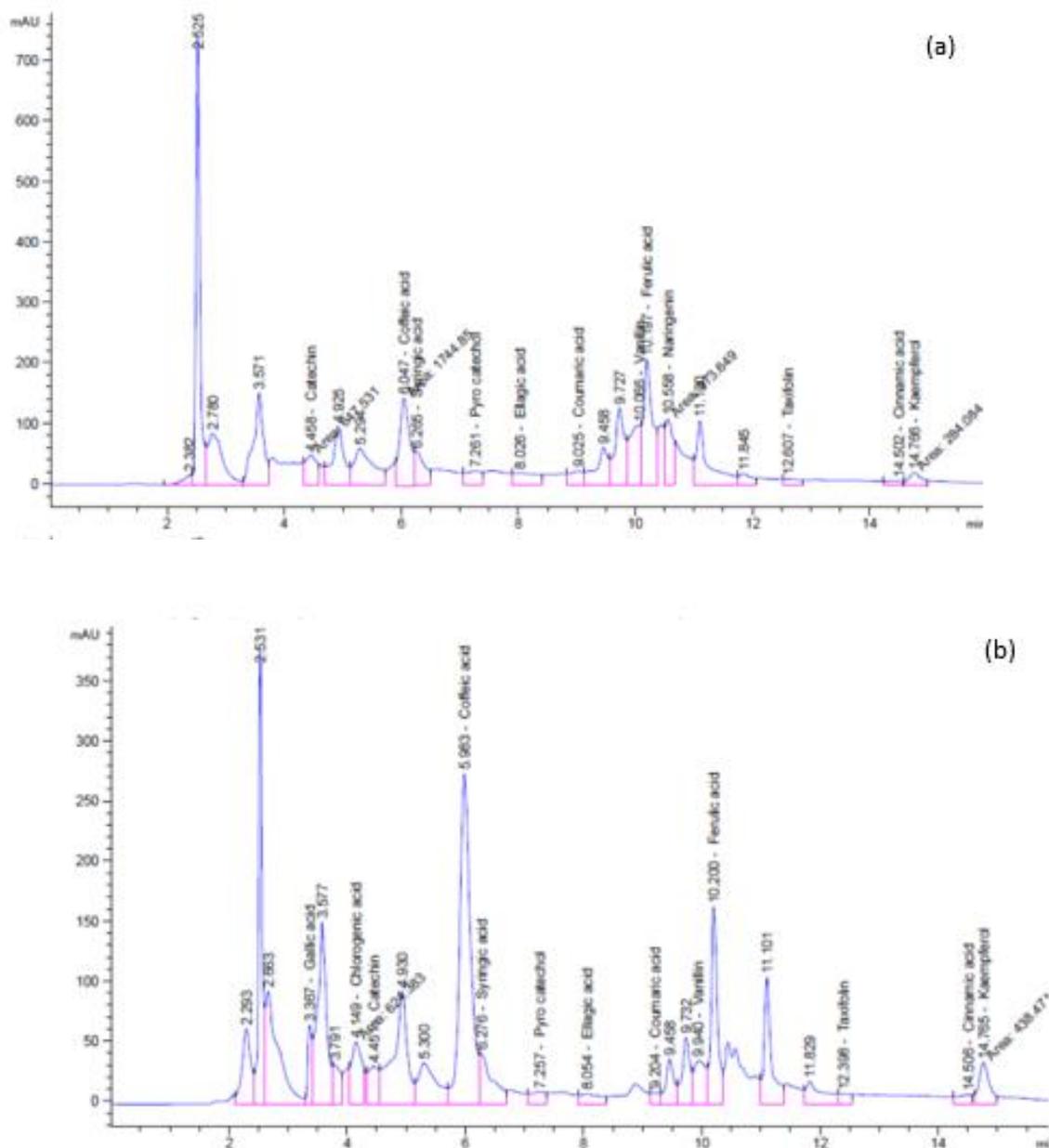


Figure 10. Profils chromatographiques d'EAME (a) et EAQE(b) obtenus par HPLC.

3. Activités antioxydantes des extraits

De nombreux extraits de plantes présentent des propriétés antioxydantes efficaces grâce à leurs phyto-constituants, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes (Barriada-Bernal *et al.*, 2013). L'activité antioxydante des différents extraits de *S. alba* et *E. arvense* a été évaluée grâce à différents tests *in vitro*.

3.1. Piégeage du radical DPPH

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de *S. alba* et *E. arvense* vis-à-vis du radical DPPH sont représentés dans la **Figure 11**. Les résultats montrent que les extraits aqueux et méthanoliques de *S. alba* et *E. arvense* possèdent un effet piègeur nettement supérieur à ceux de BHT standard (87 ± 0.003) vis-à-vis du radical DPPH. L'activité de piégeage des radicaux la plus élevée a été présentée par SAME avec $IC_{50} = 6,7 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$, suivie par SAQE ($15,2 \pm 0,003 \mu\text{g/ml}$). Pour les extraits EAME et EAQE présentent une activité importante $18.3 \pm 0.0023 \mu\text{g/ml}$, $36.33 \pm 0.002 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

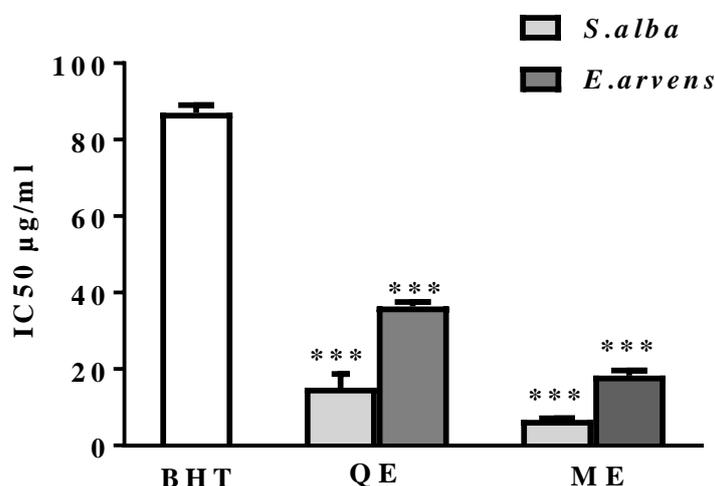


Figure 11 : Activité anti radicalaire des extraits aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) de *Salix alba* et *Equisetum arvense*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3) ; *** p < 0.001, comparées avec la BHT.

D'après ces résultats, l'extrait qui présente une forte activité antiradicalaire est celui qui possède une teneur élevée en polyphénols. La différence dans l'activité peut être due à la teneur en composés phénoliques. De plus, il a été démontré que les polyphénols sont des antioxydants importants via leurs groupes hydroxyle et d'autres groupes conjugués qui inhibent la génération de radicaux et la désactivation des précurseurs actifs (Pietta, 2000).

Les extraits méthanoliques sont dotés d'une activité inhibitrice plus forte que celle des extraits aqueux. Cette différence est souvent attribuée au fait que les extraits des solvants

organiques sont plus riches en métabolites secondaires polaires de moyenne et de faible polarité (Kintzios *et al.*, 2010).

3.2. Pouvoir réducteur

Dans le test actuel, l'activité du pouvoir réducteur a été déterminée pour tous les extraits (**Figure 12**). Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante la plus élevée est obtenue avec l'extraits aqueux de *Salix alba* ($IC_{50} = 6.51 \mu\text{g/mL}$). Par contre, l' IC_{50} de l'extrait méthanolique est relativement élevée $30.6 \mu\text{g/mL}$ (activités plus faibles). Egalement, une grande différence est observée entre l'effet de l'extraits aqueux et méthanolique d'*E. arvense*. De plus, EAME présente un bon effet de pouvoir réducteur avec une $IC_{50}=92.5 \pm 0.002\mu\text{g/ml}$. Tandis que l'EAQE présente une IC_{50} égale à $348.33 \pm 0.02\mu\text{g/ml}$. Le BHT utilisé comme antioxydant standard présente un pouvoir réducteur puissant avec une valeur d' $IC_{50}=14.84 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$. Ce pouvoir est dû à la présence de composés donneurs d'électron ayant une capacité d'inhiber les réactions en chaînes déclenchées par les radicaux libres et peuvent réduire les intermédiaires oxydées des processus de peroxydation des lipides (Chanda et Dave, 2009).

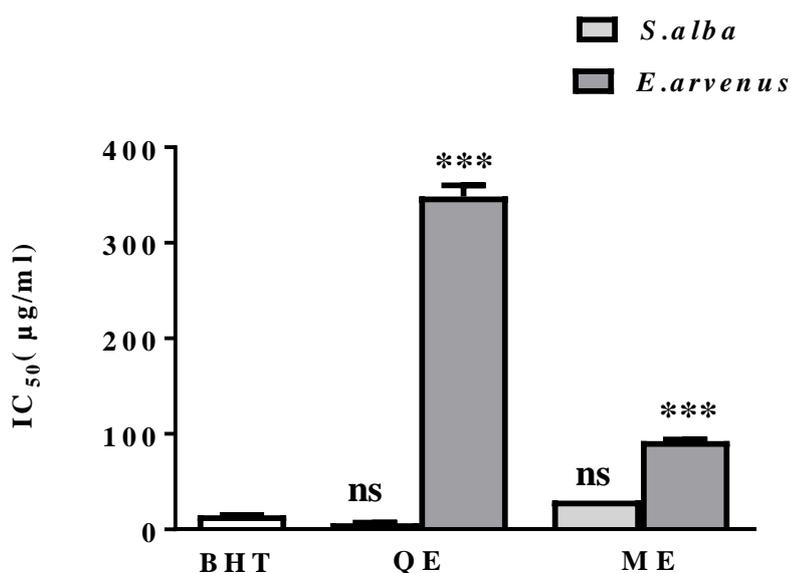


Figure 12. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *Salix alba* et *Equisetum arvense*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3) ; ns: non significatif, *** $p < 0.001$, comparées avec la BHT.

3.3. Piégeage du radical hydroxyle

Dans ce test, l'activité antioxydante est déterminée sur la base que les extraits possèdent la capacité à piéger le radical hydroxyle (**Figure 13**). Les résultats obtenus montrent que l'extrait SAQE possède la capacité à piéger le radical hydroxyle élevé avec un IC50 estimé à $60 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$. La valeur IC50 de SAME était de $386 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$. Cependant, en comparaison avec IC50 du standard vit C seul l'extrait EAQE exprime un effet similaire. La valeur de l'IC50 del'extrait EAME demeure significativement différente ($p < 0.001$) de celle de la Vit C.

Le radical hydroxyle est l'une des puissantes espèces réactives de l'oxygène dans le système biologique qui réagit avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques ce qui conduit à la destruction de ces molécules et à la lyse des cellules. L'inhibition de ce radical est cruciale dans la prévention des maladies induites par le stress oxydant.

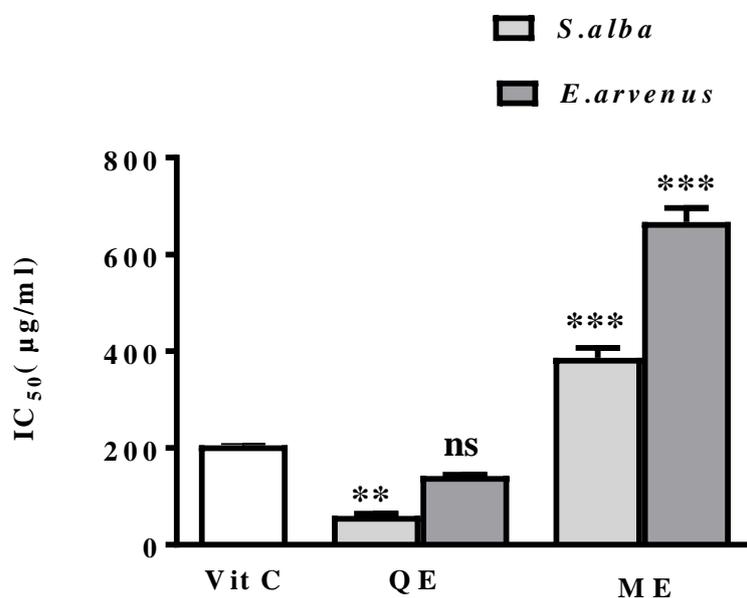


Figure 13. La capacité des différents extraits aqueux et méthanolique de *Salix alba* et *Equisetum arvense* à piéger le radical hydroxyle. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3) ; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns : non significatif, comparées avec la Vit C.

3.4. Activité anti-hémolytique

Ce test consiste à soumettre l'échantillon du sang total à une agression radicalaire et évaluer si les extraits empêchaient ou non les dommages oxydatifs à la membrane érythrocytaire. Le test anti-hémolytique a démontré que tous les extraits étaient plus efficaces que le contrôle positif HT50 de 123,56 min (**Figure 14**). Les valeurs de HT50 des différents extraits testés montrent une grande variation ; SAQE exprime l'effet le plus puissant avec une HT50 = 169,22 par rapport au SAME avec une HT50 = 138,25. L'extrait EAME présente une meilleure activité anti-hémolytique (174.61 min), suivie de l'extrait EAQE (157.73 min).

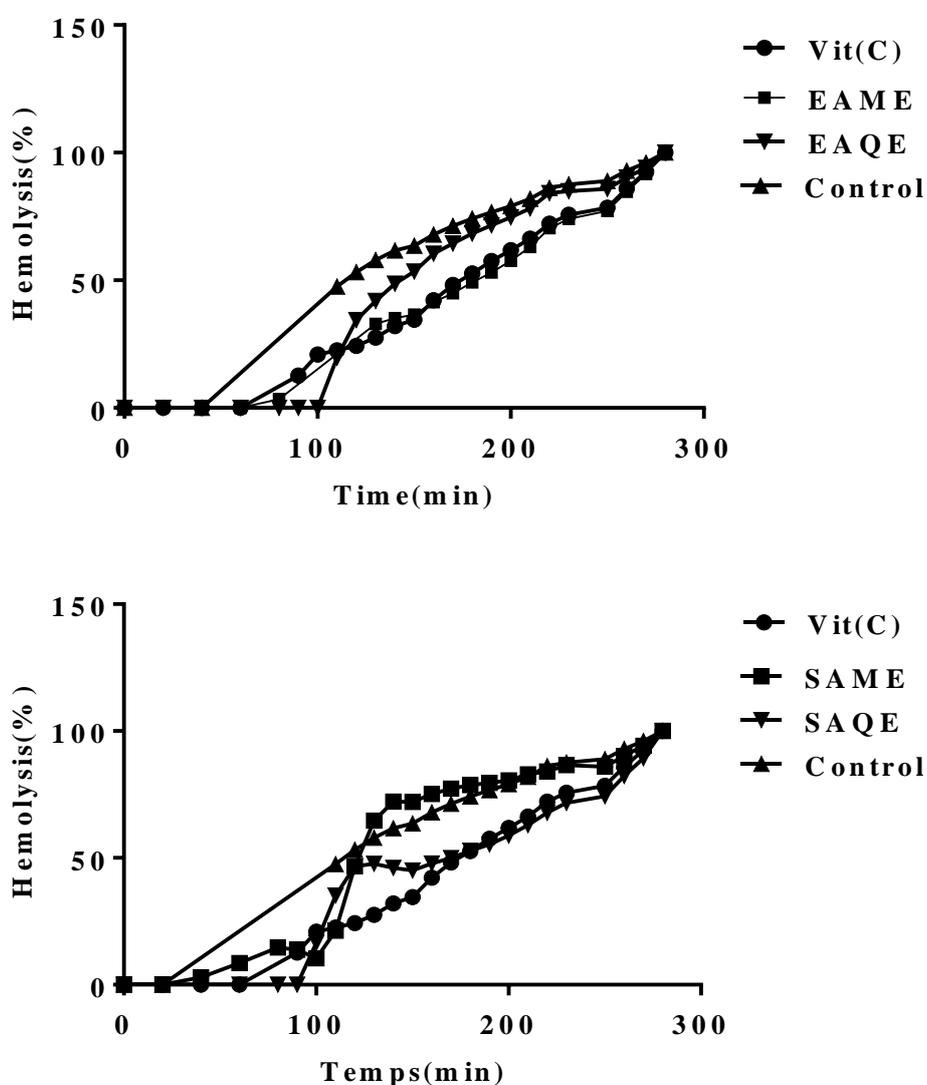


Figure 14. L'inhibition de l'hémolyse par les extraits aqueux et méthanoliques de *Salix alba* et *Equisetum arvense*.

Il n'y a pas de différence significative par rapport au groupe témoin. Le groupe traité à la vitamine C n'a pas augmenté de manière significative la HT50 (171,61 min) par rapport au groupe témoin. L'oxydation des érythrocytes sert de bon modèle pour les dommages oxydatifs des membranes biologiques en raison de leur facilité d'isolement, de leur simplicité, de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et de la concentration élevée en oxygène et en hémoglobine des cellules (Hammoudi *et al.*, 2017). Il semble que la teneur élevée en phénols et en flavonoïdes dans l'extrait conduit à une activité anti-hémolytique puissante.

4. Evaluation de la toxicité aigue

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps pour la prévention et le traitement de diverses maladies. Elles sont bien connues à travers l'histoire et ont toujours fait partie de la culture humaine (Epho *et al.*, 2019). Du fait de cet usage courant pour leurs divers effets thérapeutiques, une évaluation toxicologique devient une étape indispensable pour déterminer l'innocuité des extraits (De Melo *et al.*, 2011). Cette étude a été conçue pour évaluer la toxicité aiguë des extraits *S. alba* et *E. arvense* chez les souris.

L'étude de la toxicité aiguë chez des souris a montré que l'administration orale de 2 g/Kg et 5g/Kg des extraits aqueux de *S. alba* ne provoque aucun signe d'intoxication ni de mortalité pendant les 14 jours d'observation ce qui indique que la dose létale moyenne (DL₅₀) est supérieure à 5000 mg/kg. Aucun symptôme ou signe de toxicité ni de décès n'a été enregistré lors de l'administration orale de 2g/Kg de l'extrait méthanolique de *S. alba*. Par contre, après l'administration de l'extrait méthanolique de *S. alba* aux souris avec la dose de 5g/Kg, des signes d'intoxications et de mortalité (5 souris mortes sur un nombre total de 5) ont été observées, ce qui indique que la DL₅₀ est comprise entre 2000 mg/kg et 5000 mg/kg.

Les résultats ne montrent aucune mortalité et aucun signe clinique de toxicité après l'administration par voie orale des doses 2 g/Kg et 5 g/Kg des extraits *E. arvense*. Ce qui montre que la DL₅₀ est supérieure à 5000 mg/kg.

4.1. Progression du poids corporel

Le changement de poids corporel est un paramètre important qui peut contrôler la toxicité (Vahalia *et al.*, 2011). Il ne sera significatif que si les pertes de poids corporel de plus de 10% par rapport au poids corporel initial se produisent (Ramesh *et al.*, 2007). Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience de la toxicité aiguë par l'extrait *Salix alba* et extraits *E. arvense* n'a démontré aucun changement significatif durant les 14 jours du traitement dans tous les groupes par rapport au témoin (**Tableau 6**).

Tableau 6. Effet de la prise unique des extraits (A) SAME, SAQE et (B) EAME et EAQE sur le poids corporel des souris mâles. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n= 5). ns : aucune différence significative n'a été observée entre le groupe témoin et les groupes traités.

A

Jours	Control	SAQE 2 g/kg	SAQE 5 g/kg	SAME 2 g/kg	SAME 5 g/kg
1 ^{er}	27.8 \pm 0.665	26 \pm 0.634 ^{ns}	28 \pm 0.896 ^{ns}	28.4 \pm 0.511 ^{ns}	nd
7 ^{ème}	30.8 \pm 0.584	29.8 \pm 1.360 ^{ns}	31.2 \pm 0.972 ^{ns}	28.8 \pm 1.598 ^{ns}	nd
14 ^{ème}	32.2 \pm 0.375	30.8 \pm 1.116 ^{ns}	33.4 \pm 0.929 ^{ns}	30 \pm 1.143 ^{ns}	nd

B

Jours	Control	EAQE 2 g/kg	EAQE 5 g/kg	EAME 2 g/kg	EAME 5 g/kg
1 ^{er}	27,8 \pm 0,665	27,4 \pm 0,874 ^{ns}	27,2 \pm 0,584 ^{ns}	27,4 \pm 0,871 ^{ns}	27 \pm 0,634 ^{ns}
7 ^{ème}	30,8 \pm 0,584	30 \pm 0,31 ^{ns}	30 \pm 0,549 ^{ns}	30 \pm 0,31 ^{ns}	27,4 \pm 1,29 ^{ns}
14 ^{ème}	32,2 \pm 0,375	32,6 \pm 0,68 ^{ns}	30,2 \pm 0,2 ^{ns}	32,6 \pm 0,68 ^{ns}	29,6 \pm 1,25 ^{ns}

4.2. Poids relatif des organes

Le poids relatif des organes est également un indice important de l'état physiologique et pathologique chez l'homme et chez les animaux d'expérimentation (Ramesh *et al.*, 2007). L'administration orale de l'extrait *Salix alba* et l'extrait *E. arvense* n'a provoqué aucune variation du poids relatif des différents organes (foie, rate, reins, cœur, poumons) chez les

souris traitées par rapport au groupe témoin. Cependant, la rate chez les souris traitées avec 2000mg/kg de SAME a montré une variation significative ($p < 0,01$) par rapport au groupe témoin, comme indiqué dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Poids relatif des organes des souris traitées par les extraits (A) SAME, SAQE et (B) EAME et EAQE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 5$), ns : aucune différence significative ; ** : $p < 0,01$.

A

Organes	Control group	SAQE 2 g/kg	SAQE 5 g/kg	SAME 2 g/kg	SAME 5 g/kg
Cœur	0.546 \pm 0.029	0.50 \pm 0.02 ^{ns}	0.458 \pm 0.032 ^{ns}	0.554 \pm 0.068 ^{ns}	nd
Poumons	0.793 \pm 0.05	0.709 \pm 0.08 ^{ns}	0.619 \pm 0.067 ^{ns}	0.712 \pm 0.049 ^{ns}	nd
Foie	5.592 \pm 0.19 3	5.709 \pm 0.55 ^{ns}	4.316 \pm 0.209 ^{ns}	5.90 \pm 0.56 ^{ns}	nd
Rein	1.423 \pm 0.117	1.522 \pm 0.188 ^{ns}	1.366 \pm 0.064 ^{ns}	1.482 \pm 0.093 ^{ns}	nd
Rate	0.703 \pm 0.014	0.607 \pm 0.057 ^{ns}	0.555 \pm 0.038 ^{ns}	1.48 \pm 0.263 ^{**}	nd

B

Organes	Control group	EAQE 2 g/kg	EAQE 5 g/kg	EAME 2 g/kg	EAME 5 g/kg
Coeur	0.546 \pm 0.029	0.512 \pm 0,047 ^{ns}	0.523 \pm 0,012 ^{ns}	0,579 \pm 0,039 ^{ns}	0,485 \pm 0,066 ^{ns}
Poumons	0.793 \pm 0.05	0.641 \pm 0,041 ^{ns}	0.648 \pm 0,036 ^{ns}	0,73 \pm 0,027 ^{ns}	0,675 \pm 0,073 ^{ns}
Foie	5.592 \pm 0.19 3	5.122 \pm 0,373 ^{ns}	5.25 \pm 0,36 ^{ns}	5,63 \pm 0,09 ^{ns}	5,601 \pm 0,363 ^{ns}
Rein	1.423 \pm 0.117	1.623 \pm 0,237 ^{ns}	1.54 \pm 0,18 ^{ns}	1,42 \pm 0,088 ^{ns}	1,469 \pm 0,162 ^{ns}
Rate	0.703 \pm 0.014	0,646 \pm 0,04 ^{ns}	0.76 \pm 0,029 ^{ns}	0,94 \pm 0,17 ^{ns}	0,659 \pm 0,194 ^{ns}

4.3. Paramètres biochimiques

Dans l'étude de toxicité, divers paramètres biochimiques pourraient être utilisés comme marqueurs des effets hépatocellulaires qui peuvent être induits suite à l'administration de substances. Le foie est le principal organe assurant la biotransformation des xénobiotiques dans l'organisme et par conséquent il est considéré comme la principale cible des substances toxiques (Gu & Manautou, 2012). Selon Vysakh *et al.* (2018), certains composés phytochimiques présents dans les plantes peuvent provoquer une hépatotoxicité. Cela se traduit par la présence de niveaux élevés d'enzymes marqueurs de lésions hépatiques dans le sang. Pour cette raison, les marqueurs plasmatiques des lésions hépatiques, tels que l'AST, l'ALT et la créatinine ont été analysés pour étudier l'hépatotoxicité possible de l'extrait de *S.alba* et *E. arvensis*. Dans cette étude, ALT et AST des souris traitées par différentes doses de l'extrait *Salix alba* et l'extrait *E. arvensis* ne manifestent aucun changement significatif (Figure 15-16). Ce qui suggère que les extraits utilisés sont des extraits non hépatotoxiques. En outre, l'administration orale des extraits n'a pas provoqué une augmentation de la créatinine. Ce paramètre est un marqueur important du dysfonctionnement rénal.

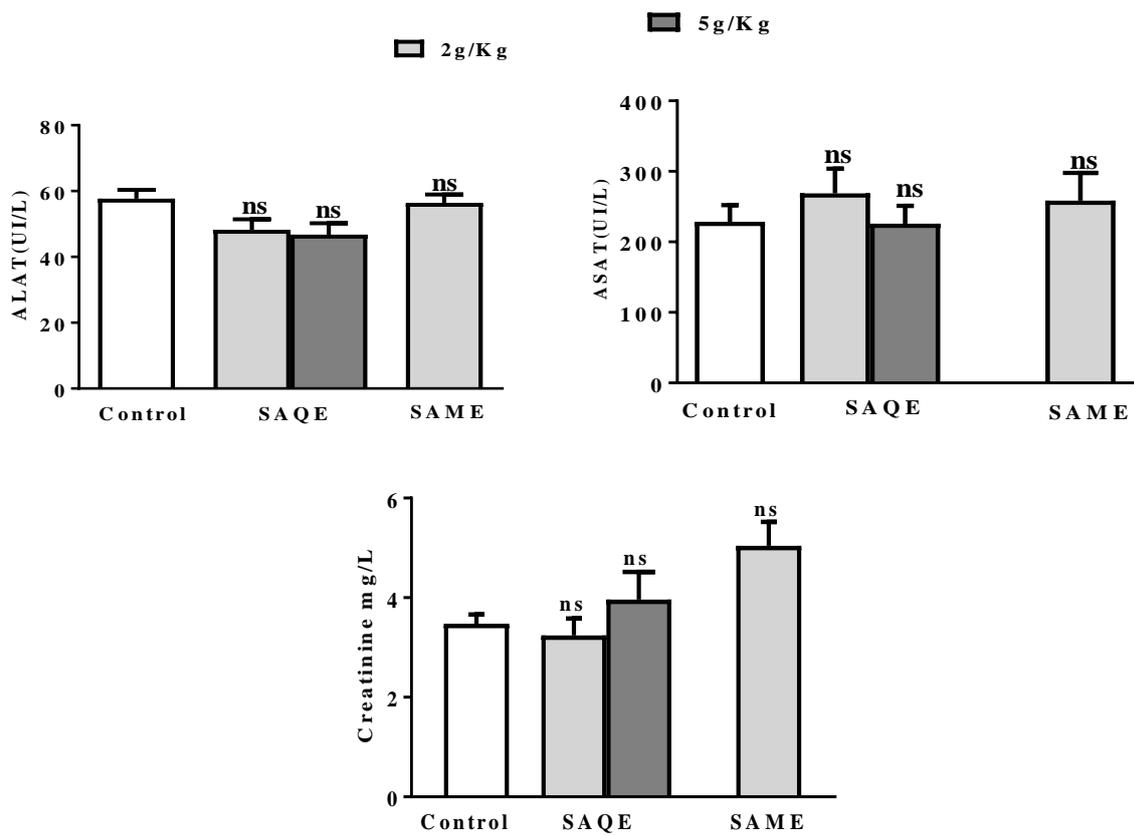


Figure 15. Paramètres biochimiques des souris mâles traités avec des doses uniques de l'E.Met et E.Aq de *S. alba* (2000 et 5000 mg/kg). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=5), ns : pas de différence significative.

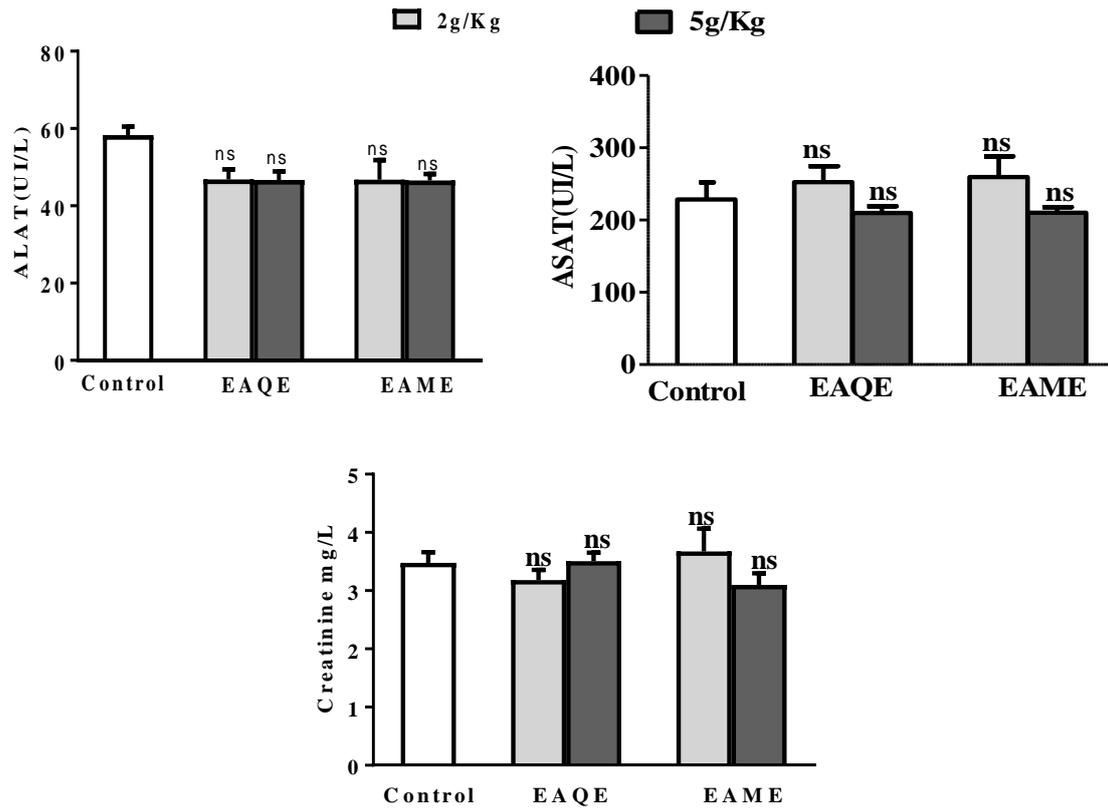


Figure 16. Paramètres biochimiques du contrôle et des souris traitées avec *E. arvensis* mesurés au cours de la toxicité aiguë. Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SEM (n=5). ns : non significatif.

5. Activité anti-inflammatoire *in-vivo* des extraits

L'inflammation est le principal processus impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques (Zhong et Shi, 2019). Ses principaux symptômes sont : l'œdème, l'hyperalgésie et l'érythème. Etant donné que l'œdème constitue l'un des signes cardinaux de l'inflammation, il serait intéressant de l'étudier lors de l'investigation de l'effet anti-inflammatoire des substances naturelles (Morris, 2003). Dans la présente expérimentation, l'étude de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *S. alba* et *E. arvense* a été menée en utilisant les modèles de l'inflammation *in vivo*

5.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène

Les extraits SAME et SAQE ont pu réduire l'œdème de l'oreille avec un pourcentage d'inhibition le plus élevé (57.81% et 67.18%, respectivement) à 500 mg/kg. Cet effet a été similaire à celui provoqué par l'indométacine 66.24 %. A la dose de 250 mg/kg, l'effet des extraits SAME et SAQE était modérée avec des pourcentages d'inhibition de 32.4% et 39.08%, respectivement, mais reste statistiquement significatif par rapport à l'indométacine (**Figure 17**).

Les extraits testés EAME, EAQE inhibent de manière efficace la formation de l'œdème auriculaire provoqué par le xylène à la dose 500 mg/kg avec une inhibition de 67.85%, et 71.87%, respectivement. Le traitement topique par ces deux extraits testés à la dose 250 mg/kg a montré un effet statistiquement significatif avec un pourcentage d'inhibition de 36,11% et 37,96%, respectivement. L'EAQE a présenté les effets antiphlogistiques les plus élevés contre l'œdème auriculaire induit par le xylène, probablement en raison de la présence de l'acide caféique. En effet, ce dernier flavonoïde possède une activité anti-inflammatoire déterminée par Shahidi et Yeo (2018).

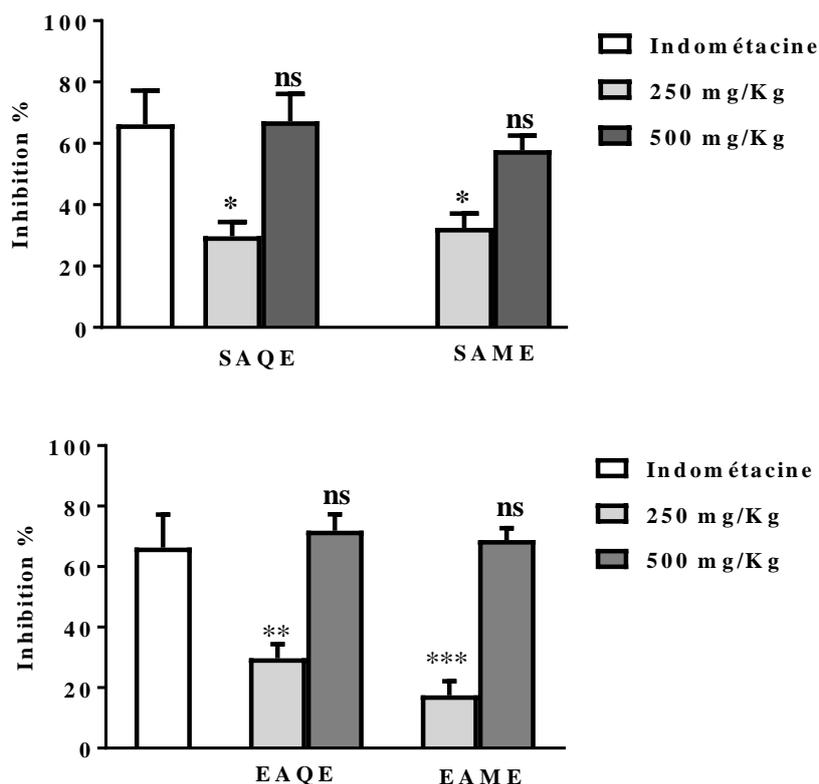


Figure 17. Effet anti-inflammatoire des extraits aqueux et méthanolique de *S. alba* et *E. arvensis* sur l'œdème auriculaire induit par le xylène chez la souris. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (N=6). ns : pas de différence significative, * $p < 0.05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un modèle expérimental reproductible et présente une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lu *et al.*, 2006). Le gonflement induit par le xylène est suivi d'une réponse immunitaire innée dans la peau, d'une réaction de cytotoxicité par les cellules T activées, puis d'une migration des leucocytes PMN, produisant une inflammation neurogène caractérisée par la chaleur, la rougeur et l'œdème (Kodithuwakku *et al.*, 2013).

Le mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel le xylène induit l'inflammation met en jeu les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine qui suite à une stimulation, libèrent un nombre de médiateurs qui peuvent initier la réaction inflammatoire. Ce phénomène est connu sous le nom de l'inflammation neurogénique. La substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine sont les principaux initiateurs de l'inflammation neurogénique. Ils induisent une

vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales (Rotelli *et al.*, 2003), comme ils peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et Vasko, 2003). L'indométacine, un puissant AINS, réduit la formation de l'œdème par l'inhibition de l'activité de la cyclo-oxygénase et par conséquent de la synthèse des prostaglandines (Lucas, 2016). Nos résultats ont démontré que les extraits SAME, SAQE, EAME et EAQE réduisent efficacement le développement de l'œdème de l'oreille indiquant que ces extraits agiraient comme des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase.

5.2. Effet sur l'œdème induit par le carraghénane

L'œdème de la patte induit par l'injection sous-plantaire du carraghénane est un modèle classique généralement utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire aigu *in-vivo* des extraits de plantes (Chauhan *et al.*, 2018). Les Résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *S. alba* et *E. arvensis* sur le modèle d'œdème de la patte induit par le carraghénane sont présentés dans cette expérimentation par l'évolution de l'inflammation dans la **Figure 18**. Le **tableau 8** résume les différents pourcentages d'inhibition de l'inflammation causée par l'injection sous-plantaire du carraghénane.

Les résultats obtenus ont montré que l'inflammation induite par le carraghénane augmente en fonction du temps pour atteindre son maximum à 5 heures chez les souris traitées à l'eau distillée. Le Diclofenac (20 mg) a montré une remarquable inhibition de l'inflammation par rapport au groupe contrôle comme tous les autres extraits testés. Cependant, les extraits de *Salix alba* se démarquent des deux autres extraits par un effet anti-inflammatoire plus notable. Les extraits de *Salix alba* ont un effet inhibiteur dès la première heure qui suit l'injection du carraghénane, puis cet effet augmente progressivement jusqu'à la

cinquième heure. La dose de 500 mg/kg inhibe la formation de l'œdème de manière plus considérable.

Tableau 8. Pourcentage d'inhibition de l'œdème plantaire chez les rats traités par les extraits SAME, SAQE, EAME, EAQE et du Diclofenac (20 mg).

Extraits	Doses (mg/kg)	Temps				
		1h	2h	3h	4h	5h
SAME	250	12,5	23,62	46,77	76,94	83,00
	500	18,21	27,75	60,89	78,65	88,62
SAQE	250	12,27	23,64	41,14	63,31	81,52
	500	15,23	24,20	50,78	65,04	87,256
EAME	250	39,80	25,79	36,66	52,17	69,64
	500	40,69	27,51	54,42	64,23	77,48
EAQE	250	29,36	17,22	36,26	51,79	61,26
	500	31,47	20,85	39,06	52,5	67,31
Diclofenac	20	25,81	45,15	73,78	85,35	93,31

L'administration de l'extrait de la partie aérienne d'*E. arvense* aux doses de 250 et 500 mg/kg prévient le développement de l'œdème plantaire chez le rat de manière significative par rapport au contrôle négatif à partir de la deuxième heure (**Figure 18 C**).

L'œdème de la patte induit par le Carrageenan est une réaction inflammatoire biphasique dépendante du temps dans laquelle divers médiateurs inflammatoires participent à son développement (Chavan *et al.*, 2010). La première phase de l'inflammation (0-1 heure) est provoquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de bradykinine sur la perméabilité vasculaire (Sadeghi *et al.*, 2013). La phase ultérieure (1-5 h) est due à la surproduction de prostaglandine et de radicaux libres dérivés de l'oxygène dans les tissus (Vircheva *et al.*, 2011). Nos résultats ont indiqué que les quatre extraits testés étaient capables de réduire efficacement le gonflement dans les deux phases de l'inflammation induite par l'injection du carraghénane avec une inhibition maximale dans la seconde phase. Ainsi, l'effet anti-

inflammatoire des extraits SAQE, SAME pourrait être lié à l'inhibition de la libération d'histamine ou de sérotonine dans la phase initiale et à l'inhibition de l'activité de la cyclo-oxygénase dans la seconde phase.

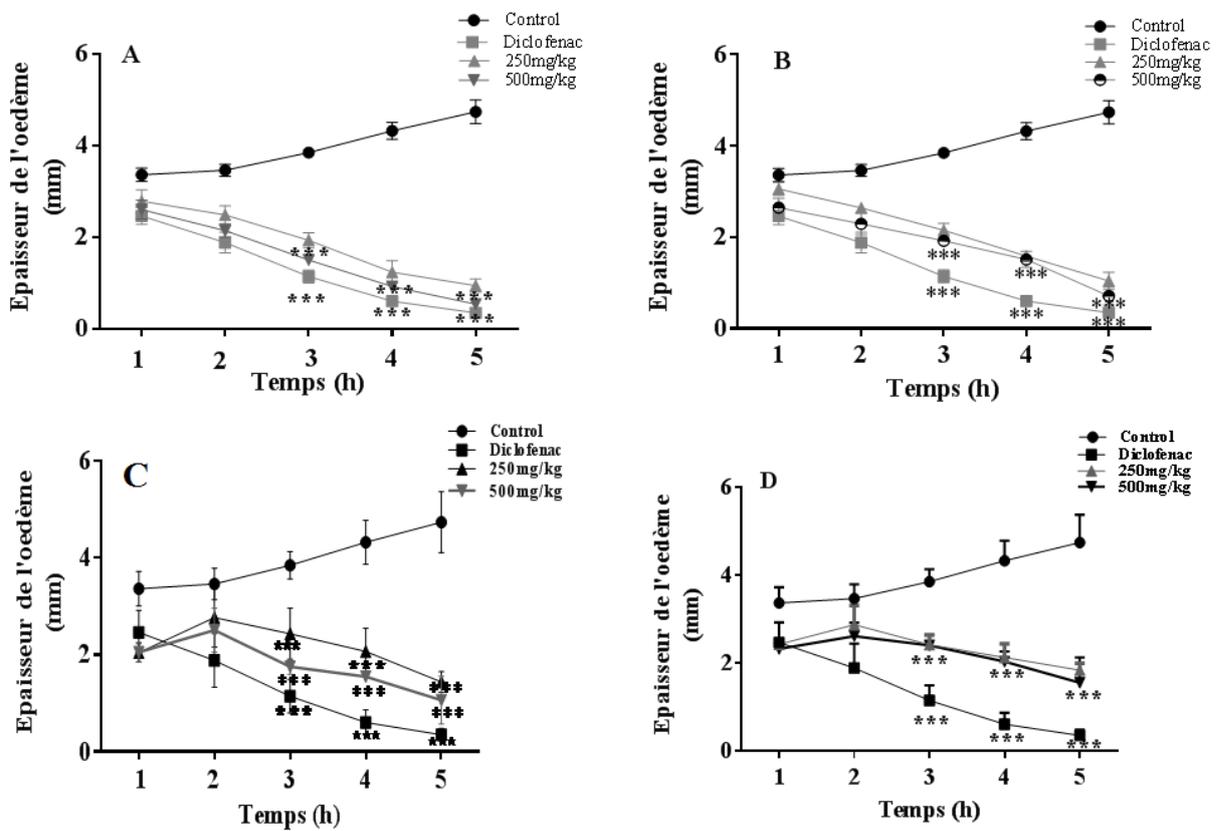


Figure 18. Evolution de l'inflammation (oedème plantaire) en fonction du temps pour les différents groupes : A : extrait aqueux de *S.alba* (SAQE) ; B : extrait méthanolique de *S.alba* (SAME) ; C : extrait aqueux de la partie aérienne d'*E.arvensis* (EAQE) ; D : extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E.arvensis*. (EAME). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (N= 6),*** p < 0,001.

5.3. Effets des extraits sur l'arthrite induite par la formaline

L'arthrite induite par le formaldéhyde est l'un des modèles les plus couramment utilisés pour évaluer l'activité antiarthritique (Shah *et al.*, 2016). L'injection sous-plantaire de 2,5 % de formaldéhyde au premier jour suivi par un rappel au 3ème jour a provoqué un gonflement de la patte de tous les rats. Ce gonflement des articulations s'est maintenu pendant tous les jours de la période d'observation (**Figure 19**).

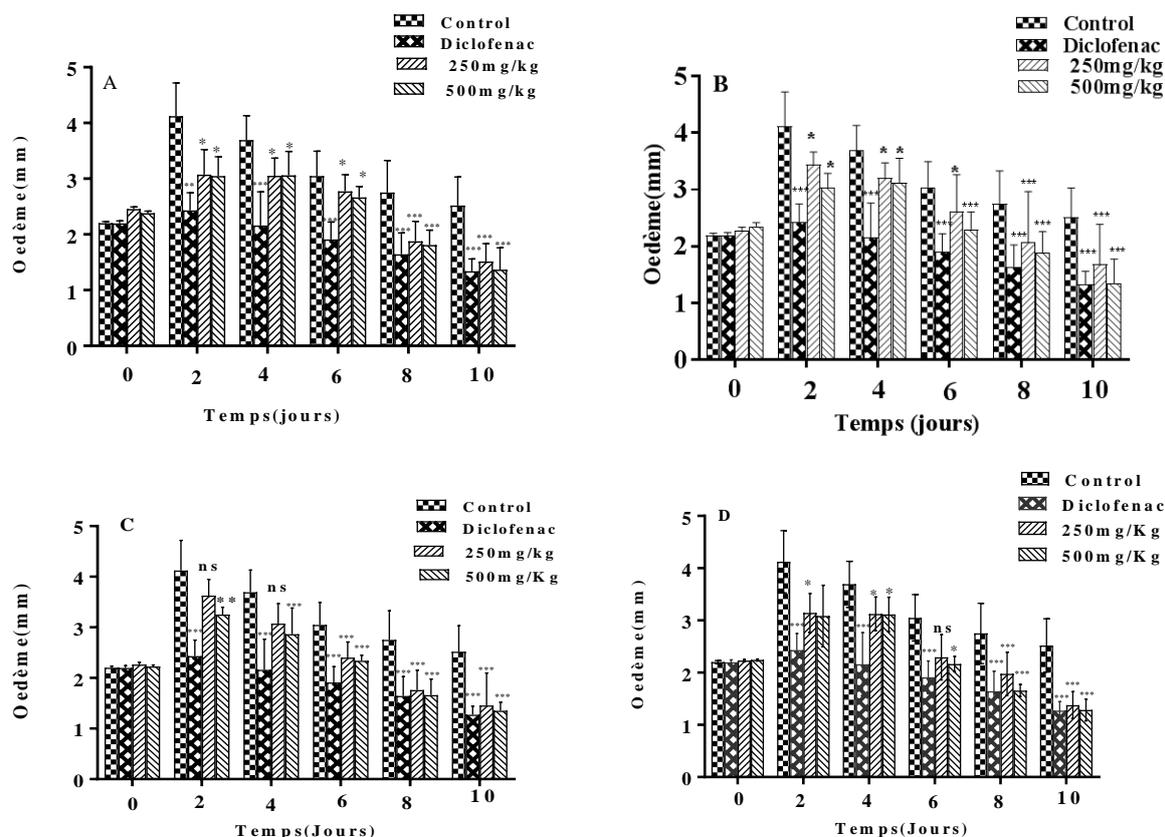


Figure 19. Effet anti-inflammatoire des extraits SAME (A), SAQE (B), EAME(C), EAQE(D) sur l'évolution de l'œdème de la patte induit par la formaline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 6), ns: non significatif, * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Les résultats obtenus montrent que le gonflement de la patte droite du groupe non traité, apparu après un jour de l'induction de l'œdème est caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de la patte de $4,12 \pm 0,243$ mm. Les symptômes de l'inflammation (une rougeur et un gonflement de la patte) étaient moins marqués dans le cas des groupes traités par SAME, SAQE, EAME, EAQE. L'effet inhibiteur maximal produit par les extraits méthanolique et

aqueux d'*Equisetum arvense* à 500 mg/kg était de $46,42 \pm 2,99\%$ et $48,96 \pm 3,68\%$, respectivement. En effet, l'administration orale de l'extrait méthanolique et aqueux de *Salix alba* a réduit l'œdème plantaire avec un pourcentage d'inhibition de $45,63 \pm 8,45$ et $46,16 \pm 6,83$, respectivement.

L'augmentation du diamètre des articulations des groupes traités au Diclofénac a été significativement réduite tout au long de la période d'observation ($p < 0,001$). La différence de l'épaisseur un jour après l'induction de l'inflammation est de $2,43 \pm 0,13$ mm. Les épaisseurs de la patte enflammée aux jours 2, 4, 6, 8 et 10 et au cours de la période d'expérience ont montré qu'après l'injection de la formaline une diminution de l'œdème est observée dans tous les groupes même en absence de tout traitement. L'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes dépend essentiellement de leur composition phytochimique, l'acide caféique, la catéchine et l'acide férulique (Da Cunha *et al*, 2004 ; Johansson *et al*, 2019).

6. Effets immunomodulateurs *in vivo*

La thérapie immunomodulatrice d'origine végétale représente un domaine important dans le traitement des maladies infectieuses (Nicoara and Crisan, 2003). De nombreux produits végétaux naturels et composés synthétiques ont été évalués pour leur potentiel à moduler les réponses immunitaires (Patwardhan & Manish, 2005). Dans la présente étude, l'activité immunomodulatrice des extraits de *S. alba* et *E. arvense* a été explorée (**Figure 20**). Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique de *S. alba* et l'extraits aqueux d'*E. arvense* augmentent significativement le titre des anticorps chez les souris traitées avec 500 mg/ml de SAME ($868 p < 0.01$) et 500 mg/ml de EAQE ($512 p < 0.001$), respectivement en comparaison avec le titre du groupe contrôle non traité 89,6).

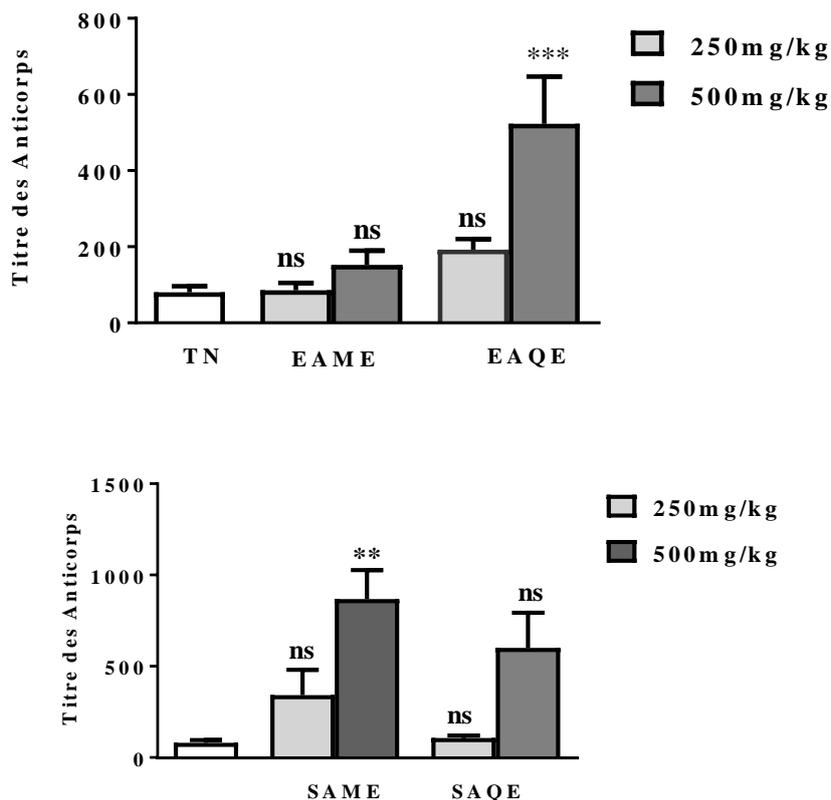


Figure 20 : Effet des extraits sur le titre des anticorps chez les souris. SAME : extrait méthanolique de *S. alba*, SAQE ; extrait aqueux de *S. alba*, EAME ; extrait méthanolique d'*E. arvense*, EAQE ; extrait aqueux d'*E. arvense*, TN ; Temoin non traité ; Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 6). ns : non significatif, *** p < 0,001. ** p < 0,01.

Cette étude a porté sur l'évaluation de deux modes d'extractions, aqueux et methanolic, dans le but de démontrer l'efficacité optimale de ces extraits sur le plan immunitaire. Nous avons noté un effet immunostimulateur dose dépendant. Les valeurs élevées du titre d'anticorps hémagglutinants obtenu par les différents extraits de la plante ont indiqué que l'immunostimulation a été obtenue par immunité humorale. Dans ce système, lorsque les lymphocytes B se lient à l'antigène étranger, ils se multiplient par mitose, puis se transforment et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps. Ces anticorps sont impliqués dans les mécanismes d'élimination de l'antigène à savoir l'activation du complément, l'opsonisation, la neutralisation des toxines, etc. (Miller *et al.*, 1991). L'augmentation remarquable dans le titre d'anticorps circulants anti-SRBC peut être expliquée par l'activation des macrophages, des lymphocytes T et/ou des lymphocytes B impliquées dans la synthèse d'anticorps (Benacerraf,

1978). Anarthe *et al.* (2014), ont démontré la capacité de l'extrait méthanolique de *Trigonella foenum graecum* à produire d'anticorps hémagglutinants contre le SRBC. Ils ont indiqué que l'immunostimulation a été obtenue par immunité humorale. Par conséquent, les agents immunomodulateurs d'origine végétale renforcent la réactivité immunitaire de l'organisme contre pathogène en activant le système immunitaire (Vaghasiya *et al.*, 2010).

Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse

Une enquête ethnobotanique réalisée auprès des herboristes et des tradipraticiens a permis d'inventorier les plantes médicinales utilisées dans les remèdes anti-inflammatoires dans la région de Sétif.

Notre recherche a abouti au choix des deux plantes *Salix alba* et *Equisetum arvense* pour la réalisation de cette étude. Ce travail rentre dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel de la région de Setif. Après extraction, l'analyse quantitative et qualitative des composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique est effectuée. Les activités antioxydante, anti-inflammatoire et immunomodulatrices sont évaluées.

Notre étude a montré que le rendement des extractions peut être influencé par plusieurs facteurs notamment la méthode d'extraction, la nature et les caractéristiques physicochimiques des solvants utilisés et plus particulièrement leur polarité.

Le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes contenus dans les extraits préparés à base de cette plante a permis de mettre en évidence sa richesse en ces métabolites secondaires. L'investigation phytochimique a mis la lumière sur la nature de ces composés bioactifs.

On distingue ainsi la présence d'un profil chimique composé de plusieurs polyphénols incluant des acides phénoliques et des flavonoïdes appartenant à différentes classes.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in-vitro* des extraits SAME, SAQE, EAME, EAQE a été effectuée par la combinaison de quatre différentes méthodes afin de déterminer les différents mécanismes par lesquels les extraits exercent leur effet antioxydant. Au regard de ce qui précède, nous concluons que les deux plantes possèdent un véritable potentiel antioxydant et constituent une source prometteuse d'antioxydants naturels.

L'étude de la toxicité aiguë des extraits des deux plantes fournit des informations pertinentes sur l'administration orale aiguë. La prise aiguë des extraits des deux plantes aux doses de 2000 et 5000 mg/kg a permis de conclure que les extraits méthanoliques et aqueux d'*Equisetum arvense* et l'extrait aqueux de *Salix alba* ne sont pas toxiques alors que la prise de 5000 mg/kg de l'extrait méthanolique de *salix alba* peut être classée dans la catégorie des plantes faiblement toxiques par voie orale qui se déduit par la présence de mortalité des animaux d'expérimentation.

L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été examinée sur différents modèles. L'inhibition du développement de l'oedème de l'oreille induit par le xylene a montré que les extraits administrés par voie orale de 500 mg/kg de SAME, SAQE, EAME et EAQE ont montré une inhibition significative. Cet effet était d'ailleurs confirmé sur le modèle de l'oedème de la patte induit par le carraghénane avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 87.56, 88.62, 77.48 et 67.31 de SAQE, SAME, EAME et EAQE, respectivement. De plus, les extraits de *S. alba* et *E. arvense* ont montré un effet antiarthritique non négligeable dans l'étude *in vivo* chez les rats avec arthrite expérimentale induite par le formaldéhyde.

Une activité immunomodulatrice considérable sur la production des anticorps était observée chez les souris traitées avec 500 mg/mL où SAME a donné un effet meilleur ($p < 0.01$).

Les résultats de la présente étude supportent l'usage traditionnel des deux plantes étudiées dans la prise en charge de diverses pathologies surtout d'origine inflammatoire.

Compte tenu de ce qui précède, d'autres expérimentations doivent être entreprises afin de compléter et d'exploiter au maximum le potentiel thérapeutique de ces deux plantes. Ainsi il s'inscrit dans nos perspectives de recherche de :

- Evaluer la toxicité subaiguë et chronique afin de clarifier le mécanisme d'action des extraits.
- Mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, et étudier les mécanismes d'action sur les médiateurs inflammatoires, les enzymes impliquées dans la production des ROS et sur les systèmes antioxydants *in vivo*.
- Evaluer l'activité antiarthritique sur d'autres modèles qui simulent l'arthrite rhumatoïde humaine comme l'arthrite induite par le collagène type II qui serait d'une grande importance.
- Explorer le mécanisme par lequel les extraits des plantes induisent l'immunomodulation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Agnolet S, Weise S, Verpoorte R, Staerk D. 2012. Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technologyplatform: combined use of metabolomics, high-performanceliquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magneticresonance spectroscopy and high-resolution radical scavengingassay. *Journal of Chromatographie A* 1262: 130–137.
- Aichour R, Benzidane N, Arrar L, Charef N, Baghiani A, (2018). Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of Algerian *Capparis spinosa*. L. *Annual of Research & Review in Biology*, 25(3): 1-12.
- Aichour R, Charef N, Baghiani A, Arrar L, (2016). Immunomodulatory effects of Algerian caper. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2): 51-54.
- Akindele AJ, Adeyemi O.O, (2007). Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78:25-28.
- Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Emanuela Camilli, Stefania Marconi, Paolo Gabrielli, Silvia Lisciani, Loretta Gambelli, Altero Aguzzi, Ettore Novellino, Antonello Santini, Aida Turrini and Luisa Marletta, (2018). Dietary Lignans: Definition, Description and Research. *Trends in Databases Development Molecules*; 23(12): 3251.
- Al-Snafi AE. (2017). The pharmacology of *Equisetum arvense*- A review, *IOSR Journal of pharmacy*;7(2) Version 1: 31-42.
- Alugoju Phaniendra, Dinesh Babu Jestadi, and Latha Periyasamy (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1): 11–26.
- Amraoui N, Mayouf N, Charef N, Baghiani A, Arrar L (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritic activities of methanol extract of *Tamus communis* L. roots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(7):1499-1506.
- Anarthe SJ, Sunitha D, Sandhya R, Raju GM, (2014). Immunomodulatory Activity for Methanolic Extract of *Trigonella foenum graecum* Whole Plant in Wistar Albino Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(9): 1081-1092.
- Antony S, Kuttan R, Kuttan G, (1999). Immunomodulatory activity of *curcumin*. *Immunology Investigations*, 28:291-303.
- Arrar L, Benzidane N, Krache I, Charef N, Khennouf S, Baghiani A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharmacognosy Communications*, 3: 70-74.
- Ates B, Abraham L, Ercal N, (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetyl cysteineamide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radical Research*, 42: 372-377.
- Azwanida NN, (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal Aromatic Plants*, 4: 1-6.
- Baghiani A, Djarmouni M, Boumerfeg S, Trabsa H, Charef N, Khennouf S, Arrar L. (2012). Xanthine oxidase inhibition and antioxidant effects of *Peaganum harmala* seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, 2: 42-56.

- Balaban S, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, 120: 483-495.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Bardaa S, Turki M, Ben Khedir S, Mzid M, Rebai T, Ayadi F, Sahnoun Z. (2020). The Effect of Prickly Pear, Pumpkin, and Linseed Oils on Biological Mediators of Acute Inflammation and Oxidative Stress Markers. *Biomedical Research International*, 5643465: 1-11.
- Barriada-Bernala L.G, Almaraz-Abarcaa N, Delgado-Alvaradoa E.A, Gallardo-Velázquezb T, Ávila-Reyesa J.A, Torres-Moranc M.I, González-Elizondoa M.D.S and Herrera-Arrietaa Y, (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae) . *CYTA – Journal of Food*, 12 (2): 105–114.
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ, (1991). Oxidants and anti-oxidants: State of the art. *American Journal of Medicine*, 91: 2S–13S.
- Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Revue d'histoire de la Pharmacies*, 320: 465-466
- Benacerraf B. (1978). A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 120: 1809-12.
- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82:390-393.
- Bidaut-Russell M, (2001). Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15:739-753.
- Bonaterrea GA, Heinrich E. U, Kelber O, Weiser D, Metz, J, Kinscherf R. (2010). Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*, 17(14): 1106–1113.
- Bony E. (2010). Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*astrocaryum vulgare m.*). Thèse de doctorat, Université Montpellier 2, Sciences et Techniques du Languedoc, France, 236 p.
- Borregaard N. (1997). Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci*. 832: 62-68.
- Bouaziz A, Khennouf S, Abuzarga HM, Abdalla S, Baghiani A, Charef N. (2015). Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis L.* growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5: 19-28.
- Bouden I, Aimene W, Elder R, Arrar L. (2017). *In vitro* and *in vivo* anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Matricaria pubescens* (Desf.). *Advances in Environmental Biology*, 11(11): 11-19.
- Boussoualim N, Krache I, Baghiani A, Trabsa H, Aouachria S, Arrar L. (2016). Human xanthine oxidase inhibitory effect, antioxidant *in vivo* of Algerian extracts (*Globularia alypum L.*). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(4):645-650.

- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (2011). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th Ed. McGraw-Hill Medical, p 2084.
- Buodonpri W, Wichitnithad W, Rojsitthisak P, Towiwat P. (2009). Synthetic curcumin inhibits carrageenan-induced paw edema in rats. *Journal of Health Research*, 23:11-16.
- Catelan S.C, Belentani R.M, Marques L.C, Silva E.R, Silva M.A, Caparroz-Assef S.M, Cuman R.K.N, Bersani-Amado C.A. (2006). The role of adrenal corticosteroids in the anti-inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats. *Phytomedicine*, 13: 446-451.
- Cetkovic G, Canadanovic-Brunet J, Djilas S, Savatovic S, Mandic A, Tumbas V. (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109(2):340-347.
- Cetojevic-Simin DD, Canadanovic-Brunet JM, Bogdanovic GM, Djilas SM, Cetkovic GS, Tumbas VT and Stojiljkovic BT, (2010). Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *J Med Food*; 13(2): 452-459.
- Chanda S, Dave R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: *An overview in African Journal of Microbiology Research*, 3(13) : 981-996.
- Chang J, Xuan L, Xu Y. (2001). Three new phenolic glycosides from fertile sprout of *Equisetum arvense*. *Zhiwu Xuebao*, 43(2): 193-197.
- Chauhan P, Singh S, Gupta Y.K, Kumar U. (2018). Evaluation of toxicity studies and anti-inflammatory activity of *Terminalia Bellerica* in carrageenan-induced paw edema in experimental rats. *J Nat Sc Biol Med*, 9 (2): 169-174.
- Chavan M.J., Wakte P.S., Shinde D.B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17 (2): 149–151.
- Choi S, Chung M-H. (2003). A review of the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Semin. Integrative. Med*, 1: 53-62.
- Choy EH, Panayi GS. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med*, 344: 907-916.
- Cortex salicis. In: W.H.O. (2009). Monographs on selected medicinal plants. Geneva, World Health Organisation, 456p, Vol. 4: 309 – 322
- Cosmin POP, Dan VODNAR, FloricuŃa RANGA, Carmen SOCACIU. (2013). Comparative Antibacterial Activity of Different Plant Extracts in Relation to their Bioactive Molecules, as Determined by LC-MS Analysis. *Animal Science and Biotechnologies*, 70(1): 86-94.
- Cruz-Topete D and Cidlowski J.A. (2015). One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22 (1-2) : 20-32.
- D'Agostino M, Dini A, Pizza C, Senatore F, Aquino R. (1984). Sterols from *Equisetum arvense*. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 60(12):2241–5
- Da Cunha F.M, Duma D, Assreuy J, Buzzi F.C, Niero R, Campos M.M, Calixto J.B. (2004). Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Properties. *Free Radical Research*, 38(11):1241–1253.
- Das, K, Tiwari R.K.S, Shrivastava D.K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2) : 104-111.

- Daum-Badouard C. (2006). Les lésions d'acides nucléiques : détection par HPLC-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat. Grenoble. Université Joseph-Fourier.
- Davoine F and Lacy P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity*, 5(570): 1-17.
- De Franco AL, Robertson M, Locksley RM. (2009). Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Bruxelles : De Boeck, p 83-85.
- De Melo J.G, Santos A.G, De Amorim E.L.C, Do Nascimento S.C, De Albuquerque U.P. (2011). Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-based Complement. *Altern. Med*, 365359: 1-4.
- Densiov E.T, Afanas'ev I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds, *Taylor & Francis Group(U.S.A)*, pp: 703-861.
- Diallo Ibrahima. (2020). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires des sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier, 44p.
- Diegelman, R.F, Evans, M.C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed. *Frontiers in Bioscience*, 9:283-289.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med*, 32: 1102–1115.
- Dorward DA, Lucas CD, Rossi AG, Haslett C, Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*, 135: 182-199.
- Droge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82(1): 47-95.
- Drossaers-Bakker KW, de Buck M, van Zeben D, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JMW. (1999). Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis. The effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis and Rheumatism*, 42: 1854–60.
- Důračková Z. (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. *In: Mitochondrial medicine. Springer Science and Business Media*, pp; 19-54.
- Ebrahimzadeh M.A, Nabavi S.M, Nabavi S.F, Eslami B. and Rahmani Z. (2010). Antioxidant and Antihaemolytic Activities of the Leaves of *Keiske cumin* (*Laser trilobum* L) Umbelliferae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9(5): 441-449
- Epoh N.J, Matafack-Dongmo O.L, Tadjoua H.T, Mbiapo Tchouanguép F, Telefo P.B. (2019). Evaluation of Acute and Sub-acute Toxicity of the Aqueous Extract from the Fruit of *Solanum indicum* Linn. (*Solanaceae*) in Rats. *EJMP*, 30(3): 1-16.
- European Commission. (2008). Vaccines for human's research funded by the European Union.
- Evans WJ. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 647-652.

- Fariba Sharififar, Shirin Pournourmohammadi & Moslem Arabnejad. (2009). Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Achillea wilhelmsii* C. Koch in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 668-671
- Fauve R.M, Hevin M. (1998). Reaction inflammatoire et reactions immunitaires. In: *Inflammation*, Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France), pp:10-19.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual Chim*, 11(12): 108-115.
- Fiedor J. and Burda K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6:466-488.
- Gagnier J.J., Van Tulder M.W., Berman B., Bombardier C. (2007). Herbal medicine for low back pain: a Cochrane review. *Spine*, 32(1): 82 – 92.
- Gligorić Emilia, Igić Ružica, Suvajdžić Ljiljana and Grujić-Letić Nevena. (2019). Species of the Genus *Salix* L: Biochemical Screening and Molecular Docking Approach to Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. *Appl. Sci.*, 9(1842): 2-14.
- Goto S, Radak Z. (2013). Implication of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *J. sport health Sci*, 2: 75-80.
- Grant R. Drummond, Stavros Selemidis, Kathy K. Griendling, and Christopher G. Sobey. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6): 453–471.
- Gu, X, & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14: 1-21
- Guarrera P.M. and Leporatti M.L. (2007) Ethnobotanical remarks on central and southern Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 23.
- Guerin M. (2020). Risque de complications infectieuses suite à l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens à visée antalgique et/ou antipyrétique: état des lieux et rôle du pharmacien d'officine. Université de Nantes. pp:17.
- Gulcin I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3): 345-391.
- Gupta B, Ghosh B. (1999). Curcuma longa inhibits TNF- α induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Immunopharmacology*, 21:745-757.
- Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture. How should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142: 31-2.
- Halliwell B. (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Nature Encyclopedia of life sciences*: 1–7.
- Hameister R, Kaur C, Dheen S. T, Lohmann C. H, Singh G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials*, 108(5): 2073–2087.
- Hammoudi R, Dehak K, Tlili M.L, Khenfer S, Medjouel M. and Hadj Mahammed M. (2017). Biological activities of phenolic extracts of a medicinal plant, endemic to the Algerian Sahara: *Salvia chudaei* Batt. and Trab. *Int. J. Biosci*, 11: 108-115.

- Harrison D, Griendling K K, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 91: 7-11.
- Hassane M, Mohammed EH, Abdelkhaleq L, Mohammed B, Mohammed A, Fouad A, Adnane R, Abderrahim Z. (2004). Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 94:317-322.
- Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapeutics*, 96 : 67– 202.
- Henzen C. (2003). Traitement aux gluco-corticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum Medical Suisse*, 3(9) : 442-446.
- Hiraiwa K. and van Eeden S.F. (2013). Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm*, 619523: 1-10.
- Hirasa K, Takemasa M. (1998). Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- Hoffman Martins Do Monte F, Guilherme dos Santos J. Jr, Russi M, Nascimento Bispo Lanziotti V.M, Almeida Moreira Leal, L.K.M. & de Andrade Cunha G.M. (2004). Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological Research*, 49: 239–243.
- Hörl W.H. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. *Pharmaceuticals*, 3(7) : 2291-321.
- Hostanska K. G. Jurgenliemk A. Nahrstedt G. Abel and R. Saller. (2007). Willow bark extract (BNO1455) and its fractions promote apoptosis in human lung cancer cells irrespective their basal level of COX-2, p53 and Bcl-2 genes.
- Houston-Durrant T, de Rigo D, Caudullo G. (2016). *Salix Alba* in Europe: distribution, habitat, usage and threats 168. *European Atlas of Forest Tree Species*
- Huh M. K. and Han M. D. (2015). Inhibitory effect of hyaluronidase and DPPH radical scavenging activity using extraction of *Equisetum Arvens*. *European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences*, 3 (2): 2056-5984.
- Hultén E; Fries M. (1986). Atlas of North European vascular plants: north of the Tropic of Cancer. Königstein, Federal Republic of Germany: Koeltz Scientific Books.
- Hurtado-Nedeleca M, Dang PMC, Monteiro RC, El Bennab J, Gougerot-Pocidaloa MA. (2014). Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. *R F L*, 462: 25-38.
- Hyuncheol Oha, Do-Hoon Kimb, Jung-Hee Chob, Youn-Chul Kimc. (2004). Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95 : 421– 424
- Ignat I, Volf I. and Popa I.V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food. Chem*, 126: 1821-1835.
- Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, (2013): 1-14.
- Iserin P. (2001). Encyclopedie des plantes medicinales. Paris-France: Larousse Bordas, 14.
- Islam NU, Jalil K, Shahid M, Rauf A, Muhammad N, Khan J, Shah MR, Khan MA. (2019). Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. *Arabian J Chem*, 12 : 2914.
- Jack, D.B. (1997). One hundred years of aspirin. *Lancet* 350: 437–439.

- Jadid N, Kurniawan E, Himayani CES, Andriyani, Prasetyowati I, Purwani KI, *et al.* (2020). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the Tengger tribe in Ngadisari village, Indonesia. *Plos One*, 15(7): e0235886.
- Jassem G.Mahdi. (2010). Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14(3):317-322.
- Jayathirtha MG, Mishra SH. (2004). Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta Alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, 11: 361-365.
- Johansson E, Lange S, Oshalim M, Lönnroth I. (2019). Anti-Inflammatory Substances in Wheat Malt Inducing Antisecretory Factor. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(4):489–494.
- Jones W.P, Kinghorn A.D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S. D, Latif Z. and Gray A. I. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), 323-411.
- Juyal P.D, Singla L.D. (2001). Herbal immunomodulatory and therapeutic approaches to control parasitic infections in livestock. India: Department of Veterinary Parasitology. College of Veterinary Science. Punjab Agricultural University, pp 1-8.
- Kammerer B., Kahlich R., Gleiter C.H., Heide L. (2005). HPLC-MS / MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem. Analysis*, 16(6): 470 - 478
- Kamtchueng Monique Odette, Mouokeu Raymond Simplicie, Tume Christopher, Djafoua Yves Marcel, Kuate Jules-Roger. (2013). Evaluation of the immune-modulatory activity of the methanol extract of *Alchemilla kiwuensis* engl. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 4(5): 349-355.
- Karthikeyan, J, Reka, V, & Giftson, R. V. (2012). Characterization of bioactive compounds in *Costus speciosus* (Koen) by reverse phase HPLC. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(5): 1461.
- Kassaw C, Wabe NT. (2012). Pregnant Women and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Knowledge, Perception and Drug Consumption Pattern during Pregnancy in Ethiopia. *North Am. J. Med. Sci.*, 4(2):72-6.
- King A, Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99:213-218.
- Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baricevic D and Kusar A. (2010). Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 53: 773-776.
- Knowlton A. (2012). *Equisetum*. *Current Biology*, 22(10): 388–390.
- Kodithuwakku N.D, Pan M, Zhu Y.L, Zhang Y.Y, Feng Y.D, Fang W.R, Li Y. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Chinese medicine SQ gout capsules and its modulation of pro-inflammatory cytokines focusing on gout arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3):1071–1079.
- Kohen R, Nyska A. (2002). Invited review Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol*, 30(6):620–650.
- Kompantsev, V.A., Gaidash, P.M., and Dauksha, A.D. (1974). Phenolic compounds of the bark of *Salix Alba babylonica*. *Chem. Nat. Compd*, 10: 839–839.

- Koster R, Anderson M, De Beer J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federal Proceeding*, 8:412–417.
- Kou J, Ni Y, Li N, Wang J, Liu L, Jiang ZH. (2005). Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Total Extract and Individual Fractions of Chinese Medicinal Ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biol. Pharm. Bull*, 28(1):176-180.
- Kovacic P & Jacintho J. D. (2001). Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Med. Chem*, 8: 773–796.
- Krache I, Boussoulim N, Trabsa H, Ouhida S, Baghiani A, Arrar L. (2018). Antioxidant, Antihemolytic, Antihyperuricemic, Antiinflammatory Activity of Algerian Germander Methanolic Extract. *Annual Research & Review in Biology*, 23(5): 1-14.
- Krakowski I. et al. (2003). Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the use of analgesia for the treatment of nociceptive pain in adults with cancer (update 2002). *Br. J. Cancer*, 89:67–72.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. and Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244-249.
- Kumar N, & Goel N. (2019). *Phenolic acids*: Natural versatile molecules with promising therapeutic. *Biotechnology Reports*, 24:1-10.
- Kumar P, Banik S. (2013). Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 6:35-43.
- Kumar Sunil, Sharma Gaurav, Kuma Amit. (2017). Immunomodulatory Activity of Bioactive Fraction (PBC) from *Phyllostachys bambusoides*. *Pharmacogn J*, 9(6): 786-791
- Kumar T, Jain V. (2014). Antinociceptive and anti-Inflammatory activities of *Brideliaretusa* methanolic fruit extract in experimental animals. *Sci World J*. Article ID 890151, 12 p.
- Laroche F. (2014). Douleur chronique. Thérapies comportementales et cognitives. *Annales Médico-Psychologiques*, 172 : 132-135.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53: 597-652.
- Lee H.N, Surh Y. J. (2012). Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol*, 84: 1340-1350.
- Lee J., Bae E.H., Ma S.K. and Kim S.W. (2016). Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases. *Chonnam Med J*, 52:81-90.
- Lévesque H, Lafont O. (2000). Aspirin throughout the ages: an historical review. L'aspirine à travers les siècles: rappel historique. *Rev. Med. Interne* 21 (Suppl. 1), 8s–17s.
- Lien Ai Pham-Huy, Hua He, and Chuong Pham-Huy. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.*, 4(2): 89–96.
- Lin JK, Weng MS. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In: *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, Springer, pp: 217.
- Lorrain B, Ky I, Pechamat L & Teissedre P.L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18(1): 1076-1100.
- Losada-Barreiro S. and Bravo-Díaz C. (2017). Free radicals and polyphenols: the redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*, 133:379-402.
- Lu H.M, Liang Y.Z, Yi L.Z, Wu X.J. (2006). Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 245–249.

- Lucas S. (2016). The pharmacology of indomethacin. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 56(2): 436-446.
- Ma L, Cranney A, Holroyd-Leduc JM. 2009. Acute monoarthritis: what is the cause of my patient's painful swollen joint? *CMAJ*, 180 (1): 59-65.
- Madden K, Flowers L, Salani R, Horowitz I, Logan S, Kowalski K, Xie J, Mohammed S I. (2009). Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80: 9-18.
- Mahdi J., Mahdi A., Bowen I. (2006). The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif*, 39: 147-155.
- Malekzadeh N. (2017). Current treatment in rheumatoid arthritis: a review including nanotechnology and gene therapy. *Review in clinical medicine*, 4(2): 62-68.
- Markus-Michalczyk, H. (2020). The adaptive capacity of the willow (*Salix Alba L.*) to bridge the gap between MPAs and harbour entrances. *Marine Protected Areas*, 649–666.
- Martinez K. B, Mackert, J D., McIntosh M. K. (2017). Polyphenols and Intestinal Health. *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, 191–210.
- Martinez V., Mitjans M. and Vinardell M.P. (2014). Cytoprotective effects of polyphenols against oxidative damage. In Watson R.S., Preedy V.R. and Zibadi S. *Polyphenols in human health and disease*. First edition, Elsevier: Amsterdam. 275-288.
- Martinez-Cayuella M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77 :147-161.
- Mathy M, Sanchez C, Priem F, Henrotin Y. (2007). La curcumine inhibe la synthèse d'interleukine-6, d'interleukine-8, de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 par les chondrocytes bovins. *Revue du Rhumatisme*, 74 : 10-11.
- Mavar Mangaa H, Brkic D, Marie D. E. P and Quetin-Leclercq J. (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharm*, 92: 209–214.
- Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol*, 7(1): 62-66.
- Mayouf N, Charef N, Saoudi S, Baghiani A, Khennouf S, Arrar L. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Asphodelus microcarpus* methanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 239: 1-9.
- McCarver BM. (2001). Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 3(6): 269.
- Meek Inger L, Mart AFJ Van de Laar, Harald E Vonkeman. (2010). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. *Pharmaceuticals*, 3(7): 2146-62.
- Michael Breitenbach, Mark Rinnerthaler, Manuela Weber, Hannelore Breitenbach-Koller, Thomas Karl, Paul Cullen, Sukaniya Basu, Dana Haskova, and Jiri Hasek. (2018). The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells, 168(11): 286–299.
- Mikaeloff Y, Kezouh A, Suissa S. (2008). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of severe skin and soft tissue complications in patients with varicella or zoster

- disease. *Br J Clin Pharmacol*, 65(2):203-9.
- Miller L.E, Ludke H.R, Peacock J.E, Tomar R.H. (1991). Manual of Laboratory Immunology. Lea and Febiger, London. pp. 1-18.
- Miral Dizdaroglu, Pawel Jaruga, Mustafa Birincioglu and Henry Rodriguez. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11): 1102–1115.
- Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska A.M. and Zujko M.E. (2017). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*, 63: 68-78.
- Mohamed T. Khayyal, Mona A. El-Ghazaly, Dalal M. Abdallah, Samuel N. Okpanyi, Olaf Kelber, and Dieter Weiser. (2005). Mechanisms Involved in the Anti-inflammatory Effect of a Standardized Willow Bark Extract *Arzneim.-Forsch. Drug Res*, 55(11): 677–687.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 26(2): 211-219.
- Montastruc JL, Bondon-Guitton E, Abadie D, Lacroix I, Berreni A, Pugnet G, et al. (2016). Pharmacovigilance : risques et effets indésirables de l'automédication. *Thérapie*, 71(2): 249-55.
- Moore N, Pollack C, Butkerait P. (2015). Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Ther Clin Risk Manag*, 11:1061-75
- Moreno-Salazar S F, Robles-Zepeda R E, Johnson D E. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, 79: 132–141.
- Morris C.J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 225: 115–121.
- Nahrstedt, A., Schmidt, M., Jäggi, R., Metz, J., & Khayyal, M. T. (2007). Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13-14): 348 – 351
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity : challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6, 173-182
- Navdeep Singh Sandhu, Sarabjit Kaur, Divneet Chopra. (2010). Equisetum arvense: Pharmacology and Phytochemistry-A Review *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(3): 146-150; (Article 2)
- Navdeep Singh Sandhu, Sarabjit Kaur, Divneet Chopra. (2010). Pharmacognostic Evaluation of Equisetum arvense Linn. *International Journal of PharmTech Research* 2(2): 1460-1464; (Article 1)
- Neant R. (2017). Effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens et automédication : quel est l'impact dans le temps d'un outil d'information écrite sur les connaissances des patients ? Université de Bourgogne pp :21.
- Newman D.J, Cragg G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70: 461–477.
- Nicoara E, Crisan A. (2003). Possibilities to modulate the immune response during infections. *Timisoara Medical Journal*, 53(4): 303-307.

- Nordberg, J., & Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287–1312.
- OECD. (2008). Guidelines for the testing of chemicals. Acute Oral. *Toxic. Proceed*, 425-427.
- Oh H, Kim DH, Cho JH, Kim YC. (2004). Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol*, 95: 421-424.
- Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Bitzer-Quintero O.K., Ramírez-Anguiano A.C., Flores-Alvarado L.J., Ramírez-Ramírez V., Macias-Islas M.A. and Torres-Sánchez E.D. (2013). Immunology and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis *Clinical and Developmental Immunology*, 1-14
- Ozenda P. (1991). *Flore et végétation du Sahara*. Third Ed. CNRS. Paris. 626 p.
- Pastre J, Priymenko N. (2007). Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158(4) : 180-189.
- Patwardhan B, Gautam M. (2005). Botanical immunodrugs: Scope and opportunities. *Drug Discovery Today*, 10: 495–502.
- Payne D N R, Adcock I M. (2001). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2: 145–150.
- Pereira RLC, Ibrahim T, Luchetti L, Da Silva AJR, De Moraes VL. (1999). Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa*. Mc Carver, *Immuno-pharmacology*, 43: 31-37.
- Pham-Huy LA, Hua He, Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 4(2): 89–96.
- Piątczak Ewelina, Dybowska Monika, Płuciennik Elżbieta, Kośła Katarzyna, Kolniak-Ostek Joanna and Kalinowska-Lis Urszula. (2020). Identification and Accumulation of Phenolic Compounds in the Leaves and Bark of *Salix Alba* (L.) and Their Biological Potential. *Biomolecules*, 10(10): 1391.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*, 63: 1035-1042.
- Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. (2018). Partners in crime : neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 551–565.
- Radner, H., Ramiro, S., Buchbinder, R., Landewé, R. B., van der Heijde, D., & Aletaha, D. (2012). Pain management for inflammatory arthritis (rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and other spondyloarthritis) and gastrointestinal or liver comorbidity. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (1-42), Issue 1.
- Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. (2006). Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy Res*, 20(1): 85-88.
- Radulović Niko, Stojanović Gordana and Palić Radosav. (2006). Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 20(1): 85–88.
- Raedschelders K, Ansley D.M, Chen D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133: 230-255.

- Rajendra Gyawali, Prapanna Bhattarai, Subodh Dhakal, Brajesh Jha, Sanjeev Sharma Kattel, Prashamsa Koirala, Ashana Regmi, Sri Krishna Joshi, Tirthamaiya Shrestha, Prem Narayan Poudel. (2013). Analgesic and Anti-inflammatory Properties of *Salix Alba* Linn and *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(5): 873 - 877
- Ramesh T, Lee K, Lee H.W, Kim S. J. (2007). Acute Oral Toxicity Study of Asia sari radix Extract in Mice. *International Journal of Toxicology*, 26(3): 247–251.
- Rang H.P, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. (2012). Pharmacology. 7th Ed. Edinburgh. Churchill Livingstone. pp. 503-511.
- Rankin JA. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical*, 15: 3-17.
- Rezaie A, Ahmadizadeh C, Mosavi G, Nazeri M, Jafari B, Ebadi R. (2011). Comparative Study of Sedative, Pre-Anesthetic and Anti-Anxiety Effect of Equisetum arvense (horse's Tail) Extract with Diazepam on Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(10): 786-789.
- Richardson J. D, Vasko M. R. (2003) .Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation Perspectives in Pharmacology, 3(302): 839–845.
- Riddle JM. (1999). Historical Data as an Aid in Pharmaceutical Prospecting and Drug Safety Determination. *J. Altern. Complement. Med*, 5: 195–201.
- Rossiter D. (2012). South African medicines formulary (SAMF). 10th Ed. Health and Medical Publishing Group. Cape Town. pp. 389-395.
- Rotelli A.E, Guardia T, Juarez A.O, De la Rocha N.E, Pelzer L.E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 48:601-606.
- Russell R. (2001). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal damage problem and solutions. *Postgrad Med J*. Feb, 77(904): 82-8.
- Sadeghi H, Hajhashemi V, Minaiyan M, Movahedian A, Talebi A. (2013). Further studies on anti-inflammatory activity of maprotiline in carrageenan-induced paw edema in rat. *Int. Immunopharmacol.*, 15(3): 505–510.
- Sagrawat H, Khan Y. (2007). Immunomodulatory Plants: A Phyto-pharmacological Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 248-260.
- Seidel V. (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S, D, Latif Z, Gray A, I. Eds. *Humana Press (Totowa)*, 27-37.
- Selma M.V., Espín J.C. and Tomás-Barberán F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem*, 57:6485-6501.
- Sereme A, Millogo-Rasolodimby J, Guinko S, Nacro M. (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des Sciences*, 10 (2): 24-32.
- Setty A R, Sigal L H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34(6): 773-784.
- Shah S.K, Rao N.J, Patel T.H, Patel B.V. (2016). Antiarthritic Activity of Whole Plant Extract of *Pentatropis capensis* on Wistar Rats. *Austin Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 4(2):2-6.
- Shahbazi S, Bolhassani A. (2016). Immunostimulants: Types and Functions. *Journal of Medical Microbiology and Infection Diseases*, 4 (3-4): 45-51.

- Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., Aslam, Pinelli E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev Environ Contam Toxicol*, 232:1-44.
- Shahidi F, Yeo J. D. (2018). Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6):2-16.
- Shaikh RU, Pund M, Gacche RN. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected Medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4): 355-361.
- Shley T.N., Weil Z.M. and Nelson R.J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review*, 43: 385-406.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I. (2005). Vitamin E, Oxidative Stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25: 151-175.
- Sinha NS. (2012). In vitro antibacterial activity of ethanolic extract of *Equisetum arvense* L. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 3(1): 19121.
- Smaga I., Niedzielska E., Gawlik M., Moniczewski A., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Reports*, 67: 569-580.
- Smirnoff N, Cumbes Q.J, (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060.
- Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4:18001.
- Sola-Rabada A, Rinck J, Belton DJ, Powell AK and Perry CC. (2016). Isolation of a wide range of minerals from a thermally treated plant: *Equisetum arvense*, a Mare's tale. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(1): 101–112.
- Soleimani S, Azarbaizani FF, Nejati V. (2007). The effect of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) in histological changes of pancreatic β -cells in streptozotocin induced Diabetic in rats. *Pak J of Biol Sci*, 10(23): 4236-4240.
- Stadtman E.R. (2001). Protein oxidation in aging and age-related dis-eases. *Ann. New York Acad. Sci*, 928: 22–38.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Review. J. Sep. Sci*, 30: 3268 – 3295
- Sungbin Im, Tae Gyu Nam, Sang Gil Lee, Young Jun Kim, Ock Kyoung Chun, and Dae-Ok Kim. (2014). Additive Antioxidant Capacity of Vitamin C and Tocopherols in Combination Food Sci. Biotechnol. 23(3): 693-699
- Takebayashi J, Chen J. and Tai A. (2010). A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *In: Armstrong D. Advanced protocols in oxidative stress ii, methods in molecular biology*, 594: 287-296.
- Takeshi Nagai, Takao Myoda, Toshio Nagashima. (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry*, 91 : 389–394.
- Trabsa H, Boumerfeg S, Baghiani A, Boussoualim N, Krache I, Khennouf S, Arrar L. (2014). Anti-Haemolytic, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory effect of Sedumsedi

- forme shoot extracts. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*, 47: 1502-1510.
- Vaghasiya J, Datani M, Nandkumar K, Malaviya S, Jivani N. (2010). Comparative evaluation of alcoholic and aqueous extracts of *ocimum sanctum* for immunomodulatory activity. *International Journal on Pharmaceutical and Biological Research*, 1:25-29.
- Vahalia M. K, Thakur K. S, Nadkarni S, Sangle V. D. (2011). Chronic toxicity study for tamrabhasma (a generic ayurvedic mineral formulation) in laboratory animals. *Recent Research in Science and Technology*, 3(11): 76–79.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MT, Mazura M, Telser J. (2007). Review Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44–84
- Valko M, Rhodes C. J, Moncol J, Izakovic M. and Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1):1-40.
- Vaškova J, Vaško L and Kron I. (2012). Oxidative processes and anti-oxidative metalloenzymes. In El-Missiry M.A. Antioxidant enzyme. First edition, In Tech Croatia: 19-58.
- Veit M, Strack D, Czygan FC, Wray V, Witt L. (1991). Di-*E*-caffeoyl-*meso*-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. *Phytochem*, 30(2): 527-529.
- Vinod Prabhu V and Guruvayoorappan C. (2012). Evaluation of immunostimulant activity and chemoprotective effect of mangrove *Rhizophora apiculata* against cyclophosphamide induced toxicity in BALB/c mice. *Immuno-pharmacology and Immuno-toxicology*, 34(4): 608–615.
- Vircheva S, Nenkova G, Georgieva A, Alexandrova A, Tzvetanova E, Mateeva P, Zamfirova R, Kirkova M. (2011). Effects of desipramine on the antioxidant status in rat tissues at carrageenan-induced paw inflammation. *Cell Biochem Funct*, 30(1): 18-23.
- Wagner, H., (1984). In: Hiroshi Hikino, N.R., Farnsworth (Eds.), *Economic and Medicinal Plant Research*, vol. I. Academic Press, London, pp. 113–153.
- Wang T.Y., Li Q., Bi K. S, (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.*, 13: 12–23.
- Wasser SP. (2002). Médicinal mushrooms as a source of antitumor and immune modulating Polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258-274.
- Wollgast J, Anklam E, (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int*, 33: 423-447.
- World Health Organization. Stratégie de l’OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005 WHO. Geneva, 2002. Amsterdam, 2000.
- Yeung A.W.K, Heinrich M, Kijjoa A, Tzvetkov N.T, Atanasov A.G. (2020). The ethno pharmacological literature: An analysis of the scientific landscape. *Journal of Ethno pharmacology*, 250: 112414
- Zaiter A, Loïc Becker, Petit J, Zimmer D, Karam M-C, Baudelaire E, Scher J, Dicko A. (2016). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders. *Powder Technology*, 301 : 649–656.

- Zellagui A, Gherraf N, Rhouati S. (2013). A Germacrene–D, characteristic essential oil from *A. Microcarpus* Salzm and Viv. Flowers growing in Algeria. *International Journal of Biodiversity Science and Management*, 3(1): 108–110
- Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khennouf S, Arrar L, Abu Zaga M, Mubarak M. (2015). Antioxidant potential and xanthine oxidase inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. *Medicinal Chemistry*, 11:506-513.
- Zhang D.X, Gutterman D.D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: 2023-2031.
- Zhang Q.W, Lin L.G, Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13(1) : 1-26.
- Zhang X, Cui Y, Huang J, Zhang Y, Nie Z, Wang L, Yan B, Tang Y & Liu Y. (2007). Immuno-stimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 2408.
- Zhong J, Shi G. (2019). Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Front. Immunology*, 10: 737.

Annexe 1**FICHE ENQUETE ETHNOBOTANIQUE**

Fiche No.....

Date :

Nom (herboriste, tradipraticiens)

Age :

Sexe : M / F.....

Lieu.....

Quelle sont les plantes les plus utilisées pour le traitement de l'arthrose, les douleurs rhumatismales, les douleurs de l'oreille et l'Eczéma.

PLANTE : Nom local

- Quelles sont vos utilisations de cette plante ?
- Quelles parties sont récoltées (partie aérienne, feuilles, fleurs, écorces de racines, écorces de tronc, Racines)?
- Quand doit-on récolter ?
- Utilise-t-on cette matière végétale à l'état frais ou sec? Si c'est à l'état sec, comment procède-t-on au séchage (au soleil ou à l'ombre) ?
- Comment se fait la préparation ?
- Quelle quantité de plante (extrait ...) faut-il prendre et dans quel volume d'eau ?
- Pendant combien de temps se fait la décoction, l'infusion, la macération ou la digestion ?
- Utilise-t-on cette plante seule pour se soigner ? Ou est-elle associée à d'autres plantes ?



HPLC analysis, acute toxicity and anti-inflammatory effects of *Salix alba* L. barks extracts on experimental animal models

Imene Roumili*, Nozha Mayouf, Noureddine Charef, Lekhmici Arrar & Abderrahmane Baghiani

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas University Setif, 19137, Algeria

Received 27 June 2021; revised 19 March 2022

The white willow, *Salix alba* L., rich in polyphenols and flavonoids, is traditionally used for its antipyretic, analgesic and anti-inflammatory potential in Algeria. As part of the ethnobotanical survey of medicinal plants in Setif region in Algeria, in the present study, we assessed the safety profile of *S. alba* barks methanol (SAME) and aqueous (SAQE) extracts, their phytoconstituents, and their antioxidant and anti-inflammatory activities. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), reducing power and hydroxyl radical tests assays. HPLC analysis identified 16 compounds in each extract with different concentrations. Gallic acid, syringic acid and cinnamic acid were high in the aqueous extract, while the methanol extracts were rich in chlorogeni acid, catechin, methyl gallate, pyrocatechol, rutin, ferulic acid, naringenin, taxifolin and kaempferol. The extracts showed significant reducing power, DPPH and hydroxyl radical scavenging effects. *In vivo* tests showed a strong effect on carrageenan-induced paw edema after 5 h with an inhibition of 88.62 and 87.56% for SAME and SAQE (500 mg/kg), respectively. The extracts also at 500 mg/kg showed significant inhibition of xylene-induced ear edema of 57.81% with SAME 67.18% with SAQE. The results have shown that the methanol and aqueous extracts of the barks of *S. alba* had no toxic effect on biochemical parameters as well as the organ weights and behaviour. It indicates that *S. alba* could be a promising source of anti-inflammatory agent.

Keywords: Antioxidant, Polyphenols, White willow

Free radicals cause protein, DNA damage and lipid peroxidation. These changes are responsible for several diseases including cancer, cardiovascular diseases, atherosclerosis and inflammatory diseases¹. Acute inflammation includes a series of events like increased permeability, vasodilation, fluid exudation and migration of leukocytes. In an inflammatory environment, massive quantities of different free radicals were produced by activated neutrophils and macrophages *via* the NADPH oxidase. These free radicals created in inflammation might lead to toxic effects in inflamed site². The human body has anti-free radical defence system which includes antioxidants that can be enzymatic or none enzymatic³. Since antiquity, medicinal plants were known as an important source of pharmaceutical agents which can prevent and treat several diseases.. Many properties of plant products are associated with the presence of phenolic compounds, which are essential for the development of plants and play an important role in defence mechanisms. Polyphenols

are secondary metabolites of plant that are involved in various physiologic phenomena⁴. They are known for their antioxidant activity due to their hydroxyl groups which give hydrogen to free radicals⁵⁻⁷. In addition, polyphenols possess anti-inflammatory properties by modulating the inflammatory cascade⁸⁻⁹. However, the popularization of traditional herbal medicine poses many problems, including the lack of sufficient studies on therapeutic properties and toxicity to provide sufficient guarantees as to their rational use.

Salix alba L. (Fam. Salicaceae) locally called "Safsaf abyadh", and commonly, white willow, grows mainly on wet soils in cold and temperate regions¹⁰. Traditionally, it has been used as antipyretic, analgesic and anti-inflammatory^{11,12}. The effectiveness of this plant is mainly due to flavonoids, tannins and other phenolic compounds including salicin, a precursor of salicylic acid¹³. *Salix alba* is shown to recognized 5-HT_{1D} receptors, targets of triptans¹⁴, leading to the hypothesis that it possesses migraine prophylactic activity¹⁵. White willow contains certain metabolites such as salicin and saliginin, which act as inhibitors of tumour by inducing apoptosis, damaging DNA and by affecting

*Correspondence:
Phone: +213 666 466 220
E-Mail: lekhararr@yahoo.fr

cell membranes or denaturing proteins in some human cancers¹⁶.

As part of the ethnobotanical survey of the use of medicinal plants in three localities in Setif region in Algeria, here, we have evaluated the acute toxicity of Algerian *Salix alba* L., determined its chemical composition and elucidated the antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanol and aqueous extracts of *S. alba* barks.

Materials and Methods

Ethnobotanical survey

Ethnobotanical survey was carried out according to Fadil *et al.*¹⁷ with few modifications. The data concerning the use of plants were collected from herbalists, traditional healers and villagers in the region of Setif in north-eastern of Algeria through three survey sites, Setif city, Ain Oulmene and Bougaa (Fig. 1). In this survey, 77 people (50 men and 27 women) aged between 32 and 64 took part.

Collection of plant material

Salix alba was collected manually on march, 2017 from the region of Bougaa, Setif (northeast of Algeria) and authenticated by Pr H. Laouer (Ferhat Abbas University of Setif, Algeria). A voucher specimen (003/DBEV/UFA/17) was deposited at the Department of Vegetal Biology and Ecology, University of Setif 1, Algeria. The sample was dried in shade then grounded and

the obtained powder was stored in the dark until the extraction.

Preparation of extracts

Two processes of extraction were followed in this work. In the first procedure, the dried powder of bark part of *Salix alba* was extracted by methanol for 7 days then 5 days at 25°C¹⁸. The excess methanol was evaporated by the rotary evaporation at 45°C until dryness to obtain *Salix alba* methanol extract (SAME). In the second protocol, the powder was extracted at a ratio of 1:10 (w/v) by decoction in distilled water and filtered using a filter paper then concentrated to dryness by allowing it to stand in an oven at 40°C¹⁹.

Phytochemical analysis

Determination of polyphenols and flavonoids amounts

The total content of Phenolic in plant extracts was determined with Folin-Ciocalteu spectrophotometric method²⁰. A volume of 200 µL of each *S. alba* extract (SAME, SAQE) was diluted and mixed with 1 mL of Folin-ciocalteu reagent (1/10). After 4 min, 800 µL of Na₂CO₃ (7.5%) were added. After incubation for 2 hours in the dark, the absorbance was measured at 765 nm. Results were expressed as equivalent mg of gallic acid / gram of plant extract. The concentration of flavonoids in bark extract was estimated using AlCl₃ reagent²⁰. The plant extracts (1 mL) were added to the same volume of a methanol solution containing 2% of AlCl₃. The mixture was vigorously shaken then incubated for 10 min at room temperature (25°C). Absorbance was read at 430 nm and results were expressed as mg of quercetine equivalent / g extract (mg QE/g).

Characterization of polyphenols by HPLC

Determinations of polyphenols compounds in aqueous and methanol extracts were performed by HPLC using an Agilent 1260 series²¹. C18 column (4.6 mm × 250 mm i.d., 5 mm) was used for the separation of components. Mixture containing two eluent systems: water (A) and 0.02% tri-floro-acetic acid in acetonitrile (B) was used as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and the column temperature of 35°C. The elution gradient applied is as follows: 0 to 5 min (80% A); 5-8 min (40% A); 8 to 12 min (50% A); 12-14 min (80% A) and 14-16 min (80% A). Eluted samples and standards were detected at 280 nm.

Antioxidant capacity evaluation

DPPH scavenging assay

Radical scavenging activity of plant extracts against stable DPPH[•] (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl

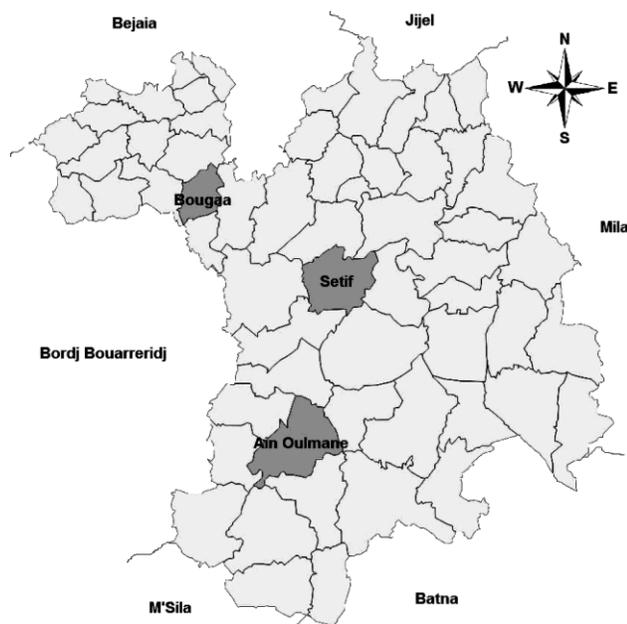


Fig. 1 — Map showing the study area (Setif region)

hydrate) following Guemmaz *et al.*²² protocol. A volume of 50 μL of various dilutions (0-50 mg/mL) from the extract was added to 1250 μL of DPPH solution (0.004% in methanol) and the absorbance was measured at 517 nm after 30 min of incubation in the dark. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as standard.

Determination of reducing power

The Fe^{3+} reducing power of *S. alba* barks extract was evaluated according to Hazra *et al.*²³. A volume of 400 μL of the diluted extract in distilled water (for SAQE) or methanol (for SAME) was mixed with 400 μL phosphate buffer (0.2 M, pH6.6) and 1% of potassium hexacyanoferrate in solution. After 20 min of incubation at 50°C, 10% of TCA was added and the mixture was centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The upper portion of the solution (400 μL) was mixed with 400 μL of distilled water and 80 μL of FeCl_3 solution (0.1%) was added. The absorbance was read at 700 nm.

Hydroxyl radical scavenging

The hydroxyl scavenging activity of *S. alba* extract was determined by its ability to compete with salicylic acid for hydroxyl radicals. Following Ates *et al.*²⁴, the reaction mixture contained, in a last, 1 mL of FeSO_4 (1.5 mM), 0.7 mL of H_2O_2 (6 mM), 0.3 mL of sodium salicylate (20 mM) and 200 μL of various concentrations of the extract. After incubation for 1 h at 37°C, absorbance was measured at 562 nm.

Animals

The animals used in this study were Swiss albino mice (20-30 g) and Wistar albino rats (150-200 g). Animals were obtained from 'Pasteur Institute of Algeria', Algiers. They were kept in the animal house of the University under favourable conditions (22°C \pm 3°C, 12/12 h light/dark cycle), and have free access to food and water. They were treated in accordance to guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development for assessing the safety and efficacy of plants based medicines²⁵ and to the Committee of the 'Association Algérienne des Sciences en Experimentation Animale' under law No. 88-08/1988.

Acute toxicity study

The study of acute oral toxicity of the extracts was evaluated according to the OECD²⁶ guideline 425. The test used five groups of 5 animals each: Gr. I as control, Gr. II & III received SAQE (*S. alba* bark aqueous extract) (2000 and 5000 mg/kg, respectively);

and Gr. IV & V received SAME (*S. alba* bark methanol extract) (2000 and 5000 mg/kg, respectively). All the animals were deprived from food twelve hours before the study and were kept under close observation for 14 days. They were weighed just before the administration of the extract and then on days 7 and 14 after²⁷.

Biochemical parameters

The blood samples were obtained in heparin tubes from sacrificed animals and the serum was separated by centrifuging at 3000 rpm for 15 min. The biochemical tests are carried out to evaluate liver damage by determining levels of creatinine, aspartate amino transferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT), using a semiautomatic Biochemistry Analyzer (Bechman) with standard spectrophotometric diagnostic kits (Spinreact, Spain)²⁸.

Anti-inflammatory evaluation

Xylene-induced ear edema

In this study, anti-inflammatory effects were assessed using the xylene-induced ear edema test described by Mayouf *et al.*²⁹. Animals were orally treated with two doses of *S. alba* extract (250 and 500 mg/kg), indomethacin (50 mg/kg) and distilled water. One hour before the administration of 30 μL xylene to the posterior surface of the right ear. Ear thicknesses were measured using digital calliper two hours after the application of xylene³⁰. The difference of thickness between the right and the left ear was determined and the percentage of inhibition of ear edema was calculated as following:

$$\% \text{ inhibition of edema} = 100 \times (\Delta\text{tc} - \Delta\text{ts}) / \Delta\text{tc}$$

where Δtc : difference of the ear thicknesses in the positive control and Δts : difference of the ear thicknesses in the sample (tested group)

Carrageenan induced paw edema in rats

Anti-inflammatory activity was also assessed using carrageenan-induced paw edema assay according to Buodonpri *et al.*³¹. Rats were injected at the sub plantar level with 100 μL of carrageenan suspension (1% in saline) freshly prepared in the right hind paw. Extract (250 and 500 mg/kg in 1 mL H_2O) and Diclofenac (20 mg/kg) or aqueous solution (vehicle control) were orally administered 1h before carrageenan injection. The thickness of the paws was measured by digital calliper, before and after injection of carrageenan at 1, 2, 3, 4 and 5 h). The reduction percentage of edema was calculated as following:

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times (V_c - V_t) / V_c,$$

Table 1 — Ethnobotanical survey of medicinal plants uses in anti-inflammatory remedies in Setif region

Family	Species Plant	Local Name	Part Used	Method of use
Capparaceae	<i>Capparis spinosa</i>	Kabbar	The bark of the roots	Infusion, Decoction ⁹
Zygophyllaceae	<i>Peganum harmala</i>	Harmal	Leaves, roots, stems	Cataplasm ⁷
Apiaceae	<i>Thapsia garganica</i>	Dryas	Root and aerial part	Poudre ⁷
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	Horayg	Leaves	Cataplasm, infusion, decoction ⁶
Equisetaceae	<i>Equisetum arvense</i>	Dhaylhişān	Aerial part	Infusion, Decoction ⁶
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Zaater	Aerial part	Decoction, tisane, fumigation, powder ⁴
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i>	Zendjabil	Rhizome	Decoction, tisane ⁸
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum</i>	Habrhad	Seeds	Fresh dried ³
Dioscoreaceae	<i>Tamus communis</i>	Karma souda	Rhizome	Cataplasm ²
Salicaceae	<i>Salix alba</i>	Safsaf abyadh	Bark	Cataplasm, infusion decoction, powder ⁸
Malvaceae	<i>Malva sylvestris</i>	Khobiza	Leaves, shoots, flowers, fruits	Infusion, decoction ⁵
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i>	Rayhane	leaves,	Infusion, decoction, Cataplasm ³
Asteraceae	<i>Inule visqueuse</i>	Amagramane	Aerial part	Tisane ⁷
Moringaceae	<i>Moringa oleifera</i>	Mouringa	Leaves	Infusion, Decoction ²

where V_c is the paw thickness in the control group and V_i is the paw thickness in tested group

Statistical analysis

All results were expressed as means \pm SD (*in vitro*) results were expressed as mean \pm SEM (*in vivo*) using Graph Pad Prism version 5.03. Analysis of variance (ANOVA) was used to test differences between groups.

Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

Ethnobotanical survey of medicinal plants

The informants were asked about the application patterns and the use of medicinal plants in the region in the treatment of inflammations. Fourteen species in 14 families have been reported to treat inflammatory diseases and associated symptoms (Table 1). The most cited species are *Capparis spinosa* (9 citations), *Salix alba* and *Zingiber officinale* (8 citations each).

Acute toxicity of extracts

Clinical signs

The first set of five mice receiving 2000 mg/kg aqueous or methanol extract of *Salix alba* showed that no mouse was killed. No evidence of toxicity was observed during the 14 days observation period. Therefore, the approximate acute lethal dose (LD₅₀) of *S. alba* bark extract in mice has been estimated at more than 2000 mg/kg. The aqueous extract at the dose of 5000 mg/kg showed no symptoms of toxicity on the behavioural responses of the treated mice observed for 14 days. However, mice given 5000 mg/kg methanol extract of *Salix alba* extract exhibited changes in respiratory rate, coat characteristics and mortality were observed during the experimental period in groups mentioned above.

Effect on the body and organ weights

The body weight of mice treated with *Salix alba* bark extract doses (2000 mg/kg and 5000 mg/kg) is

Table 2 — Effect of the extracts of *Salix alba* on body weight

Days	Control	SAQE 2 g/kg	SAQE 5 g/kg	SAME 2 g/kg
1 day	27.8 \pm 0.665	26 \pm 0.634 ^{ns}	28 \pm 0.896 ^{ns}	28.4 \pm 0.511 ^{ns}
7 days	30.8 \pm 0.584	29.8 \pm 1.360 ^{ns}	31.2 \pm 0.972 ^{ns}	28.8 \pm 1.598 ^{ns}
14 days	32.2 \pm 0.375	30.8 \pm 1.116 ^{ns}	33.4 \pm 0.929 ^{ns}	30 \pm 1.143 ^{ns}

Table 3 — Effects of extract of *Salix alba* on organ weights

Organ	Cont.	SAQE 2 g/kg	SAQE 5 g/kg	SAME 2 g/kg
Heart	0.176 \pm 0.009	0.154 \pm 0.008 ^{ns}	0.154 \pm 0.013 ^{ns}	0.164 \pm 0.016 ^{ns}
Lungs	0.256 \pm 0.018	0.216 \pm 0.02 ^{ns}	0.206 \pm 0.022 ^{ns}	0.212 \pm 0.010 ^{ns}
Liver	1.802 \pm 0.073	1.744 \pm 0.142 ^{ns}	1.436 \pm 0.045 ^{ns}	1.782 \pm 0.208 ^{ns}
Kidney	0.458 \pm 0.037	0.462 \pm 0.046 ^{ns}	0.458 \pm 0.031 ^{ns}	0.444 \pm 0.029 ^{ns}
Spleen	0.226 \pm 0.014	0.186 \pm 0.015 ^{ns}	0.186 \pm 0.015 ^{ns}	0.448 \pm 0.079 ^{ns}

presented on Table 2. Results revealed no significant differences. Table 3 shows the relative organ weight of the mice treated with the doses (2000 mg/kg and 5000 mg/kg) of *Salix alba* bark extract for 14 days. In general, no significant difference was noticed in the relative weight of organs.

Effect of extracts on biochemical parameters

Assessment of liver and kidney function is essential to assess the possible toxic effects of extracts and drugs³². The effects of acute administration of *Salix alba* on biochemical parameters are presented in Fig. 2. No statistically significant difference in liver function parameters such as creatinine, ASAT and ALAT was observed.

Characterization of phytoconstituents

Total polyphenols and flavonoids contents

The quantitative determination of total polyphenols and flavonoids in *Salix alba* bark extracts are shown in Table 4. The content of total polyphenols in the extracts was higher in the SAME (656.95 \pm 0.14 mg EGA/g E) than in the SAQE (440.12 \pm 0.14 mg EGA/g E).

HPLC analysis

The chromatograms the *Salix alba* aqueous and methanol extracts are presented in Fig. 3. The

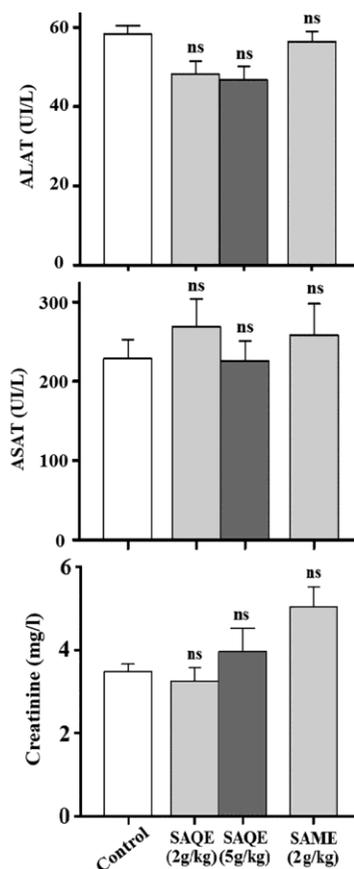


Fig. 2 — Biochemical parameters of control and mice treated with *Salix Alba* measured during the acute toxicity. [Values are expressed as mean \pm SEM (n = 5)]. ns: no significant]

Extracts	Yield of extraction (%)	Polyphenols (μg GAE/mg of extract)	Flavonoids (μg QE/mg extract)
SAME	40.03%	656.95 \pm 0.14	16.07 \pm 0.01
SAQE	8.76%	440.12 \pm 0.14	21.16 \pm 0.01

[GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent]

aqueous extract showed high concentrations of gallic acid, syringic acid, and cinnamic acid and the methanol extract was rich in chlorogenic acid, catechin, methyl gallate, pyrocatechol, rutin, ferulic acid, naringenin, taxifolin and kaempferol. It is interesting to mention that caffeic acid, rutin, ellagic acid, coumaric acid, vanillin, kaempferol were not found in the aqueous extract, while, caffeic acid, ellagic acid, coumaric acid and vanillin, were not found in the methanol extract.

Concentrations of found components are given in Table 5. HPLC analysis proved that several phenolic compounds were found, although the concentrations differ between the two extracts.

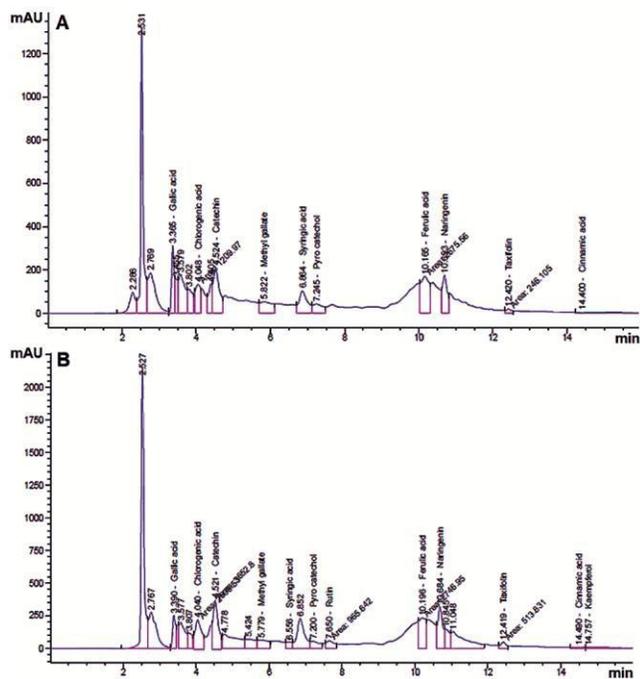


Fig. 3 — HPLC chromatograms of *Salix alba* (A) aqueous; and (B) methanol extracts

Table 5 — Phytoconstituents concentrations in aqueous (SAQE) and methanol (SAME) extracts of *Salix alba*

	Rt (min)	Conc. ($\mu\text{g/g}$)	
		SAQE	SAME
Gallic acid	3.302	7490.65	6465.33
Chlorogenic acid	4.094	5543.23	12367.34
Catechin	4.530	24313.09	36957.53
Methyl gallate	5.731	1291.05	1373.63
Syringic acid	6.580	3660.90	1205.61
Pyrocatechol	7.272	5163.03	5923.67
Rutin	7.564	0.00	7278.06
Ferulic acid	10.152	5306.63	5448.23
Naringenin	10.251	4917.95	8858.23
Taxifolin	12.472	2033.16	4244.94
Cinnamic acid	14.388	330.71	152.59
Kaempferol	14.755	0.00	1455.98

[Rt, retention time; Conc, concentration]

In vitro antioxidant activity

DPPH radical scavenging activity

The highest radical scavenging activity was presented by SAME with $\text{IC}_{50} = 6.7 \pm 0.001 \mu\text{g/mL}$, followed by SAQE $15.2 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}$). The two extracts are significantly more active than the BHT, the standard compound which showed an IC_{50} of $87 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}$.

Reducing power

The two extracts exhibit high reducing power with IC_{50} of $6.51 \mu\text{g/mL}$ for SAQE and $30.6 \mu\text{g/mL}$ for SAME, compared to BHT ($\text{IC}_{50} = 14.84 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$).

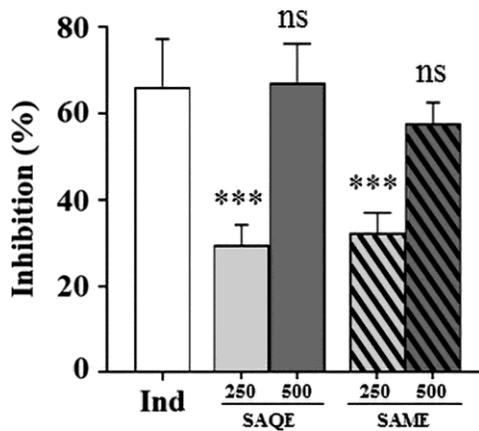


Fig.4 — Effects of *Salix alba* aqueous extract (SAQE: 250 and 500 mg/kg) and methanol extract (SAME: 250 and 500 mg/kg) on xylene induced auricular edema in mice after 2 h. [Values are means \pm SEM (n = 6). Ind: Indomethacin (50 mg/kg). Ns, not significant; *** P < 0.001 compared to indomethacin]

Hydroxyl radical scavenging

The elimination of OH^\bullet is vital for the living systems³³. The SAQE exhibited the highest OH^\bullet scavenging effect. IC_{50} values of SAQE, SAME were $60 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and $386 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, respectively. The hydroxyl radical removal activity of the SAQE extract was greater than the ascorbic acid (standard) with $\text{IC}_{50} = 101.43 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$.

Acute anti-inflammatory activity

Effects on xylene-induced ear edema

Xylene-induced edema is an acute experimental inflammatory model, that frequently evaluate the anti-inflammatory effects of natural products and has a good predictive value in anti-inflammatory screening³⁴. The activity of *S. alba* extracts on xylene-induced ear edema is shown in Fig. 4. Treatment of mice with doses of 250 and 500 mg/kg of aqueous extract reduced the swelling by 39.06 and 67.18%, respectively. On the other hand, when the activity of methanol extract was analyzed, we observed that the dose of 250 mg/kg reduced ear edema by 32.4%, while the dose of 500 mg/kg showed a reduction of 57.81%. These results demonstrate that the effect of aqueous extracts is similar to that of indomethacin (50 mg/Kg) inhibited the edema by 66.24 %.

Carrageenan induced paw edema inhibition

Subplantar injection of carrageenan in rat resulted in a time dependent increase in paw thickness from 1 h to 5 h after carrageenan administration in the control group. The effect of methanol and aqueous extracts of *S. alba* on carrageenan-induced edema was shown in Fig. 5. A group of doses of SAQE and SAME

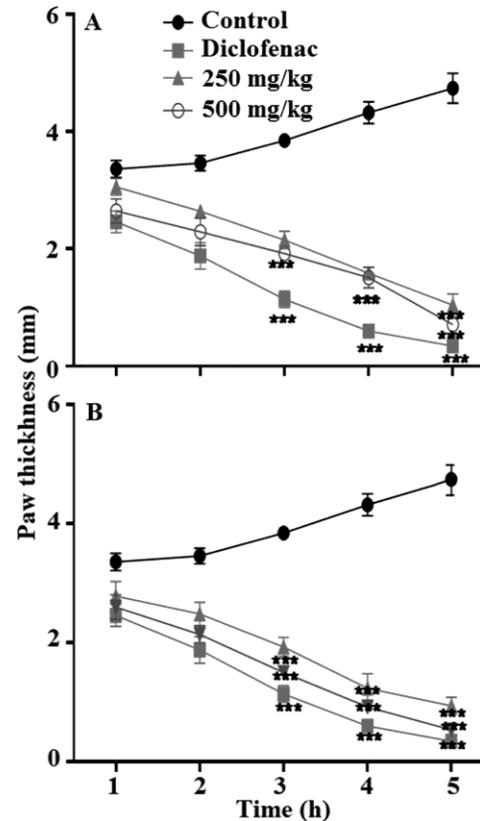


Fig. 5 — Effect of various doses of *Salix alba* (A) aqueous extract (SAQE); and (B) methanol extract (SAME) on carrageenan induced edema in Wistar rats. [Results are expressed as mean \pm SEM (n=6). Ns, no significant; *** P < 0.001 compared to positive control]

(250 and 500 mg/kg) gave a significant reduction in paw edema induced by carrageenan with time at 4 and 5 h (P < 0.001). Oral administration of Diclofenac (20 mg/kg) showed a clear inhibition of the inflammatory response in rats compared to the control (P < 0.001).

Discussion

The ethnobotanical survey showed the use of several plants to treat inflammatory diseases in Algeria. Species use depends on the region surveyed. In fact, Mayouf *et al.*²⁹ showed that Salicaceae family is represented in the region of Tebessa (northeast of Algeria) by *Populus nigra* rather than *Salix alba*. According to Karbab *et al.*²⁸ this family is not represented in the mountainous region of Djebel Zdim (north of Setif). This could be due to the absence of *Salix alba* in this region.

The content of polyphenols in *Salix alba* extracts as observed in the present study is higher than that of Piątczak *et al.*³⁵. Further, Pop *et al.*³⁶ found that *Salix alba* extract was rich in eriodictiol, isorhamnetin

and Na-salicylate. The phenolic compounds found by Maistro *et al.*³⁷ were salicylic acid, salicin, salidroside, saligenin, tremulodin, salicoylsalicin, salicortin and tremulacin. Although other flavonoids were not identified in the current study. This may be due to the different method used for extraction and identification of compounds³⁸. In addition, the difference between the previously reported results and the current findings may be due to the effect of the growing environment that would affect the chemical composition of the extracts³⁹.

Antioxidant compounds are generally in the phenolic form⁴⁰. The methanol and aqueous extracts of *S. alba* barks showed high DPPH scavenger effect even at low concentrations. Polyphenols are abundant in our extracts. It is presumed that phenolic compounds can act in the same way as reductones by giving electrons and reacting with free radicals to convert them into more stable products and terminating the free radical chain reaction⁴¹. The aqueous extract of bark had a reducing power effect greater than the methanol extract. The SAQE has a significant reducing power; it probably has various mechanisms such as the prevention of the initiation of the chain, the decomposition of peroxides, the capacity of reduction and the radical scavenging. The power reduction test measures the ability of an antioxidant to donate electrons⁴².

The reduction of hydroxyl radicals may be due to the presence of phenolic compounds capable of giving hydrogen in the extracts. Scavenging of hydroxyl radical is an important antioxidant activity because of the very high reactivity of OH radical, responsible for lipid peroxidation and considerable biological damage⁴³. *Salix alba* bark aqueous removed the hydroxyl radicals and prevented their reaction better than standard ascorbic acid. The IC₅₀ of the *S. alba* extracts was higher than that found by Gligoric *et al.*⁴⁴.

The results of anti-inflammatory activity clearly showed that *S. alba* extracts possessed significant antiphlogistic action against edema induced xylene. Our results are comparable to those found by Zhao *et al.*⁴⁵. In Carrageenan-induced paw edema, which is a time-dependent biphasic inflammatory reaction, various inflammatory mediators participate in its development⁴⁶. The first phase of inflammation (0-1 h) is attributed to the release of histamine, serotonin and bradykinin, and their action on vascular

permeability⁴⁷. The later phase (1-5 h) is due to the over production of prostaglandin and oxygen-derived free radicals in tissues⁴⁸. In this study, extracts of *S. alba* barks exerted a significant inhibitory effect on the development of rat paw edema in the last phase i.e after 3 hours of carrageenan injection. Khayyal *et al.*⁴⁹ found that, the aqueous extract of *Salix alba* bark was at least as effective as acetyl salicylic acid (ASA) in reducing inflammatory exudates, inhibiting leukocytic infiltration, preventing the rise in cytokines and suppressing prostaglandins. They also found that this extract was more effective than ASA in suppressing leukotrienes.

Finally, extracts from *Salix alba* barks are important antioxidants and anti-inflammatory effects and are safe to use because they have no toxic effects on behaviour, corporal weight and organ relative weights of animals administered by relatively high doses of these extracts (more than 2 g/kg). This extract is therefore relatively non toxic or having low toxicity²⁰.

Conclusion

Both, the aqueous and methanol extracts of the white willow *Salix alba* barks have been shown to contain considerable quantity of polyphenols and flavonoids. The study of acute toxicity that these extracts have demonstrated their safety. Furthermore, these extracts exhibit high *in vitro* antioxidant potentials. *In vivo* experiments showed that *S. Alba* possesses an anti-inflammatory property even in xylene-induced ear edema or carrageenan-induced paw edema. These findings substantiate the traditional use of *Salix alba*.

Conflict of Interest

Authors declare no competing interests.

References

- 1 Pandey SD, Joshi A, Mishra S, Sairam K & Hemalatha S, Antinociceptive, anti-inflammatory and antiarthritic activity of ethanol root extract and fraction of *Aganosma dichotoma* (Roth) K. Indian Journal of Experimental Biology, 56 (2018) 646.
- 2 Guzik TJ, Korb R & Adamek-Guzik T, Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54 (2003) 469.
- 3 Alam MN, Bristi NJ & Rafiquzzaman M, Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 21 (2013) 143.
- 4 Bouguemra S, Ouafi S, Bouguedoura N & Chabane D, Enhancing bioactive potential by growth regulators in callus

- of *Mentha longifolia* L. leaves for anti-inflammatory and analgesic activities. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58 (2020) 122.
- 5 Nauman M, Kale RK, Dhruve P & Singh RP, Determination of antioxidant potential of *Salix aegyptiaca* L. through biochemical analysis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58 (2020) 198.
 - 6 George VC, Vijesh VV, Amararathn DIM, Lakshmi CA, Anbarasu K, Kumar DRN, Ethiraj KR, Kumar RA & Rupasinghe HPV, Mechanisms of action of flavonoids in prevention of inflammation associated skin cancer. *Curr Med Chem*, 23 (2016) 3697.
 - 7 Paravataneni & Pedireddi M, Phytochemical analysis and antimicrobial evaluation of chloroform extract of stem and roots of *Scoparia dulcis* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57 (2019) 206.
 - 8 Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP & Heredia JB, Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food Agric*, 2 (2016) 1.
 - 9 Aggarwal BB, Prasad S, Reuter S, Kannappan R, Yadev VR, Park B, Kim JH, Gupta SC, Phromnoi K, Sundaram C, Prasad S, Chaturvedi MM & Sung B, Identification of novel anti-inflammatory agents from ayurvedic medicine for prevention of chronic diseases: “reverse pharmacology” and “bedside to bench” approach. *Curr Drug Targets*, 12 (2011) 1595.
 - 10 Klasnja B, Kopitovic S & Orlovic S, Wood and bark of some poplar and willow clones as fuelwood. *Biomass Bioenergy*, 23 (2002) 427.
 - 11 Le NPK, Herz C, Gomes JVD, Förster N, Antoniadou K, Mittermeier-Kleßinger VK, Mewis I, Dawid C, Ulrichs C & Lamy E, Comparative anti-inflammatory effects of *Salix cortex* extracts and acetylsalicylic acid in SARS-COV-2 peptide and LPS-activated human *In vitro* systems. *Int J Mol Sci*, 22 (2021) 6766
 - 12 Islam NU, Jalil K, Shahid M, Rauf A, Muhammad N, Khan J, Shah MR & Khan MA, Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. *Arabian J Chem*, 12 (2019) 2914.
 - 13 Harbourne N, Marete E, Jacquier JC & O’Riordan D. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT-Food Sci Technol*, 42 (2009) 1468.
 - 14 Negro A, Koverech A & Martelletti P, Serotonin receptor agonists in the acute treatment of migraine: a review on their therapeutic potential. *J Pain Res*, 11 (2018) 515.
 - 15 Anonymous, *Assessment report on Salix [various species including S. purpurea L, S. daphnoides Vill, S. fragilis L.], cortex*. EMA/HMPC/80628/2016. (Committee on Herbal Medicinal Products, European Medicines Agency, Amsterdam, Netherlands), 2017, 1-55.
 - 16 El-Shemy HA, Aboul-Enein AM, Aboul-Enein KM & Fujita K, Willow leaves' extracts contain anti-tumor agents effective against three cell types. *PLoS ONE*, 2 (2007) e178.
 - 17 Fadil M, Farah A, Haloui T & Rachiq S, Ethnobotanical survey of plants operated by cooperatives and associations of the Meknes-Tafilalet area in Morocco. *Phytothérapie*, 13 (2014) 19.
 - 18 Arrar L, Benzidane N, Krache I, Charef N, Khennouf S & Baghiani A, Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharm Commun*, 3 (2013) 70.
 - 19 Ferreira A, Proenc C, Serralheiro MLM & Araujo MEM, The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, 108 (2006) 31.
 - 20 Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F & Jiang Y, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, 102 (2007) 771.
 - 21 Faraz I, Ali A, Haq FUI, Tchamgoue J, Kouam SF, Miana GA & Musharraf SG, Sensitive Determination of C-Alkylated Flavonoids by HPLC-ESI-MS/MS Using Multiple Reaction Monitoring Approach: *Pseudarthria hookeri* as a Case Study, *J Chromatogr Sci*, 57 (2019) 944.
 - 22 Guemmaz T, Zerargui F, Boumerfeg S, Arrar L, Aouachria S, Khennouf S, Charef N & Baghiani A, Anti-hemolytic, Anti-lipid Peroxidation, Antioxidant Properties and Acute Toxicity of *Xanthium strumarium* Leaves Extracts. *Annu Res Rev Biol*, 24 (2018) 1.
 - 23 Hazra B, Biswas S & Mandal N, Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternat Med*, 8 (2008) 1.
 - 24 Ates B, Abraham L & Ercal N, Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetyl cysteineamide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Rad Res*, 42 (2008) 372.
 - 25 OECD [Organisation for Economic Co-operation and Development]. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity. *Acute Toxic Class Method*, 423, Paris (2001).
 - 26 OECD, Guidelines for Testing of Chemicals/Section 4: Health Effects Test. 425: Acute Oral Toxicity: Up and Down Procedure, (Organization for Economic Co-operation and Development Publishing, Paris), 2008.
 - 27 Aouachria S, Boumerfeg S, Benslama A, Benbacha F, Guemmez T, Khennouf S, Arrar L & Baghiani A, Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (*in vitro* and *in vivo*) of *Reichardia picroide* crude extract. *J Ethnopharmacol*, 208 (2017) 105.
 - 28 Karbab A, Mokhnache K, Ouhida S, Charef N, Djabi F, Arrar L & Mubarak MS, Anti-inflammatory, analgesic activity, and toxicity of *Pituranthos scoparius* stem extract: An ethnopharmacological study in rat and mouse models. *J Ethnopharmacol*, 258 (2020) 112936.
 - 29 Mayouf N, Charef N, Saoudi S, Baghiani A, Khennouf S & Arrar L, Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Asphodelus microcarpus* methanol extracts. *J Ethnopharmacol*, 239 (2019) 111914.
 - 30 Hosseinzadeh H, Ramezani M, Fadishei M & Mahmoudi M, Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine*, 9 (2002) 135.
 - 31 Buodonpri W, Wichitnithad W, Rojsitthisak P & Towiwat P, Synthetic curcumin inhibits carrageenan-induced paw edema in rats, *Journal of Health Research*, 23 (2009) 11.
 - 32 Rahman MF, Siddiqui MK & Jamil K, Effects of vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profile in a subchronic study with rats. *Human Exp Toxicol*, 20 (2001) 243.
 - 33 Yen GC & Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*, 43 (1995) 27.

- 34 Parveen Z, Deng Y, Saeed MK, Dai R, Ahamad W & Yu YH, Anti-inflammatory and analgesic activities of Theseus chinese Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, 127 (2007) 1275.
- 35 Piatczak E, Dybowska M, Pluciennik E, Kośła K, Kolniak-Ostek J & Kalinowska-Lis U, Identification and Accumulation of Phenolic Compounds in the Leaves and Bark of *Salix alba* (L.) and Their Biological Potential. *Biomolecules*, 10 (2020) 1391.
- 36 Pop C, Vodnar D, Ranga F & Socaciu C, Comparative Antibacterial Activity of Different Plant Extracts in Relation to their Bioactive Molecules, as Determined by LC-MS Analysis. *Bull UASVM Anim Sci Biotechnol*, 70 (2013) 86.
- 37 Maistro EL, Terrazzas PM, Perazzo FF, Gaivao IOM, Sawaya ACHF & Rosa PCP, *Salix alba* (white willow) medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes. *J Toxicol Environ Health A*, 82 (23-24) (2020) 1.
- 38 Tyśkiewicz K, Konkol M, Kowalski R, Rój E, Warmiński K, Krzyżaniak M, Gil M & Stolarski MJ, Characterization of bioactive compounds in the biomass of black locust, poplar and willow. *Trees*, 33 (2019) 1235.
- 39 Abdel-Wahhab MA, El-Nekeety AA, Hassan NS, Gibriel AAY & Abdel-Wahhab KG, Encapsulation of cinnamon essential oil in whey protein enhances the protective effect against single or combined sub-chronic toxicity of fumonisin B1 and/ or aflatoxin B1 in rats. *Environ Sci Poll Res*, 25 (2018) 29144.
- 40 Aksoy L, Kolay E, Ağılönü Y, Aslan Z & Kargıoğlu M, Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Biol Sci*, 20 (2013) 235.
- 41 Ramalakshmi K, Kubra IR & Rao LJM, Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Res Int*, 41 (2008) 96.
- 42 Sowndhararajan K & Kang SC, Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi J Biol Sci*, 20 (2013) 319.
- 43 Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L & Yao WB, In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondia saxillaris* fruit. *Food Chem*, 106 (2008) 888.
- 44 Gligoric E, Igić R, Suvajdzic L & Grujić-Letic N, Species of the Genus *Salix* L.: Biochemical Screening and Molecular Docking Approach to Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. *Appl Sci*, 9-1842 (2019) 1.
- 45 Zhao J, Maitituersun A, Li C, Li Q, Xu F & Liu T, Evaluation on Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Total Flavonoids from *Juniperus Sabina*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018 (2018) 1.
- 46 Chavan MJ, Wakte PS & Shinde DB, Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17 (2010) 149.
- 47 Sadeghi H, Hajhashemi V, Minaian M, Movahedian A & Talebi A, Further studies on anti-inflammatory activity of maprotiline in carrageenan-induced paw edema in rat. *Int Immunopharmacol*, 15 (2013) 505.
- 48 Vircheva S, Nenkova G, Georgieva A, Alexandrova A, Tzvetanova E, Mateeva P, Zamfirova R & Kirkova M, Effects of desipramine on the antioxidant status in rat tissues at carrageenan-induced paw inflammation. *Cell Biochem Funct*, 30 (2011) 18.
- 49 Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Okpanyi SN, Kelber O & Weiser D, Mechanisms Involved in the Antiinflammatory Effect of a Standardized Willow Bark Extract. *Arzneimittel-Forschung*, 55 (2005) 677

ملخص

تستخدم نباتتا *Salix alba* و *Equisetum arvense* بكثرة في الطب الشعبي لخصائصهما العلاجية. لهذا الغرض، تم تصميم هذه الدراسة لتقييم سمية المستخلصات الميثانولية (ME) والمائية (QE) لهاتين النباتتين ودراسة نشاطاتها المضادات للأكسدة، وللتهاب والمنظمة للمناعة. تمت دراسة التأثيرات المضادة للالتهابات والمنظمة للمناعة في الجسم الحي في نماذج حيوانية. وأظهر كل من اختباري الالتهاب المحرض بالكاراجينان، (Carrageenan-Induced Paw Edema : CIPE) والمعرض بالكزويلان (Xylen-Induced Ear Edema : XIEE) أن المستخلصات SAME و SAQE و EAME و EAQE أعطت بعد 6 ساعات تأثيراً كبيراً مضاداً للوذمة بجرعة 500 مغ/كغ في CIPE. كما تسببت المستخلصات SAME و SAQE و EAME و EAQE (250 و 500 مغ/كغ) في تثبيط كبير لـ XIEE. في التهاب المفاصل الناتج عن الفورمالين في أرجل الجرذان، أظهرت المعالجة الفموية بـ 250 أو 500 مغ/كغ من المستخلصات تثبيطاً كبيراً للأقدام. تم تقييم تأثير المستخلصات الميثانولية والمائية على جهاز المناعة من خلال المعالجة بـ 250 أو 500 مغ/كغ فأدى هذا إلى تحفيز مناعي كبير لإنتاج الأجسام المضادة في الفئران المنعقة بواسطة كريات الدم الحمراء للخروف. في الختام، تُظهر المستخلصات المائية والميثانولية لـ *Salix alba* و *Equisetum arvense* خصائص مثيرة للاهتمام مضادة للالتهابات ومضادة للأكسدة ومضادة لالتهاب المفاصل ومحفزة للمناعة. تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذين النباتين لعلاج بعض الاضطرابات المرضية ويمكن أن توفر أساساً دوائياً للاستخدام العلاجي في حالات الالتهاب ونقص المناعة.

الكلمات المفتاحية: مضادات الالتهابات، مضادات الأكسدة، التنظيم المناعي ، *Salix alba* ، *Equisetum arvense*

Résumé

Salix alba (SA) et *Equisetum arvense* (EA) sont deux plantes largement utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés thérapeutiques. A cet effet, notre thématique de recherche a pour objectifs d'établir le profil toxicologique, d'évaluer l'effet antioxydant, et des effets anti-inflammatoire et immunomodulateur *in-vivo* des extraits méthanoliques (ME) et aqueux (QE) des deux plantes. Les deux tests d'inflammation induite, par le carraghénane (Carrageenan-Induced Paw Edema : CIPE) et par le xylène (Xylen-Induced Ear Edema : XIEE) ont montré que les extraits SAME, SAQE, EAME et EAQE ont produit un effet antioedématogène significatif avec la dose de 500 mg / kg pour le CIPE. Les extraits SAME, SAQE, EAME et EAQE ont montré une inhibition significative pour le XIEE. Dans l'arthrite induite par la formaline chez les rats, le traitement par voie orale par 250 ou 500 mg/kg, a révélé une inhibition significative du gonflement des pattes. Le traitement des souris immunisées par les globules rouges de mouton par les extraits à des doses de 250 ou 500 mg/kg a conduit à une stimulation immunitaire significative de la production d'anticorps. En conclusion, les extraits aqueux et méthanoliques d'*Equisetum arvense* et de *Salix alba* possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antiarthritiques et immunostimulatrices intéressantes. Cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certaines maladies et pourrait constituer une base pharmacologique pour son utilisation thérapeutique dans les cas d'inflammation et d'immunodéficiences.

Mots clés : Anti-inflammatoires, Antioxydants, Immunomodulation, *Salix alba*, *Equisetum arvense*.

Abstract

Salix alba (SA) and *Equisetum arvense* (EA) are two plants widely used in folk medicine for their therapeutic properties. To this end, our research theme aims to establish the toxicological profile, to evaluate the antioxidant potential, and the anti-inflammatory and immunomodulatory effects *in vivo* of the methanolic (ME) and aqueous (QE) extracts of the two plants. The anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been studied *in vivo* in animal models. The two induced inflammation tests, by Carrageenan (Carrageenan-Induced Paw Edema: CIPE) and by xylene (Xylen-Induced Ear Edema: XIEE) showed that the SAME, SAQE, EAME and EAQE extracts produced a significant anti-edematogenous effect with the 500 mg/kg dose for CIPE after 6 h. SAME, SAQE, EAME and EAQE extracts (250 and 500 mg/kg) showed significant inhibition for XIEE. In formalin-induced arthritis in rats, oral treatment with 250 or 500 mg/kg showed significant inhibition of paw swelling. The treatment of mice immunized with sheep red blood cells with the extracts at doses of 250 or 500 mg/kg led to significant immune stimulation of antibody production. In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *Equisetum arvense* and *Salix alba* have interesting anti-inflammatory, antioxidant, antiarthritic and immunostimulatory properties. This study supports the traditional use of this plant to treat certain diseases and could constitute a pharmacological basis for its therapeutic use in cases of inflammation and immunodeficiencies.

Keywords: Anti-inflammatoiy, Antioxidant, Immunomodulation, *Salix alba*, *Equisetum arvense*.