

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB. BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de recherche : Biotechnologies, Environnement et Santé

THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Biologie et Santé

EXTRACTION, CARACTÉRISATION ET IDENTIFICATION DE QUELQUES
COMPOSÉS (METABOLITES) SECONDAIRES DE *INULA VISCOSA*
(L'INULE VISQUEUSE) ET EFFETS THÉRAPEUTIQUES

Par

OUAHCHIA Celia

Devant le jury composé de :

H. BOUTOUMI	Professeur, U.S.D. Blida1	Président
K. HOUAHLI	Professeur, UMM Tizi Ouzou	Examineur
F. HAMAIDI-CHERGUI	MCA., U.S.D. Blida1	Examinatrice
F. SAIDI	Professeur, U.S.D. Blida1	Directrice de thèse
H. CHERIF	MCA., U.S.D. Blida1	Co-promotrice

Blida, 2018

RÉSUMÉ

Ce travail a porté sur l'étude d'*Inula viscosa* (L.) utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Il avait pour but de réaliser une étude phytochimique de certains extraits de cette plante et d'évaluer leurs effets thérapeutiques.

L'enquête ethnobotanique réalisée a révélé que cette plante est peu connue par les personnes questionnées.

Le screening phytochimique a dévoilé la présence de flavonoïdes, de tannins hydrolysables, de terpènes et de saponines dans la partie aérienne de cette plante.

Le dosage spectrophotométrique a révélé la présence de concentrations importantes en polyphénols dans les extraits méthanoliques et les décoctés des feuilles et des fleurs.

L'analyse par HPLC-DAD-ESI-MS/MS des extraits méthanoliques a mis en évidence la présence d'acides phénoliques (dérivés de l'acide cafféoylquinique) et de flavonoïdes (quercétine, myricétine et leurs dérivés, kaempférol, isorhamnétine et diosmétine).

L'évaluation des effets biologiques des différents extraits de la plante (n-hexane, méthanolique, décocté) a montré que les meilleurs résultats ont été obtenus avec les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs.

L'étude *In Vitro* de l'activité antioxydante a indiqué que les fractions phénoliques possédaient un important pouvoir inhibiteur du radical libre DPPH et réducteur du fer Fe^{3+} . Les extraits méthanoliques ont présenté un meilleur effet antibactérien contre les bactéries à Gram positif avec des CMI comprises entre 25 mg/mL et 6.25 mg/mL. Tous les extraits se sont avérés peu actifs sur les souches du genre *Candida*. Les résultats des tests antileishmaniens des extraits méthanoliques ont révélé un important effet leishmanicide sélectif contre la forme promastigote sans aucune cytotoxicité sur la lignée cellulaire THP-1 aux doses testées.

L'évaluation *In Vivo* des activités anti-inflammatoire (méthodes carragénine, xylène), antalgique (test à l'acide acétique) et antipyrétique (méthode à la levure de bière) a montré que les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs avaient un bon effet anti-œdémateux, antalgique et un effet antipyrétique intéressant.

L'étude de la toxicité des extraits des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* n'a pas révélé de signes de toxicité aiguë (extraits méthanoliques et décoctés) ou subaiguë (extraits méthanoliques) aux doses étudiées.

Mots clés : *Inula viscosa* (L.); étude phytochimique ; activité antioxydante ; antimicrobienne ; anti-inflammatoire ; antalgique ; antipyrétique ; toxicité.

ABSTRACT

This work focused on the study of *Inula viscosa* L. used in traditional algerian medicine for its many therapeutic properties. It aimed to perform a phytochemical study of some extracts of this plant and to evaluate their therapeutic effects.

The ethnobotanical investigation carried out revealed that this plant is not very well-known by the people interviewed.

Phytochemical screening showed that *Inula viscosa* contains mainly flavonoids, hydrolysable tannins, terpenes and saponins.

The spectrophotometric assay revealed the presence of remarkable concentrations of polyphenols in the methanolic extracts and the decoction of leaves and flowers.

The HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of methanolic extracts has highlighted the presence of phenolic acids (caffeoylquinic acids derivatives) and flavonoids (quercetin, myricetin and their derivatives, kaempferol, isorhamnetin and diosmetin).

The study of the biological activities carried out on various extracts of this plant (n-hexane, methanolic, decoction) showed that the best results were obtained with the methanolic extracts.

The *In Vitro* study of the antioxidant activity has indicated that the phenolic fractions have an important scavenging power of the free radical DPPH and reducing power of the Fe^{3+} . The methanolic extracts showed the best antibacterial activity against Gram-positive strains with MIC of 25 mg/mL and 6.25 mg/mL. All tested extracts proved to be not very active against strains of the genus *Candida*. The results of the antileishmanial tests of the methanolic extracts revealed an important selective leishmanicidal effect against the promastigote form without any cytotoxic effect against the THP-1 cell line at tested doses.

In Vivo evaluation of the anti-inflammatory (carrageenan and xylene tests), analgesic (acetic acid induced writhes test) and antipyretic (Brewer's yeast induced pyrexia method) activities showed a good anti-oedematous effect, a high analgesic and an appreciable antipyretic activities of leaves and flowers methanolic extracts.

The study of the toxicity of leaves and flowers of *Inula viscosa* L. extracts did not detect any signs of acute toxicity (methanolic extracts and decoctions) or subacute toxicity (methanolic extracts) at the studied doses.

Key-words: *Inula viscosa* (L.); phytochemical study; antioxidant; antimicrobial; anti-inflammatory; analgesic; antipyretic activities; toxicity.

ملخص

- يتركز هذا العمل على دراسة *Inula viscosa* المستخدمة في الطب التقليدي الجزائري لخصائصها العلاجية العديدة. يهدف إلى إجراء دراسة كيميائية نباتية لبعض مستخلصات هذه النبتة و تقييم وظائفهم الطبية العلاجية.
- أظهرت الدراسة الإثنوبوتانية أنّ هذه النبتة غير معروفة بالقدر الكافي من طرف الأشخاص المستجوبين.
 - كشف الفحص الكيميائي النباتي أنّ *Inula viscosa* تحتوي أساساً على الفلافونويد، التانين القابل للتحلل، التريتربان و الصابونين.
 - مقايسة الطيف الضوئي للمستخلصات الميثانولية وبالإغلاء كشفت أنهم يحتوون على تركيزات عالية من البوليفينول.
 - أبرز تحليل المستخلصات الميثانولية عن طريق الـ HPLC - DAD -ESI-MS/MS على وجود الأحماض الفينولية (مشتقات حمض الكافيبولكينيك acide cafféoylquinique) و الفلافونويد (Myricétine, Quercétine) و مشتقاتهم، (Kaempférol, isorhamnétine et disométine).
 - أظهرت دراسة الأنشطة البيولوجية التي أجريت على مستخلصات مختلفة من هذه النبتة (الهيكزانية، الميثانولية و المستخلصة بالإغلاء). أنّ أفضل النتائج تمّ الحصول عليها مع المستخلصات الميثانولية.
- أشارت الدراسات *In vitro* للمفعول المضاد للأكسدة أنّ المستخلصات الفينولية لديها فعالية في محاصرة الجذر (DPPH) و الحد من قوة Fe^{3+} .
- المستخلصات الميثانولية أظهرت أهم نشاط ضد البكتيرية غرام إيجابي مع CMI تتراوح بين 25 - 6,25 ملغ/مل. جميع المستخلصات تبيّنت أنّها قليلة الفعالية ضد الفطريات من نوع *Candida*.
- نتائج إختبار نشاط ضد الليشمانية للمستخلصات الميثانولية أظهرت أنّ لديها تأثير إنتقائي مبيد هام ضد الشكل الصوتي (Promastigote) بدون تأثير على سلالة خلايا THT-1 عند الجرعات المستخدمة.
- التقييم *In vivo* للفعاليات المضادة للإلتهابات (بتقنية الكراجينين و كسيلان)، النشاط المسكن للألم (تقنية حمض أسيتيك) و النشاط الخافض للحرارة (تقنية خميرة الجعة) أظهرت تأثيراً جيّداً مضاداً للوذمة و نشاط مسكّن عالي و تأثير خافض للحرارة ملحوظ للمستخلصات الميثانولية للأوراق و الزهور مقارنة للمستخلصات بالإغلاء (Décoctés).
- دراسة سميّة مستخلصات أوراق و زهور *Inula viscosa* لم تظهر أي علامات لسميّة حادة (للمستخلصات الميثانولية و المستخلصات بالإغلاء) أو سميّة شبه مزمنة (للمستخلصات الميثانولية) للجرعات المستعملة.
- الكلمات الرئيسية: *Inula viscosa*، دراسة كيميائية نباتية، مضاد الأكسدة، مضاد الميكروبات، مضاد الإلتهابات، مسكّن الألم، مضاد ارتفاع الحرارة، السميّة.

Remerciements

Merci à ALLAH le tout puissant de m'avoir donné courage, volonté et santé pour accomplir ce modeste travail.

Je remercie vivement le Professeur SAIDI F. de l'Université Saad Dahlab, Blida d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse et de m'avoir soutenue, aidée et encouragée tout au long de mon parcours. Je lui témoigne ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Je tiens également à présenter mes sincères remerciements au Docteur CHERIF H-S. qui a accepté de codiriger ce travail qu'elle puisse trouver ici l'expression de ma considération.

Mes remerciements s'adressent également :

Au Professeur BOUTOUMI H. de l'Université Saad Dahlab, Blida pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Au Professeur HOUALI K., de l'université Mouloud Maamari de Tizi-Ouzou, pour nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Au Docteur HAMAIDI-CHERGUI F. de l'Université Saad Dahlab, Blida, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'examiner ce travail, qu'elle puisse trouver ici toute ma gratitude.

Mes remerciements s'adressent également aux personnels des différentes institutions qui nous ont permis de concrétiser, en partie, les objectifs de notre travail expérimental. Je cite en particulier :

Mme NEGAB I. responsable du laboratoire de pharmacotoxicologie, du complexe Antibiotical SAIDAL, Médéa, d'avoir aimablement consenti à me compter parmi les stagiaires, pour ses qualités humaines et son aide très précieuse.

Mme Bekhti du laboratoire de physicochimie et tout le personnel des laboratoires de pharmacotoxicologie, de microbiologie, de stérilité et de physicochimie du complexe Antibiotical SAIDAL, Médéa, qui m'ont accueilli dans une ambiance sympathique et chaleureuse.

Mme AZINE K. ainsi que tout le personnel du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL, Alger, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de leur service et de m'avoir offert l'opportunité d'y réaliser une partie mes travaux

Le professeur Hamrioui B., du laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'Hôpital Mustapha Pacha, Alger pour m'avoir acceptée dans son laboratoire pour réaliser les tests antifongiques.

Le professeur CHERGUE ELAIN et le professeur NAIM du laboratoire Central de l'Hôpital El Hadi Flici ex EL-Kettar (Alger), pour nous avoir permis de d'effectuer différentes manipulations bactériologiques.

Mme Hemma Rym, du laboratoire du CAC et Mme Faiza du laboratoire central de l'hôpital Frantz Fanon (Blida), pour leur aide, gentillesse et disponibilité.

Le professeur HARRAT Z., responsable du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Population de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire.

Le Dr EDDAIKRA N., Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Population de l'IPA, pour son encadrement, ses précieux conseils et toutes les connaissances techniques acquises en sa présence.

Le professeur NOUAR N., du laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, CHU BENI MESSOUS, pour sa disponibilité, son soutien et son investissement dans ce travail, je remercie également toute l'équipe du laboratoire pour leur gentillesse et accueil chaleureux.

Mme CHERIFI Z., du ministère de la Santé, pour son aide, sa gentillesse et son soutien.

Le professeur KSOURI R., du laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj-Cédria (CBBC), Hammam Lif, Tunisie, pour m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour certaines manipulations et pour ses précieux conseils.

Le Dr Hosni K., Laboratoire des Substances Naturelles, Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP), Biotechpôle de Sidi Thabet, Ariana, Tunisie, que je ne saurai assez remercier pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa modestie, ses compétences et son aide très précieuse dans la réalisation d'une partie de cette thèse.

Enfin je tiens également à remercier tous mes enseignants de l'université de Saad Dahlab, ainsi que le personnel des laboratoires et le personnel administratif.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

♥ *Ma très chère mère, pour sa tendresse, sa douceur, sa sagesse, son soutien, pour m'avoir encouragée sans relâche dans mes études et particulièrement dans cette dernière aventure* ♥

♥ *Mon cher père, pour avoir toujours été présent pour moi, pour m'avoir appris à donner le meilleur de moi-même et à ne jamais baisser les bras devant les difficultés* ♥

♥ *Ma sœur, mon beau-frère et ma petite nièce* ♥

♥ *Ma grand-mère, la merveilleuse mémé qui se faisait toujours du souci pour moi* ♥

♥ *Mon défunt grand-père, ma source d'inspiration, qui m'a inculqué l'amour du savoir et des études* ♥

♥ *Mes oncles ainsi que leurs épouses* ♥

♥ *Mes cousins et cousines* ♥

♥ *Tous mes amis(e)s* ♥

😊😊 *Celia* 😊😊

TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
RESUME EN ARABE	
REMERCIEMENTS	
DEDICACE	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.1. Présentation de l'espèce <i>Inula viscosa</i> (L.)	16
1.1.1. Etymologie	16
1.1.2. Systématique	17
1.1.3. Description botanique	17
1.1.4. Répartition géographique et habitat	18
1.1.5. Utilisation traditionnelle d' <i>Inula viscosa</i>	19
1.2 Substances actives des plantes médicinales	20
1.2.1 Composés phénoliques	20
1.2.2 Composés terpéniques	23
1.2.3 Alcaloïdes	24
1.2.4 Métabolites secondaires d' <i>Inula viscosa</i>	24
1.3. Activités biologiques	26
1.3.1. <i>In Vitro</i>	26
1.3.1.1. Activité antioxydante	26
1.3.1.2. Activité antimicrobienne	27
1.3.12.1. Activité antibactérienne	27
1.3.12.2. Activité anticandidosique	28
1.3.12.2. Activité antileishmanienne	29
1.3.2. <i>In Vivo</i>	32
1.3.2.1. Etude de la toxicité	32
1.3.2.2. Activité anti-inflammatoire	34
1.3.2.3. Activité antalgique	36
1.3.2.4. Activité antipyrétique	37

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	39
2.1. Matériel	39
2.1.1. Matériel biologique	39
2.1.1.1. Matériel végétale	
2.1.1.2 Microorganismes étudiés	41
2.1.1.3 Matériel animal	
2.1.2 Matériel non biologique	
2.2. Méthode d'étude	43
2.2.1. Enquête ethnobotanique	43
2.2.2. Etude microscopique	44
2.2.3. Extraction des métabolites secondaires	45
2.2.4. Etude phytochimique	47
2.2.4.1 Screening phytochimique	47
2.2.4.2 Dosage des composés phénoliques	49
2.2.4.3 Analyse qualitative par HPLC-DAD-ESI-MS/MS	52
2.2.5. Etude des activités biologiques d' <i>Inula viscosa</i>	55
2.2.5.1. Activités <i>In Vitro</i>	55
2.2.5.1.1 Evaluation de l'activité antioxydante	55
2.2.5.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	58
2.2.5.1.2.1 Evaluation de l'activité antibactérienne et anticandidosique	58
2.2.5.1.2.1 Evaluation de l'activité antileishmanienne	64
2.2.5.2. Activités <i>In Vivo</i>	74
2.2.5.2.1. Evaluation de la toxicité	74
2.2.5.2.1.1 Toxicité aiguë	74
2.2.5.2.1.2 Toxicité subaiguë	76
2.2.5.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	79
2.2.5.2.3 Evaluation de l'activité antalgique	82
2.2.5.2.4 Evaluation de l'activité antipyrétique	84
2.2.5.3 Etude statistique	86
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	87
3.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique	87
3.2. Résultats Etude microscopique	92
3.3. Rendements d'extraction	97
3.4. Résultats de l'étude phytochimique	99
3.4.1 Screening phytochimique	99
3.4.2 Dosage des composés phénoliques	100

3.4.3	Caractérisation des des extraits méthanoliques par HPLC-DAD-ESI-MS/MS	103
3.5.	Activités biologiques	111
3.5.1.	<i>In Vitro</i>	111
3.5.1.1.	Résultats de l'étude de l'activité antioxydante	111
3.5.1.2.	Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne	119
3.5.1.2.1	Activité antibactérienne	119
3.5.1.2.2	Activité anticandidosique	134
3.5.1.2.3	Résultats de l'activité leishmanicide	135
3.5.2.	<i>In Vivo</i>	150
3.5.2.1	Résultats de l'évaluation de la toxicité	150
3.5.2.1.1	Toxicité aiguë	151
3.5.2.1.2	Toxicité subaiguë des extraits méthanoliques	152
3.5.2.2.	Résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire	159
3.5.2.3.	Résultats de l'évaluation de l'activité antalgique	168
3.5.2.4.	Résultats de l'évaluation de l'activité antipyrétique	172
		177
	CONCLUSION	
	LISTE DES ABREVIATIONS	
	GLOSSAIRE	
	REFERENCES	
	APPENDICES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1.	Feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	18
Figure 1.2.	Fleurs d' <i>Inula viscosa</i>	18
Figure 1.3.	Exemples de quelques acides phénoliques de la série benzoïque	21
Figure 1.4.	Exemples de quelques acides phénoliques de la série cinnamique	21
Figure.1.5.	Structure de base des flavonoïdes	22
Figure 1.6.	Cycle évolutif de <i>leishmania</i>	30
Figure 2.1.	Localisation géographique de la région d'étude	39
Figure 2.2.	Coupes transversales à main levée et coloration	42
Figure 2.3.	Système d'extraction au Soxhlet	43
Figure 2.4.	Diagramme récapitulatif des étapes d'extractions	45
Figure 2.5.	Diagramme récapitulatif des activités biologiques étudiées	46
Figure 2.6.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols	50
Figure 2.7.	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	51
Figure 2.8.	Schéma des étapes de la réalisation du test des comètes	74
Figure 3.1.	Pourcentage des connaisseurs en phytothérapie	87
Figure 3.2.	Connaissance de la plante par la population	88
Figure 3.3.	Comment la population connaît la plante	88
Figure 3.4.	Les maladies traitées par <i>Inula viscosa</i>	89
Figure 3.5.	Parties utilisées de la plante	90
Figure 3.6.	Efficacité de la plante	91
Figure 3.7.	Effets secondaires d' <i>Inula viscosa</i>	91
Figure 3.8.	Traitement utilisé par la population questionnée	92
Figure 3.9.	Coupes transversale au niveau de la nervure principale de la feuille	93
Figure 3.10.	Détails des éléments conducteurs de la feuille d' <i>Inula viscosa</i>	94
Figure 3.11.	Limbe de la feuille d' <i>Inula viscosa</i>	94
Figure 3.12.	Détails des sites sécréteurs et des polis tecteurs	95
Figure 3.13.	Coupe transversale de la tige d' <i>Inula viscosa</i>	96
Figure 3.14.	Détails des éléments conducteurs de la tige d' <i>Inula viscosa</i>	96
Figure 3.15.	Détails des structures sécrétrices de la tige d' <i>Inula viscosa</i>	97
Figure 3.16.	Teneurs en phénols totaux des extraits d' <i>Inula viscosa</i>	101
Figure. 3.17.	Teneurs en flavonoïdes des extraits d' <i>Inula viscosa</i>	102
Figure 3.18.	Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	108
Figure 3.19.	Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique des fleurs	110

	<i>d'Inula viscosa</i>	
Figure 3.20.	Pourcentage du piégeage du radical libre DPPH des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i>	112
Figure 3.21.	Pourcentage du piégeage du radical libre DPPH des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i>	113
Figure 3.22.	Pouvoir de réduction du fer des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i>	116
Figure 3.23.	Pouvoir de réduction du fer des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i>	117
Figure 3.24.	Activité antibactérienne des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i> sur les bactéries à Gram négatif	123
Figure 3.25.	Activité antibactérienne des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i> sur les bactéries à Gram positif	124
Figure 3.26.	Activité antibactérienne des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i> sur les bactéries à Gram négatif	130
Figure 3.27.	Activité antibactérienne des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i> sur les bactéries à Gram positif	131
Figure 3.28.	Activité leishmanicide des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i> et SBIII sur la souche <i>L. infantum</i>	137
Figure 3.29.	Activité leishmanicide des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i> et SBIII sur la souche <i>L. major</i>	137
Figure 3.30.	Activité leishmanicide des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i> et SBIII sur la souche <i>L. infantum</i>	139
Figure 3.31.	Activité leishmanicide des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i> et SBIII sur la souche <i>L. major</i>	139
Figure 3.32.	Effet cytotoxique des extraits de feuilles <i>d'Inula viscosa</i> sur la viabilité des cellules THP-1	143
Figure 3.33.	Effet cytotoxique des extraits de fleurs <i>d'Inula viscosa</i> sur la viabilité des cellules THP-1	144
Figure 3.34.	Histogramme de la distribution des comètes de <i>L. infantum</i> des groupes traités par les extraits méthanoliques et du groupe témoin négatif	148
Figure 3.35.	Images des différentes classes de comètes (5 classes)	149
Figure 3.36.	Évolution du poids corporel des rats en fonction du temps	152
Figure 3.37.	Histologie du foie des rats témoins et des rats traités	157
Figure 3.38.	Histologie du rein des rats témoins et des rats traités	158
Figure 3.39.	Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris traitées par les extraits des feuilles	161
Figure 3.40.	Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris traitées par	162

	les extraits des fleurs	
Figure 3.41.	Pourcentage d'inhibition de l'œdème des oreilles des souris traitées par les extraits des feuilles	166
Figure 3.42.	Pourcentage d'inhibition de l'œdème des oreilles des souris traitées par les extraits des fleurs	167
Figure 3.43.	Pourcentage de réduction des crampes des souris traitées par les extraits des feuilles	169
Figure 3.44.	Pourcentage de réduction des crampes des souris traitées par les extraits des fleurs	170
Figure 3.45.	Pourcentage de réduction la fièvre des rats traités par les extraits des feuilles	173
Figure 3.46.	Pourcentage de réduction de la fièvre des rats traités par les extraits des fleurs	175
Tableau 1.1.	Usage traditionnel d' <i>Inula viscosa</i>	19
Tableau 1.2.	Répartition des leishmanies en Algérie et formes cliniques	31
Tableau 2.1.	Coordonnées géographiques du site de récolte d' <i>Inula viscosa</i>	39
Tableau 2.2.	Extraits secs obtenus	44
Tableau 2.3.	Souches microbiennes ATCC étudiées	58
Tableau 2.4.	Souches microbiennes isolées et identifiées étudiées (Pat)	59
Tableau 2.5.	Souches de leishmanies étudiées	64
Tableau 2.6.	Paramètres hématologiques et biochimiques étudiés	78
Tableau 3.1.	Rendement en extraits bruts des deux organes d' <i>Inula viscosa</i>	98
Tableau 3.2.	Résultats du screening phytochimique	100
Tableau 3.3.	Temps de rétention, absorbance UV et spectres de masse MS des composés phénoliques identifiés dans l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> (HPLC-DAD-ESI-MS/MS)	104
Tableau 3.4.	Temps de rétention, spectres UV et MS des composés phénolique (molécules proposées) contenus dans l'extrait méthanolique des fleurs d' <i>Inula viscosa</i> (HPLC-DAD-ESI-MS/MS)	109
Tableau 3.5.	Valeurs des EC50 du piégeage du DPPH des extraits d' <i>Inula viscosa</i>	112
Tableau 3.6.	Valeurs des EC50 du piégeage du fer des extraits d' <i>Inula viscosa</i>	117
Tableau 3.7.	Résultats de la CMI et de la CMB	133
Tableau 3.8.	Activité antifongique des feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	134
Tableau 3.9.	Activité antifongique des fleurs d' <i>Inula viscosa</i>	134
Tableau 3.10.	Effet du DMSO à 0,3% sur la croissance des souches de leishmanies	136
Tableau 3.11.	Valeurs des CI50 des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> et du SBIII	138

Tableau 3.12.	Valeurs des CI50 des extraits des fleurs d' <i>Inula viscosa</i> et du SBIII	140
Tableau 3.13.	Effet du DMSO à 0,3% sur les cellules THP-1	142
Tableau 3.14.	Index de sélectivité (IS) des extraits des feuilles vis-à-vis des souches de leishmanies	145
Tableau 3.15.	Index de sélectivité (IS) des extraits des feuilles vis-à-vis des souches de leishmanies	145
Tableau 3.16.	Score de l'endommagement de l'ADN de la souche L. Infantum traitée par les extraits méthanoliques et ceux du groupe témoin négatif	150
Tableau 3.17.	Poids des organes des rats témoins et traités par les extraits méthanoliques d' <i>Inula viscosa</i> L.	153
Tableau 3.18.	Paramètres biochimiques des rats traités et non traités par les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs	155
Tableau 3.19.	Paramètres hématologiques des rats traités et non traités par les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs	156
Tableau 3.20.	Evolution du changement de l'épaisseur des pattes des souris traitées par les extraits de feuilles	160
Tableau 3.21.	Evolution du changement de l'épaisseur des pattes des souris traitées par les extraits de fleurs	162
Tableau 3.22.	Différence du poids des oreilles des souris traitées par les extraits de feuilles	165
Tableau 3.23.	Différence du poids des oreilles des souris traitées par les extraits de fleurs	167
Tableau 3.24.	Nombre de crampes des souris traitées par les extraits des feuilles	169
Tableau 3.25.	Nombre de crampes des souris traitées par les extraits des fleurs	170
Tableau 3.26.	Activité antipyrétique des extraits de feuilles	173
Tableau 3.27.	Activité antipyrétique des extraits de fleurs	174

INTRODUCTION

La phytothérapie ou thérapeutique par les plantes a sans doute débuté dès la préhistoire et a été pratiqué dans toutes les civilisations. Elle permettait de soigner de façon empirique une multitude de maladies en utilisant différentes parties des plantes [1]. Avec l'avènement de la médecine moderne, la médecine traditionnelle a périclité dans de nombreux pays industrialisés [2]. Toutefois les plantes médicinales ont toujours suscité l'intérêt des chercheurs. En effet les progrès technologiques ont permis d'étudier de façon scientifique les effets de certaines plantes médicinales, d'identifier leurs compositions et d'en extraire des principes actifs qui ont servi de base à la fabrication de nombreux médicaments [3]. Cependant seul 6% du total estimé de 250 000 plantes supérieures ont été étudiées pour leurs éventuelles activités biologiques, tandis que 15% d'entre elles ont fait l'objet d'investigations phytochimiques [3] [4].

Les potentialités de recherche de molécules bioactives à partir des plantes sont donc encore très importantes [3] [4]. Les plantes produisent de nombreux métabolites secondaires tels que les huiles essentielles, les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins) et les alcaloïdes qui sont doués de nombreuses propriétés pharmacologiques [5] [6].

La région méditerranéenne avec son climat tempéré et sa situation géographique dispose d'une grande diversité végétale, en effet 10% des plantes supérieures sont trouvées dans une zone qui ne représente que 1,6% de la surface de la terre, avec environ 406 espèces utilisées en médecine traditionnelle [7]. Selon Myres et *al.*, [8], les pays méditerranéens détiennent presque 4,5% de la flore endémique mondiale.

L'Algérie de par sa position géographique qui s'étend entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne bénéficie de conditions écologiques hétérogènes et recèle une flore très riche et variée dont de nombreuses plantes médicinales qui sont toujours utilisées en médecine traditionnelle [9] [10].

Cette étude s'inscrit dans l'un des axes de recherche du laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé, et a pour but l'étude de la plante *Inula viscosa* L., (synonyme *Dittrichia viscosa*). C'est une plante vivace appartenant à la famille des Asteraceae, endémique du bassin méditerranéen [14] connue pour ses nombreuses vertus médicinales [10].

Cette étude s'articule autour de trois chapitres:

- Le premier regroupe des données bibliographiques sur la plante, sur les principales classes de métabolites secondaires y compris ceux d'*Inula viscosa* et sur les différentes activités biologiques étudiées.
- Le deuxième (matériel et méthodes) comprend plusieurs volets:
 - Une enquête ethnobotanique, qui permet de récolter des informations sur *Inula viscosa* L. et son utilisation dans certaines régions d'Algérie, en effectuant des enquêtes sur terrain.
 - Une étude histologique de certains organes de la plante afin de mettre en évidence l'agencement des tissus et des sites sécréteurs
 - Une étude phytochimique, par extraction, dosages et identification de quelques métabolites secondaires dans certains extraits des feuilles et des fleurs.
 - Une étude des effets thérapeutiques, par des tests biologiques:
 - *In vitro* : évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne (antibactérienne, anti-candidosique et antileishmanienne) de certains extraits de la plante.
 - *In vivo* : évaluation de l'activité anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique, ainsi qu'une étude de la toxicité de quelques extraits.
- Le troisième chapitre est réservé à la présentation et à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale qui résumera l'ensemble de ces résultats et par des perspectives.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Présentation de l'espèce *Inula viscosa* (L.)

Le genre *Inula* appartient à la famille des Asteraceae [15], qui regroupe une centaine d'espèces dont : *I. viscosa*, *I. crithmoides*, *I. helenium*, *I. royleana*, *I. britannica*, *I. japonica* retrouvées en Asie de l'Est, en Afrique du Nord et dans le sud de l'Europe [16] [17] [18] [19].

1.1.1 Etymologie

Selon Fauron et Moati [20], *Inula* viendrait du grec : Inéo qui signifie « je purge » , allusion à une des propriétés thérapeutiques de la plante et viscosa qui veut dire «visqueuse» [21].

Nom scientifique : *Inula viscosa* (L.) Aiton, synonymes : *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter ou *Cupularia viscosa* (L.) Godr. & Gren [14] [22] [23]

Nom vernaculaire : Magramane , Amagramane (Kabylie) , Mersitt [9] [10]

Nom commun : Inule visqueuse [10] [24]

Nom arabe :Tayoon [22] [25]

Nom anglais : sticky fleabane [26]

Au maroc, on la retrouve sous le nom de Trehla [27].

1.1.2 Systématique

Selon Quezel et Santa [9], Dupont et Guignard, [28], la systématique est la suivante:

Règne	Végétale
Sous règne	Tracheobionta ou plantes vasculaire
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Magnoliopsida ou dicotylédones
Sous classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae (composées)
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>viscosa</i> (L.)

1.1.3 Description botanique

C'est une plante annuelle, vivace glanduleuse-visqueuse, à forte odeur [29]. Elle pousse en buissons très denses de 0,5 à 1m de hauteur [10]. Elle possède une racine pivotante qui peut être assez développée, même dans les petites plantes [30] [31]. Ses tiges sont dressées, frutescentes à la base, pourvues d'un feuillage dense et présentent à leur sommet de nombreux capitules à fleurs jaunes. Ces dernières sont toutes fertiles [32] [33]. Les feuilles sont alternées, allongées à lancéolées, sessiles de 3 à 7 cm de long et de 0,6 à 1,8 cm de large. Leur bord est lisse ou denté et le sommet aigu (Figure 1.1). Toute la plante est recouverte de poils glanduleux qui libèrent une substance odoriférante et collante [9] [32] [34] [35]. La floraison s'étale de Septembre à Novembre, Les inflorescences sont paniculées, nombreuses, en capitules de couleur jaune (d'environ 10-20 mm de diamètre) (Figure 1.2). On observe des fleurs ligulées à la périphérie du capitule et des fleurs tubulées au centre [24] [32] [36]. Les fruits sont des akènes blanchâtres, velus, de 1 à 2 mm de long, surmontés d'une aigrette de poils assurant leur dissémination par le vent, comme c'est souvent le cas chez les Astéracées [33].

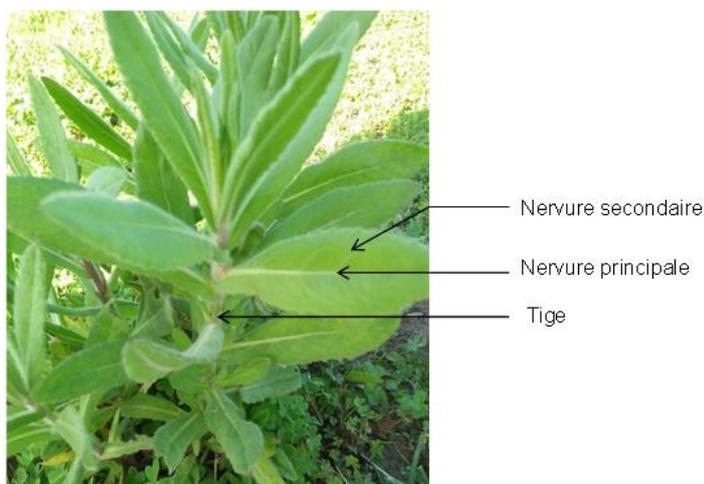


Figure 1.1. Feuilles d'*Inula viscosa* (Originale, 2016)

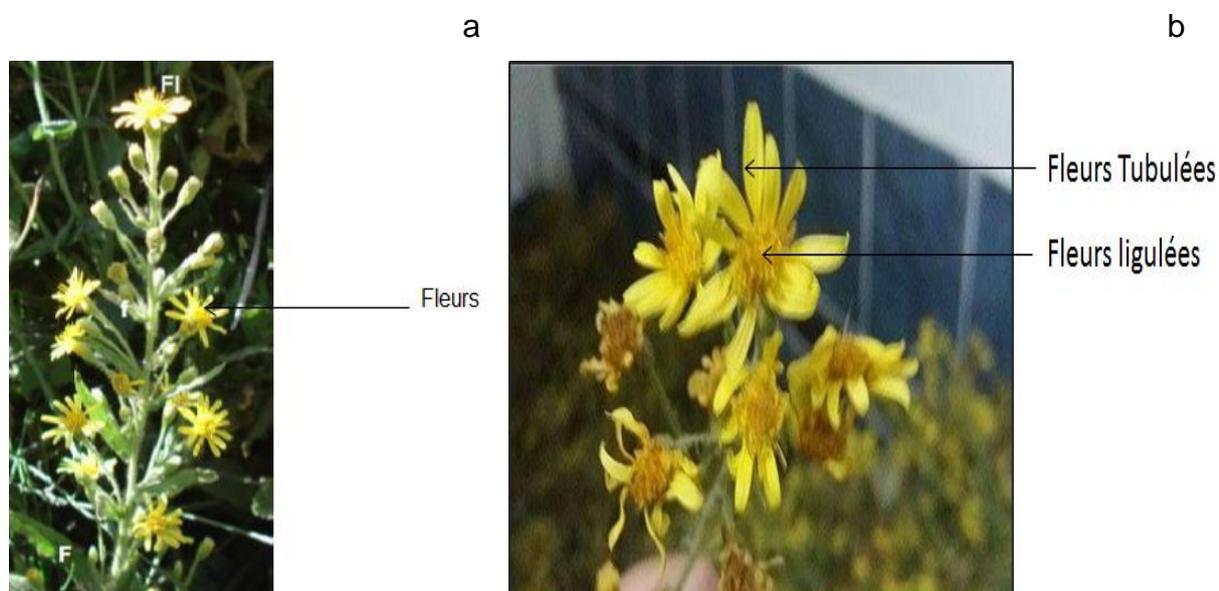


Figure 1.2. Fleurs d'*Inula viscosa*, a : [37]; b :(Originale, 2016).

1.1.4 Répartition géographique et habitat

Originnaire du bassin méditerranéen, l'inule visqueuse est largement distribuée dans le Sud de l'Europe (Espagne, France, Italie, Grèce), dans le Nord de l'Afrique (Algérie, Maroc, Tunisie), dans le Moyen-Orient (Jordanie, Palestine et Syrie) et en Turquie [38] [26] [29] [25].

Cette espèce pousse sur les lieux incultes ou anciennement cultivés (friches, talus), dans les garrigues, les rocailles, sur les terrains argileux et peu humides ainsi

que sous les oliveraies non soumises à un désherbage intensif [26] [29] [39] [40] [41]. En Algérie elle est très commune dans le Tell [41].

1.1.5 Utilisation traditionnelle d'*Inula viscosa*

L'Inule est une plante très connue, elle est utilisée depuis le moyen âge pour ses nombreuses vertus médicinales [21] (Tableau 1.1).

Dans la région méditerranéenne, elle est utilisée pour ses propriétés: anti-inflammatoire [42], analgésique [10], antipyrétique, antiseptique [43] et antidiabétique [44].

Tableau 1.1. Usages traditionnels d'*Inula viscosa*

Parties utilisées	Mode d'administration	Usages	Références
Racines	Orale	Hypertension, Tuberculose, Infections respiratoires et bronchiques.	Bellakhder [45]
Feuilles	Externe (Cataplasme)	Abcès, Gales, Dermatoses, impétigos, furoncles, ulcères	Hmamouchi <i>et al.</i> , [46]
	Orale	Anti-inflammatoire, Antilithique rénal, Diurétique, Antihypertensif, Hypoglycémiant, Vermifuge	Fresquet <i>et al.</i> , [47], Yaniv <i>et al.</i> , [44] Baba Aissa [10] Tahri <i>et al.</i> , [48]
	Externe	Antihémorragique, Anti-inflammatoire, Cicatrisant Analgésique, Antiseptique (plaies et brûlures), Traitement des hémorroïdes	Baba Aissa [10] Meddour et Meddour-Sahar [49] Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , [25]
Parties aériennes	Orale	Hypoglycémiant; Antihypertenseur Troubles cardiaques ; Vermifuge ; Antipyrétique	Baba Aissa, [10], Eddouks <i>et al.</i> , [50] Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , [25]

1.2 Substances actives des plantes médicinales

Les métabolites secondaires sont des composés produits par les végétaux. Ils appartiennent à des groupes chimiques variés [51] et sont souvent produits en faible quantité. Ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement, à la défense contre les prédateurs et les pathogènes et dans l'attraction des agents chargés de la pollinisation [52].

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs groupes, parmi eux on distingue : [53].

1.2.1 Composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent la base des principes actifs présents dans les plantes médicinales. Ils sont retrouvés en abondance dans les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits [54] [55]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside) [56] [57].

La classe des composés phénoliques renferme plus de 8000 composés. Ils sont divisés en plusieurs catégories qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) [51] [58] [59]. Les principales classes de composés phénoliques sont :

1.2.1.1 Acides phénoliques

Le terme d'acide phénol comprend tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxyle et un hydroxyle phénolique. Ils sont présents dans de nombreuses plantes agricoles et/ou médicinales [57] [60]. Les différences entre les acides phénoliques sont déterminées par les variations du nombre et de l'emplacement des groupements hydroxyles sur le cycle aromatique [61]. Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique [62].

➤ Les acides hydroxybenzoïques : Ils dérivent de l'acide benzoïque. La formule de base est de type C6-C1. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides. Parmi eux, on observe: l'acide salicylique, l'acide vanillique et l'acide gallique [51] [63] [64] (Figure 1.3).

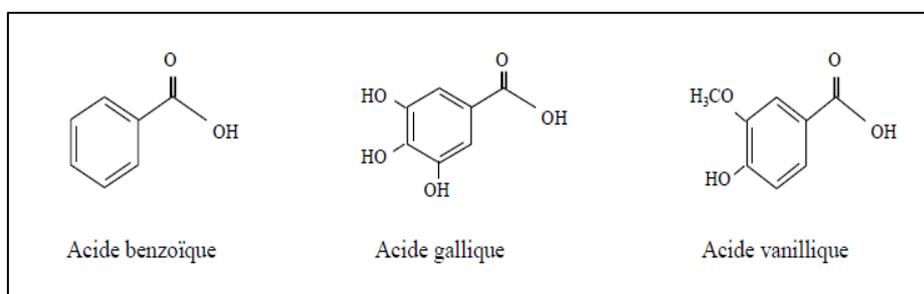


Figure.1.3. Exemples de quelques acides phénoliques de la série benzoïque [56] [65]

➤ Les acides hydroxycinnamiques : Ils dérivent de l'acide cinnamique. La structure de base est de type C6-C3. Parmi eux, on observe: l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide sinapique [56] [66] [6] (Figure 1.4).

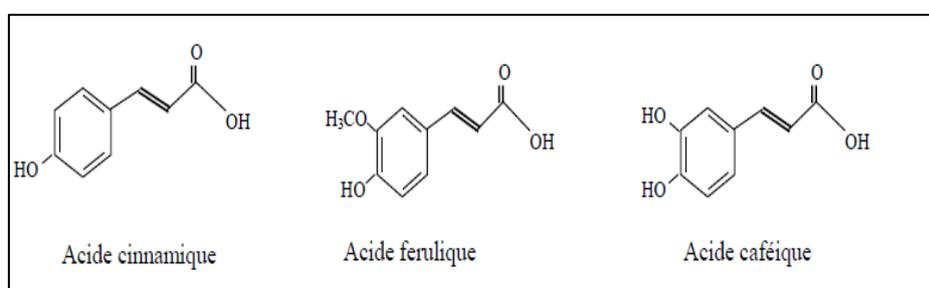


Figure 1.4. Exemples de quelques acides phénoliques de la série cinnamique [56] [65]

1.2.1.2 Coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles dérivent de l'acide hydroxycinnamique par cyclisation interne de la chaîne latérale. Parmi elles on observe : Umbélliférol et Aesculol [51] [66].

1.2.1.3 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [67].

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est basée principalement sur un squelette de 15 atomes de carbone arrangés en une configuration C6-C3-C6. Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques, deux cycles en C6 (noyaux A et B) et sont reliés entre eux par une chaîne en C3 formant ainsi un hétérocycle oxygéné (C) [56] [68] (Figure 1.5).

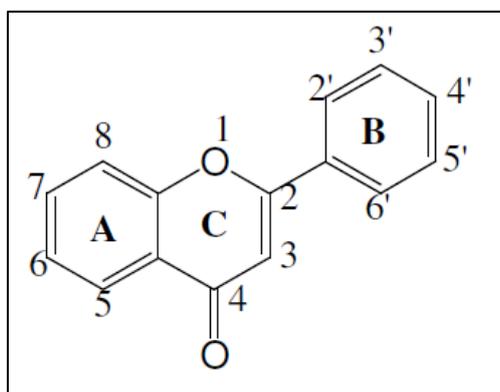


Figure. Structure de base des flavonoïdes [69] [70].

Selon leur structure, ils se divisent en : flavones, flavonols, flavanols, flavonones, iso-flavones, anthocyanidines et aurones [67] [71]. (Appendice A).

Selon Heller et Forkmann [72] ; Tapas et *al.*, [70] ; Narayana et *al.*, [73] , ces molécules existent soit sous forme libre dite aglycone (parmi eux : Lutéolin et Apigénine), soit sous forme d'hétérosides c'est-à-dire liées à des oses et/ou à d'autres substances.

1.2.1.4 Quinones

Les quinones sont des composés qui contiennent des cycles aromatiques présentant deux fonctions cétone. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les quinones d'origine naturelle sont largement

distribuées et comprennent les benzoquinones, les naphthoquinones, les anthraquinones, et les polyquinones [74] [75].

1.2.1.5 Tannins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles. Ce sont des molécules à poids moléculaire élevé [76]. Sur le plan structural on distingue deux grands groupes :

➤ Les tannins hydrolysables qui sont des esters d'un sucre (le glucose plus souvent), c'est à dire avec un noyau central de glucose sur lequel se fixe au moyen d'une liaison ester des acides (acide gallique pour le groupe des gallotanins, et acide ellagique pour le groupe des ellagitanins) [66] [77].

➤ Les tanins condensés appelés aussi proanthocyanidines qui résultent de la condensation de molécules de type flavane 3-ols (catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines) ou d'un mélange des deux [63] [66].

1.2.2 Composés terpéniques

1.2.2.1 Terpènes

Les terpènes sont fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles des plantes. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C5), communément appelée isoprène [78] [79].

D'après Bruneton, [56] ; Meyer et *al.*, [80] Ludwiczuk et *al.*, [81], selon le nombre répétitif de cette unité on distingue : les monoterpènes (C10) les. sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40) et les polyterpènes (C5)_n.

➤ Les monoterpènes (C10) : sont formés de deux unités d'isoprènes et peuvent être acycliques, monocycliques et bicycliques. Les monoterpénoïdes peuvent être de simples hydrocarbures insaturés ou peuvent avoir des groupes fonctionnels et être des alcools, des aldéhydes et des cétones [81] [82].

➤ Les sesquiterpènes (C₁₅) : sont constitués par l'union de trois unités isopréniques. Ils peuvent être linéaires, monocycliques, bicycliques et tricycliques. Ils constituent la classe la plus diversifiée des terpènes. A ces terpènes se rattachent un certain nombre des substances à fonction chimique : alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone [81] [82].

1.2.2.2 Stérols

Les stérols sont des lipides qui dérivent des triterpènes. Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane). Les stérols végétaux appelés "phytostérols", (le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol) sont répandus dans les plantes supérieures. [81].

1.2.2.3 Saponines

Les saponines aussi appelées saponosides [83] sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile [84].

1.2.3 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés plus ou moins basiques issus principalement des végétaux [85]. A l'état naturel on les retrouve sous forme de sels (tartrates et malates) ou combinés avec les tanins [66]. Généralement très amers et souvent toxiques, ils possèdent néanmoins certaines propriétés pharmacologiques [56] [86] notamment au niveau du système nerveux central où ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine) [66] [87] [88].

1.2.4 Métabolites secondaires d'*Inula viscosa*

La composition phytochimique de L'inule visqueuse a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mettre en évidence la présence de nombreuses molécules biologiquement actives. En effet les feuilles et/ou la partie aérienne de la plante renferment de nombreux acides phénoliques. La majorité sont

des acides hydroxycinnamiques à savoir les acides cafféoylquiniques (ACQ) comme l'acide 1-AQC ; le 3-AQC (acide chlorogénique), le 4-AQC (acide cryptochlorogénique) et l'acide 5-ACQ (acide néochlorogénique) [89] [90] [91] [92]., des acides dicafféoylquiniques (acide DCQ) comme le l'acide 1,3-DCQ ; l'acide 1,5-DCQ ; l'acide 3,4-DCQ ; l'acide 3,5-DCQ et l'acide 4,5-DCQ [89] [90] [91] [92]., ainsi que des dérivés de l'acide coumarique (acide p-coumarique) [91]. La partie aérienne est également riche en flavonoïdes sous forme aglycone, hétéroside, méthyle, hydroxyle et/ou acétyle. Parmi ces flavonoïdes on retrouve des flavonols comme la quercétine, la quercétine glucoside, la 3-méthoxyquercétine, la 3-méthoxyquercétine-7-glucoside, la quercétine glucuronide , la quercétine diméthyle éther; l'isorhamnétine, l'isorhamnétine glucoside ; le kaempférol ; 4-O-methyl-kaempférol [90] [91] [92] [93]; des flavanonols tels que la taxifoline et l'acétyle taxifoline [90] [91]; des flavones comme la lutéoline ; la népétine (methoxylutéoline), l'apégénine , l'apégénine glucoside; hispiduline [90] [91] [92] [94] [95] [96] [97] [98] et des flavanones tels que la sakurantine, la naringénine, le 7-O-Methylaromadendrin [90] [96] [99] [100].

Les huiles essentielles de la partie aérienne de la plante sont riches en sesquiterpènes tels que le Nérolidol, le E-Nérolidol, le Fokiénoïl, l'acide isocostique, le 12-Carboxy-eudesma-3,11(13) diène, l' α -cadinol, l' δ -cadinène, le Caryophyllène ; 1,4 diméthylazulène ; Chamazulène. Elles contiennent également des monoterpènes tels que le Bornéol, l'acétate d'isobornyl ; l'acétate de Bornyl, l'Eugénole, le Cinéole (Eucalyptol) [91] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107]. Certains acides gras ont également été identifiés dans les huiles essentielles (acide palmitique, acide linoléique) [105].

Dans certains extraits de la partie aérienne de la plante (acétone et/ou n-hexane) ont été identifiés des acides sesquiterpéniques comme l'acide costique, l'acide Isocostique, l'acide illicic, l'acide 2,5-Dihydroxyisocostique, l'acide 2,3-Dihydroxycostique, l'acide viscosique et l'acide viscique l'Acide 3 β -hydroxyillicique, l'acide 3 α -hydroxy-epiillicique, l'acide 2 α - hydroxyillicique et des lactones sesquiterpéniques tels que la tomentosine , l'inulviscolide, la carabrone [22] [108] [109] [110] [111] [112]. Des triterpènes ont également été identifiés dans la partie aérienne d'*Inula viscosa*, tels que l'acétate de damaradiénile, le 3 β -monacétate triterpénoïdes, le Ψ -taraxastérol, l'acide Ψ -taraxastérol [113] [114].

1.3 Activités biologiques

1.3.1 In vitro

1.3.1.1 Activité antioxydante

De nombreuses recherches indiquent que le stress oxydatif peut jouer un rôle important dans le développement et la progression de nombreuses maladies tels que le diabète, les maladies cardiovasculaires, les rhumatismes, le cancer et les maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson) [115] [116] [117] [118] [119].

1.3.1.1.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe. Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont les plus abondantes [120] [121].

1.3.1.1.2 Sources des radicaux libres

Il existe deux principales sources de production de radicaux libres dans l'organisme. Le métabolisme cellulaire et l'inflammation sont considérés comme les principales sources endogènes de radicaux libres [122] [123] [124]. Des sources exogènes peuvent également être à l'origine d'une importante production de radicaux libres tels que le tabagisme, l'exposition aux rayons U.V, les radiations ionisantes, les pesticides et les intoxications aux métaux lourds [122] [123] [124] [125] [126].

1.3.1.1.3 Causes possibles du stress oxydant

La balance entre les oxydants et les antioxydants est en temps normal équilibrée par des systèmes de défense extrêmement fins. De ce fait le stress oxydant signifie l'excès d'agents oxydants résultant soit d'une production trop importante d'ERO, soit d'une défaillance du système antioxydant [127].

Les radicaux libres peuvent être responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques [128].

1.3.1.1.4 Mécanismes de défense contre le stress oxydant

Les antioxydants sont des substances, qui à une plus faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat. Les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques [125] [129].

- Les antioxydants endogènes

Ils sont produits par l'organisme et constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant. Ils sont représentés par des enzymes comme : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase [128] [130].

- Les antioxydants exogènes

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et proviennent principalement de l'alimentation. De nombreuses substances pouvant agir comme antioxydants *in vivo* ont été proposées, notamment : la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (l'acide ascorbique), les caroténoïdes, les composés phénoliques (acide phénoliques, flavonoïdes) [121] [123] [131] [132].

Les antioxydants peuvent exercer leurs propriétés de protection à différents stades du processus d'oxydation et par différents mécanismes qui peuvent inclure le nettoyage des ERO, le piégeage des radicaux hydroxyles et peroxydes, l'inhibition de la dégradation des lipides hydroperoxydes en produits volatils indésirables, le captage de l'oxygène singulet et la chélation des métaux de transition [125] [128] [133].

1.3.1.2 Activité antimicrobienne

1.3.1.2.1 Activité antibactérienne

La découverte des antibiotiques a révolutionné le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne ce qui a contribué à l'augmentation de l'espérance de vie. Toutefois l'usage abusif et souvent inapproprié des antibiotiques a conduit à l'émergence de pathogènes multirésistants. La difficulté à devoir constamment synthétiser de nouvelles classes d'antibiotiques incite à rechercher et à concevoir des approches alternatives pour contrôler la résistance des bactéries [134] [135]

[136]. L'une des stratégies possible est la valorisation de molécules naturelles bioactives principalement à partir des plantes. Actuellement, des recherches ont mis en évidence le pouvoir antibactérien de diverses plantes riches en métabolites secondaires (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins, les terpènes, les glycosides, les quinones et les saponines) qui pourraient constituer une source potentielle de nouveaux agents antimicrobiens [137] [138] [139] [140] [141] [142].

Le mécanisme d'action des métabolites secondaires varie d'une molécule à une autre. Certains acides phénoliques agissent en endommageant la membrane cytoplasmique des bactéries provoquant ainsi une perte de l'intégrité de la membrane et conduisant à une fuite des constituants intracellulaires [143].

L'activité antibactérienne des flavonoïdes pourrait être attribuée soit à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, soit à l'endommagement de la membrane cytoplasmique ou à l'inhibition du métabolisme énergétique [144].

Le mécanisme d'action des terpènes n'est pas totalement compris mais il est en général supposé que les composés lipophiles provoquent des altérations de la perméabilité de la membrane cellulaire entraînant ainsi une fuite des ions [145] [146].

1.3.1.2.2 Activité anticandidosique

Chez l'Homme, les levures du genre *Candida* sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds chez certains sujets immunodéprimés ou ceux ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse) [147] [148] [149].

Le genre *Candida* appartient à la famille des *Saccharomycetaceae*. Ce genre comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* [150] [151].

L'émergence de la résistance aux antifongiques est l'une des principales raisons de l'échec du traitement [152] [153]. Par conséquent, il est nécessaire de découvrir de nouveaux agents antifongiques ou des alternatives plus sûres pour améliorer l'efficacité du traitement contre les infections à *Candida* à partir des ressources naturelles [154].

De nombreux composés phénoliques notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes ont montré une activité antifongique contre de nombreuses souches du genre *candida* qui pourrait être due à l'endommagement de la membrane cytoplasmique de ces levures [154] [155].

Certains composés terpéniques possèdent également une activité anticandidosique et agiraient en affectant l'intégrité de la membrane provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire [156] et/ou en inhibant la synthèse de la chitine des levures [157].

1.3.1.2.3 Activité antileishmanienne

1.3.1.2.3.1 Les leishmania

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinetoplastida et à la famille des Trypanosomatidae. Ils sont responsables de maladies parasitaires les leishmanioses. Elles sont transmises d'un vertébré à un autre par la piqûre d'un diptère appelé phlébotome femelle [158] [159].

Ce sont des parasites dimorphiques qui présentent deux stades morphologiques : une forme intracellulaire (amastigote) retrouvée à l'intérieur des cellules mononucléaires du système phagocytaire et une forme extracellulaire (promastigote) qui se multiplie à l'intérieur du tractus intestinal de l'insecte vecteur (phlébotome) [160].

1.3.1.2.3.2 Cycle évolutif

Les leishmanies ont un cycle de vie qui se déroule en deux phases (Figure 1.6) :

Au cours d'un repas sanguin, le phlébotome femelle (hématophage), s'infecte en piquant un mammifère infecté et ingère en même temps des macrophages contenant la forme amastigote du parasite [161]. Après leur passage dans le tube digestif du vecteur, les formes amastigotes se transforment en promastigotes procycliques, mobiles qui s'échappent à travers la membrane péritrophique qui les enveloppe et se multiplient successivement pour arriver au stade de promastigotes métacycliques infectieux très mobiles. Ils seront régurgités lors du prochain repas sanguin du phlébotome [162] [163]. La différenciation de la forme procyclique à métacyclique dure entre 4 à 7 jours [164].

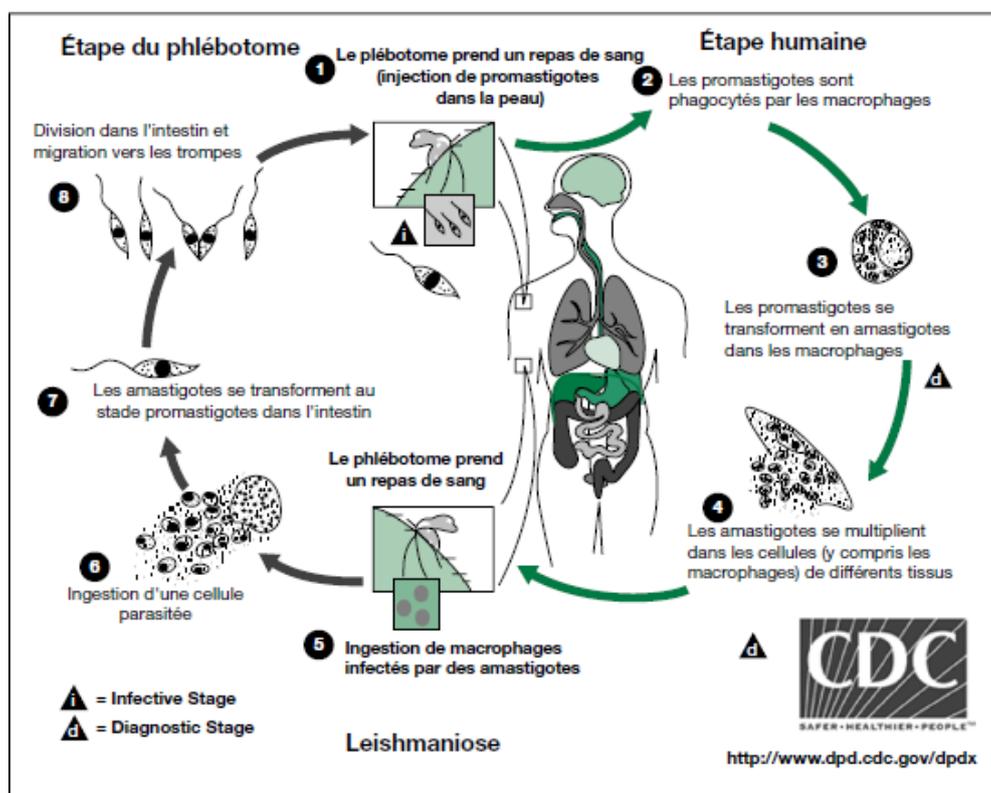


Figure 1.6. Cycle évolutif de leishmania [165]

1.3.1.2.3.3 Répartition géographique

On distingue deux grandes régions géographiques pour la répartition des leishmanies : l'ancien monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le nouveau monde (Amérique Centrale et du Sud) [166] [167].

En Algérie selon la forme clinique on distingue la forme viscérale et la forme cutanée [168] [169] (Tableau 1.2)

Tableau1.2. Répartition des leishmanies en Algérie et formes cliniques

Forme clinique	Espèce	Répartition géographique
Leishmaniose cutanée zoonotique	<i>L. Major</i>	Biskra, Bechar, Msila Harrat <i>et al.</i> , [168] ;Pratlong <i>et al.</i> , [170]
Leishmaniose cutanée du Nord	<i>L. Infantum</i>	Mila, Tiziouzou, Constantine Harrat <i>et al.</i> , [171]
Leishmaniose cutanée	<i>L. Killicki</i>	Ghardaïa Harrat <i>et al.</i> , [171]
Leishmaniose viscérale	<i>L. Infantum</i>	Illizi, Tamnerasset, Mila, Bejaia, Tizi-Ouzou Biskra Adel <i>et al.</i> , [172]

1.3.1.2.3.4 Traitement antileishmanien

La chimiothérapie (exp : antimoine, amphotéricine B) est le seul traitement disponible en raison de l'absence de vaccin [173] [174]. Des études ont néanmoins montré des cas de résistances et/ou de toxicité de ces thérapeutiques limitant ainsi leur utilisation [174] [175].

Par conséquent, il y a un besoin urgent de développement de nouvelles thérapeutiques anti-leishmaniennes à partir des métabolites secondaires de plantes [176]. De nombreuses études réalisées *In vitro* et/ou *In vivo* ont rapporté l'effet leishmanicide de certains acides phénoliques, flavonoïdes, tanins et terpènes [176] [177] [178] [179] [180] [181] [182].

1.3.2 In vivo

1.3.2.1 Etude de la toxicité

On qualifie de toxique, toute substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant entraîner sa mort [183] [184] [185]. L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose testée [184].

La toxicité des plantes médicinales peut être due aux composés actifs (terpènes, alcaloïdes, saponines, etc) qu'elles renferment ou à leurs interactions avec d'autres produits (plantes ou médicaments) par effet cumulatif ou synergique [186].

Selon Lapointe [187], il existe plusieurs types d'études qui permettent d'évaluer les effets d'un toxique :

- Etudes épidémiologiques comparant plusieurs groupes d'individus
- Etudes expérimentales *In vivo* utilisant des animaux (lapins, souris, rats)
- Etudes expérimentales *in vitro* : biochimiques, hématologiques ou cellulaires.

1.3.2.1.1 Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est définie comme l'ensemble des effets néfastes sur l'organisme. Elle est provoquée par une exposition de courte durée à une seule dose ou à plusieurs doses [110,112]. L'étude de la toxicité aiguë permet de déterminer la dose létale 50 % (DL₅₀) [188].

1.3.2.1.2 Toxicité subaiguë

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement après apparition, se révéler irréversibles [184] [189] [190].

L'étude de la toxicité subaiguë consiste en l'administration de doses répétées d'un produit durant une période pouvant être de 14, 28 ou 90 jours [191] [192].

1.3.2.1.3 Toxicité chronique

C'est l'exposition à de très faibles concentrations à des substances dont les effets cumulatifs finissent par provoquer des troubles beaucoup plus insidieux [193].

1.3.2.1.4 Manifestation de la toxicité

Pour évaluer les effets toxiques après l'ingestion d'une substance, les tests *in vivo* doivent également aborder les aspects pharmacotoxicologiques pour déceler un impact éventuel notamment les effets sur le foie et sur les reins [194].

➤ Effet sur le foie

Le foie est un organe très complexe. Il est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques, le stockage des nutriments et la détoxification de l'organisme par l'épuration des déchets [195].

➤ Principales lésions du foie

Toute affection hépatique (stéatose, cirrhose, nécrose) peut modifier le métabolisme des xénobiotiques et par conséquence induire une toxicité [185].

- Stéatose : un foie stéatosique se caractérise par une accumulation des triglycérides dans les hépatocytes pouvant être visualisée histologiquement par l'apparition de vacuoles contenant des lipides [196].
- Nécrose : c'est la mort des hépatocytes qui se traduit par une perte de l'intégrité des organites intracellulaires et de la membrane plasmique et par une augmentation progressive du volume cellulaire aboutissant à l'éclatement de la cellule [197].
- Cirrhose : c'est la destruction répétée des hépatocytes qui se caractérise par un dépôt de collagène dans la masse hépatique, séparés par les couches de fibroses. Les amas d'hépatocytes apparaissent sous forme de nodules [198] [199].

➤ Effet sur le rein

Le rein assure le maintien de l'équilibre hydrique, de l'osmolarité et de l'équilibre acido-basique des liquides dans l'organisme. Il élimine les déchets du métabolisme et les substances étrangères à l'organisme [200].

➤ Principales lésions du rein

Les atteintes rénales touchent principalement le glomérule en diminuant sa capacité de filtration ainsi que les tubules proximaux qui concentrent les toxiques [198]. Elles se manifestent par une:

- Nécrose : c'est une destruction des cellules épithéliales tubulaires, le tube proximal est le plus souvent affecté [201].
- Vacuolisation : le cytoplasme des cellules tubulaires (tubes proximaux) contient de nombreuses petites vacuoles, ces cellules peuvent apparaître gonflées comblant ainsi la lumière du tube [202] [203].

1.3.2.2 Activité anti-inflammatoire

1.3.2.2.1 Inflammation

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire (immunité Innée) et d'adaptation de l'organisme à une stimulation cellulaire excessive ou anormale due à une agression tissulaire d'origine diverse. Cette dernière peut être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. L'inflammation est diagnostiquée depuis près de vingt siècles, grâce aux signes cardinaux : tuméfaction, rougeur, chaleur, douleur [204] [205].

1.3.2.2.2 Types d'inflammations

On distingue classiquement deux types d'inflammation en fonction de la durée de la réaction :

- Inflammation aiguë

C'est la réponse immédiate à un agent agresseur qui selon le type et la sévérité de la lésion tissulaire se développe en quelques minutes ou plusieurs heures et persiste en général quelques heures à quelques jours. Elle se caractérise par une phase vasculo-exsudative, une phase cellulaire et une phase de réparation [206] [207].

- Inflammation chronique

Elle se manifeste pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois et se caractérise principalement par la persistance de la lésion tissulaire et la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique [207].

1.3.2.2.3 Physiopathologie de l'inflammation

La réponse inflammatoire est coordonnée par une large gamme de médiateurs qui forment un réseau de régulation complexe [208]. Selon Russo-Marie *et al.*, [209] ; Weille [210], la réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases :

- Phase vasculaire : Suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène se déclenche la production de nombreux médiateurs (histamine, sérotonine Bradikynine, prostaglandines et les cytokines).

- Phase cellulaire : Elle fait suite à la phase vasculaire et est caractérisée par l'afflux des leucocytes vers le tissu interstitiel.

- Phase de résolution et de réparation : Une fois l'agent agresseur éliminé par les polynucléaires neutrophiles les produits de dégradation et les cellules détruites sont

phagocytés par les macrophages, ces derniers vont libérer des cytokines et des médiateurs pour induire la cicatrisation et la régénération tissulaire par les cellules endothéliales.

1.3.2.2.4 Anti-inflammatoires

On distingue deux types d'anti-inflammatoires : Anti-inflammatoire stéroïdiens : corticoïdes synthétiques ou naturels (sécrétés par la cortico-surrénale) [211] [212] et les anti-inflammatoire non stéroïdiens : tels que : l'ibuprofène et le diclofénac qui inhibent la synthèse des prostaglandines. Cependant, leur utilisation thérapeutique à long terme est souvent associée à des effets secondaires tels que des ulcères gastro-intestinaux et une insuffisance rénale [213] [214] [215].

Les plantes médicinales possédant un effet anti-inflammatoire peuvent être une alternative aux anti-inflammatoire de synthèse en raison de leur moindre toxicité [216] [217]. Les composés phénoliques sont dotés de propriétés anti-inflammatoires. En effet certains acides phénoliques et flavonoïdes sont capables d'inhiber la synthèse de certains médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, l'histamine et les prostaglandines [218] [219] [220].

1.3.2.3 Activité antalgique

1.3.2.3.1 La douleur

Selon l'IASP (International Association for the Study of Pain), la douleur est une expérience sensorielle émotionnelle désagréable, due à une lésion tissulaire potentielle ou réelle, ou décrite dans ces termes [221] [222] [223].

Les stimuli peuvent être d'origine physique, chimique ou thermique et peuvent induire une réponse du système nerveux périphérique ou central [205] [224] [225].

1.3.2.3.2 Physiopathologie de la douleur

Dès que le corps est exposé à un message nociceptif externe les fibres nerveuses sensibles des tissus stimulés (nocicepteurs) sont activées. Une fois stimulés les nocicepteurs libèrent des neuromédiateurs, induisant une vasodilatation et une extravasation des protéines plasmatiques entraînant la stimulation des terminaisons nerveuses (inflammation neurogène). Le message nociceptif est ensuite transmis au cerveau où il sera traité [205] [224] [226] [227] [228] [229].

1.3.2.3.3 Antalgiques

Selon la classification de l'OMS, en fonction de la nature, de l'origine et de l'intensité de la douleur, on distingue les antalgiques du premier palier à action périphérique (le paracétamol et les AINS) et les antalgiques du deuxième et troisième palier à action centrale (opioïdes) [222] [230] [231] [232].

Des nombreuses études ont montré que les acides phénoliques et les flavonoïdes possèdent des effets analgésiques [233] [234] [235] [236]. Selon Verri et *al.*, [236] et Xiao et *al.*, [237], les flavonoïdes sont capables d'inhiber la douleur inflammatoire et neuropathique par des mécanismes induisant l'inhibition de la production de cytokines et de la prostaglandine.

1.3.2.4 Activité antipyrétique

La température corporelle humaine normale est de 37°C (entre 36.5 et 37.5°C) [238] [239]. La fièvre est l'un des premiers indicateurs cliniques de la maladie chez le mammifère ainsi que l'un des motifs de consultation médicale le plus fréquent dans le monde [240] [241]. C'est une augmentation de la température corporelle commandée par le centre thermorégulateur de l'hypothalamus suite à une réaction inflammatoire aiguë d'origine infectieuse, physique ou chimique [242] [243].

1.3.2.4.1 Physiopathologie de la fièvre

D'après Mandell et *al.*, [241] ; Martin et *al.*, [243] ; Hasllet et *al.*, [244] ; Walter [245] , Les substances responsables de l'élévation de la température sont dites pyrogènes exogènes . Elles induisent la production des certains cytokines (pyrogènes endogènes) qui vont stimuler la production des prostaglandines (PGE) au niveau des cellules endothéliales en contacts de l'hypothalamus. Les PGE pénètrent dans l'hypothalamus et modifient l'activité du centre régulateur de la température (thermostat) [243] [246] [247].

1.3.2.4.2 Antipyrétiques

Les antipyrétiques peuvent interrompre la réponse fébrile à n'importe quelle étape de la voie de synthèse des prostaglandines [248].

Les médicaments les plus employés de nos jours pour faire baisser la température sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les dérivés du para-aminophénol (paracétamol) [248] [249].

De nombreuse plantes médicinales ont montré des propriétés antipyrétiques, et ceci pourrait être attribué à leur richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques en raison de leur capacité à inhiber la synthèse des prostaglandines [250] [251] [252] [253].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel biologique

2.1.1.1 Matériel végétal

La présente étude a porté sur les feuilles et les fleurs d'*Inula viscosa*. Les feuilles ont été récoltées au mois d'Avril et les fleurs de fin d'Octobre jusqu'à début Novembre (2014 et 2015) dans la région de Tipaza aux pieds du mont Chenoua (Figure 2.1) (Tableau 2.1).

Une récolte supplémentaire des tiges a été réalisée en Avril 2014 afin de réaliser une étude histologique et un screening phytochimique de cet organe.

Tableau 2.1. Coordonnées géographiques du site de récolte d'*Inula viscosa*

Région d'étude	Altitude	Latitude	longitude
Tipaza (Chenoua)	112	36°35'32" Nord	2° 24' 32" Est



Figure 2.1. Localisation géographique de la région d'étude

L'identification de la plante a été faite au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques d'El-Harrach.

Les différentes parties de la plante ont été séchées séparément à l'ombre et à une température ambiante (18-25°C) afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Par la suite, elles sont broyées à l'aide d'un broyeur mécanique. La poudre obtenue est de couleur verte pour les feuilles et jaune pour les fleurs. Cette dernière sera conservée dans des flacons propres en verre hermétiquement fermés à l'abri de l'humidité.

2.1.1.2 Micro-organismes étudiés

Les bactéries et les levures utilisées sont identifiées et référencées par le laboratoire de stérilité et de microbiologie (Complexe Antibiotical SAIDAL, Médéa) et le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital El Hadi Flici ex EL-Kettar (Alger).

Nous avons également travaillé sur des bactéries pathogènes isolées et identifiées par le laboratoire central de l'hôpital El Hadi Flici ex EL-Kettar (Alger) et le laboratoire central de l'hôpital Frantz Fanon (Blida) ainsi que sur des levures du genre *Candida* isolées et identifiées par le laboratoire de mycologie et parasitologie de l'Hôpital Mustapha-Pacha (Alger).

Des souches de leishmanies provenant de la banque de souches du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie (Dely Ibrahim, Alger) ont également été utilisées.

2.1.1.3 Matériel animal

Pour l'évaluation des différentes activités biologiques des extraits *d'Inula viscosa*, nous avons effectué des tests sur des animaux de laboratoire.

- Pour l'étude des activités anti-inflammatoire et antalgique, nous avons utilisé des souris Swiss *Albinos* mâles et femelles de 25-30g fournies par le laboratoire de pharmaco-toxicologie du complexe Antibiotical SAIDAL, (Médéa).

- Pour l'étude de l'activité antipyrétique, des rats mâles *albinos Wistar* (150-200g) fournis par le laboratoire de pharmaco-toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL, (El Harrach) ont été utilisés.
- Pour l'étude de la toxicité aiguë, des tests ont été effectués sur des souris Swiss *Albinos* des deux sexes (20-30g) provenant de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba, Alger),
- Pour l'étude de la toxicité subaiguë, nous avons utilisé des rats mâles et femelles *albinos Wistar* (100-120g) provenant de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba, Alger).

Tous les rats et toutes les souris ont été maintenus sous un cycle lumière / obscurité de 12/12 h, à une température de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ et à une humidité de $50\pm 15\%$ constantes. Les femelles sont nullipares et séparées des mâles dans des cages différentes. Leur alimentation standard est réalisée par des granulés fournis par l'ONAB. Ils reçoivent de l'eau de robinet.

2.1.2 Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est présenté en appendice B.

2.2 Méthodes d'étude

2.2.1 Enquête ethnobotanique

Un sondage a été effectué dans le but de recueillir des informations sur le recours à la phytothérapie et plus précisément à l'utilisation traditionnelle de cette plante par les habitants de certaines régions (Tipaza et Blida). L'enquête a concerné un échantillonnage de 100 personnes représentant certaines catégories sociales, suivant un questionnaire précis (Appendice C).

Certes cet échantillonnage est insuffisant mais il nous permet d'avoir une idée générale mais précise sur l'utilisation de cette plante par les personnes interrogées.

2.2.2 Etude microscopique

Pour mettre en évidence les sites sécréteurs et connaître l'organisation des différents tissus, des coupes histologiques transversales à main levée ont été réalisées sur des tiges et sur des feuilles.

Pour cela, nous avons utilisé la technique de la double coloration en l'occurrence, le vert méthyle et le rouge congo (Figure 2.2) selon les étapes suivantes [254] :

- On plonge les coupes dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules de leur contenu,
- Après rinçage à l'eau courante pendant 5 à 10 min, on traite les coupes par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion du colorant,
- Par la suite on les lave à l'eau courante durant 5 à 10 min et on les place dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 5 à 10 min puis on les plonge dans le rouge Congo 15-20 min,
- Les coupes sont ensuite lavées à l'eau, puis montées entre lame et lamelle et observées au microscope photonique.

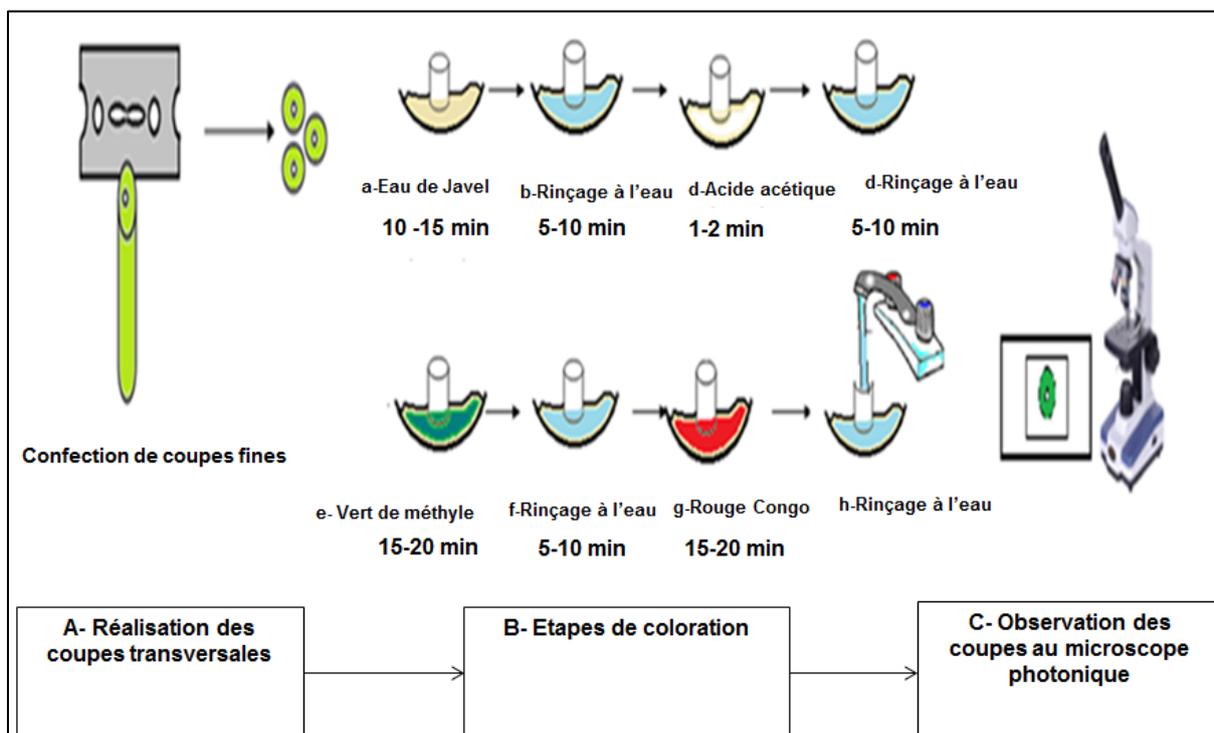


Figure 2.2. Coupes transversales à main levée et coloration

2.2.3 Extraction des métabolites secondaires

2.2.3.1 Extraction par Soxhlet

Un extracteur Soxhlet est un appareil constitué d'une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction par solvant continu d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide [255].

On introduit 50g de poudre végétale de chaque organe de la plante, feuilles ou fleurs dans une cartouche en papier filtre.

Cette dernière est placée dans le Soxhlet surmonté d'un réfrigérant. Une quantité de 500 ml d'un solvant (n-hexane) est versée dans un ballon qui contient un barreau d'agitation et est porté à ébullition (69°C). Le solvant est vaporisé puis condensé pour entrer en contact avec la matière végétale. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction (siphonage).

Après une quinzaine (15) de siphonages, on récupère dans le ballon le solvant enrichi en substances solubles. L'extrait obtenu est filtré à travers un papier filtre Watman n° 4. Après concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif (40-50°C), nous obtenons la fraction lipidique.

Le marc dégraissé par l'hexane est repris par le méthanol selon le même protocole (extraction par Soxhlet à 64,5°C) pour récupérer la fraction polaire. Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions (Figure 2.3) [256] [257].

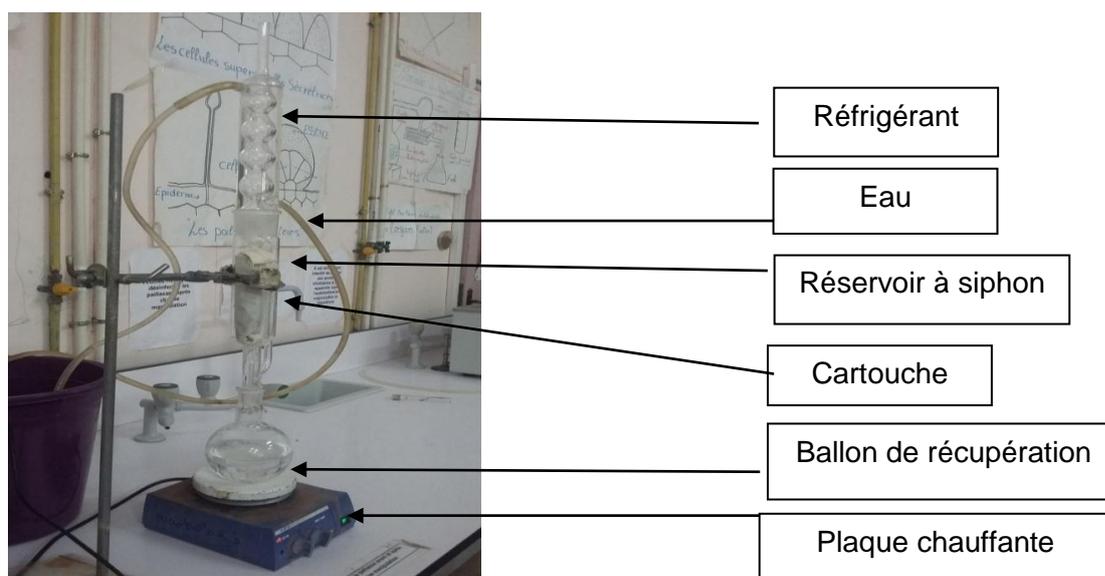


Figure 2.3. Système d'extraction au soxhlet (Original, 2016)

2.2.3.2 Préparation des décoctés

Pour la préparation des décoctés à 10%, 50 g de la poudre végétale de chaque organe de la plante feuilles ou fleurs sont portées à ébullition dans 500 mL d'eau distillée durant 15 minutes. Le mélange obtenu est ensuite filtré à travers un papier filtre Watman n°4 et évaporé sous pression puis lyophilisé pour obtenir un extrait sec [258] [259].

Les extraits secs (Tableau 2.2) obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 2.2. Extraits secs obtenus

Organe	Extraits obtenus	Abréviation
Feuilles	n-hexane	H/F
	Méthanolique	EMeOH/F
	Décocté	D/F
Fleurs	n-hexane	H/Flr
	Méthanolique	EMeOH/Flr
	Décocté	D/Flr

2.2.3.3 Rendement d'extraction

Le rendement (R) de la plante en extraits secs est le rapport entre la masse de l'extrait sec (M_E) et la masse de la poudre végétale (M_V) de la prise d'essai [257] [260]. Le rendement est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante:

$$R = \left[\frac{M_E}{M_V} \right] \times 100$$

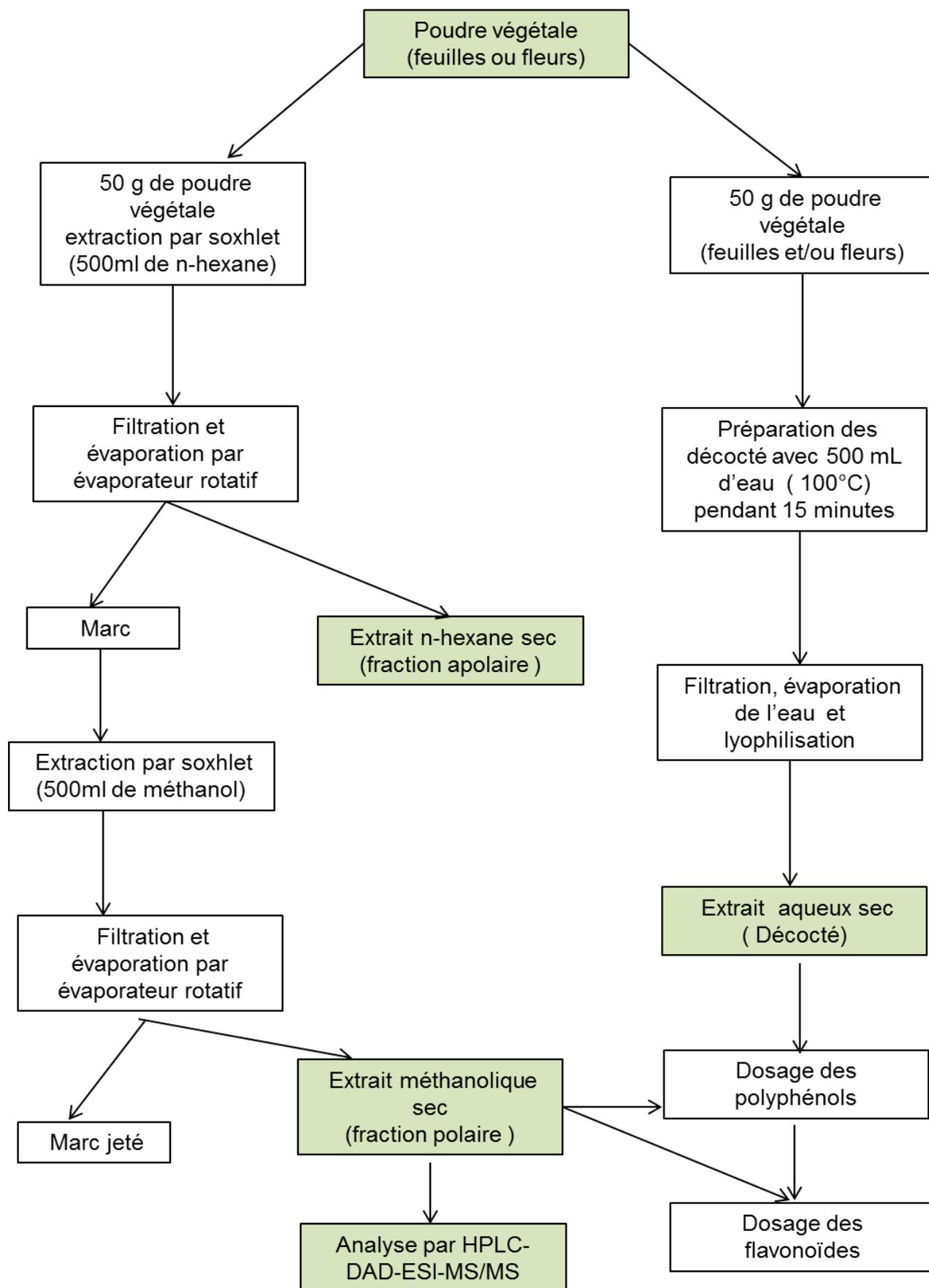


Figure 2.4. Diagramme récapitulatif des étapes d'extractions

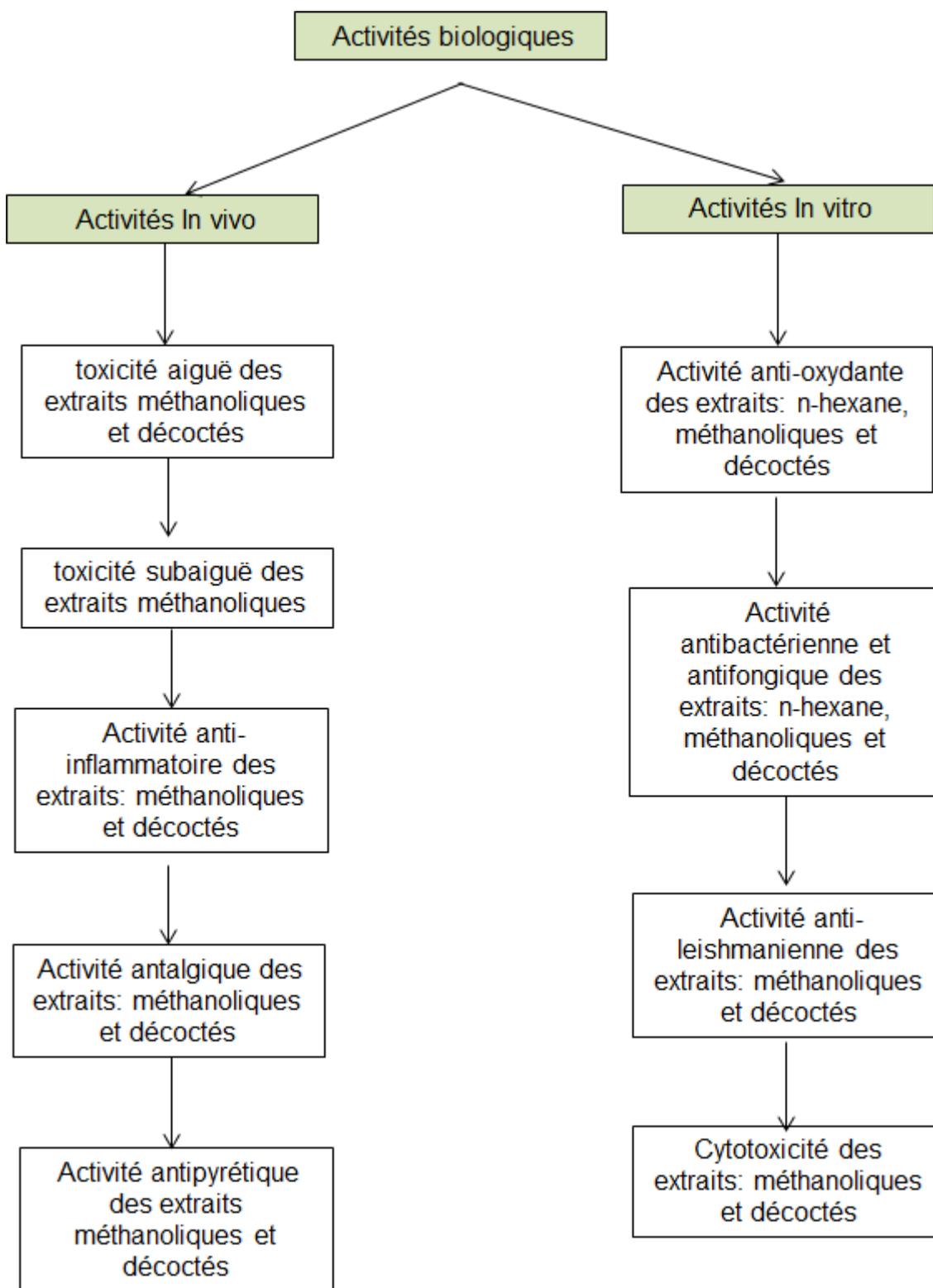


Figure 2.5. Diagramme récapitulatif des activités biologiques étudiées

2.2.4 Etude phytochimique

2.2.4.1 Screening phytochimique

Le screening phytochimique consiste à effectuer un ensemble de tests chimiques simples et rapides qui permettent de détecter différents types de composés chimiques [261] [262].

Les tests phyto-chimiques sont réalisés afin de rechercher les métabolites secondaires existants dans la plante. Ils sont effectués sur la poudre végétale des organes aériens de la plante.

- Recherche des flavonoïdes

On introduit dans un tube à essai 5 mL d'infusé à 5%, auquel on ajoute 5mL d'acide chlorhydrique et 1 mL d'alcool iso-amylique, puis quelques copeaux de magnésium. Une réaction de précipitation se produit durant quelques minutes. L'apparition d'une coloration rouge orangée indique la présence de flavonoïdes [263] [264] [265].

- Recherche des anthocyanes

On introduit dans un tube à essai 5 mL d'infusé à 5% auquel on ajoute 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4 1M), puis 5 mL d'ammoniaque (NH_4OH 1M). Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes [264] [266].

- Recherche des leuco-anthocyanes

On ajoute 20 mL d'un mélange de propanol /acide chlorhydrique (v/v) à 2 g de la poudre végétale. L'ensemble est porté à ébullition au Bain-marie pendant 3 min. Une coloration rouge se développe en présence de leuco-anthocyanes [263] [264].

- Recherche de tanins

- Recherche des tanins condensés

On ajoute 7 mL du réactif de Stiansy à 15 mL d'infusé à 5%. Le mélange est chauffé au Bain-marie (90°C) pendant 15 min. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de tanins condensés [267].

➤ Recherche des tanins galliques

On ajoute de l'acétate de sodium à 5 mL d'infusé à 5% jusqu'à saturation, puis on y ajoute goutte à goutte 1 mL de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une coloration bleue foncée révèle la présence de tanins galliques [265] [267] [268].

- Recherche des dérivés anthracéniques libres

On ajoute 10 mL de chloroforme à 1 g de poudre végétale, le mélange est chauffé au bain marie pendant 3 min puis filtré. A 1 mL de ce filtrat on ajoute 1 mL de d'amoniaque (NH_4OH 1M), l'ensemble est ensuite agité. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de dérivés anthracéniques libres [265] [269].

- Recherche des dérivés anthracéniques combinées

On ajoute 15 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4 2M) à 2 g de poudre végétale. Le mélange est mis en reflux pendant 2 heures. Après filtration, on ajoute 20 mL de chloroforme. Ce mélange est évaporé à sec, puis repris avec de l'ammoniaque (v/2v). L'apparition d'une coloration rouge révèle la présence de quinones combinées [267].

- Recherche des saponosides

On introduit dans une série de 10 tubes à essai 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 mL du décocté à 10%. Les différents tubes sont ajustés à 10 mL avec de l'eau distillée. Les solutions obtenues sont ensuite soumises à une forte agitation manuelle pendant 15 min dans le sens de la longueur des tubes. On laisse reposer les mélanges pendant 15 min. la formation d'une mousse persistante indique la présence de saponosides [270].

- Recherche des alcaloïdes

On fait humecter 5 g de poudre végétale avec 25 mL d'ammoniaque à 10% qu'on laisse macérer pendant 24 h dans 50 mL d'un mélange éther/chloroforme (3v/1v). Le

filtrat est additionné à 4mL d'acide chlorhydrique (HCl, 2M). A 1mL du filtrat, on ajoute 2 à 5 gouttes du réactif de Valser-Mayer. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence d'alcaloïdes [263] [264].

- Recherche des coumarines

On fait bouillir 2 g de poudre végétale dans 20 mL d'alcool éthylique pendant 15 min, puis on filtre. A 5 mL de ce filtrat, on rajoute 10 gouttes de la solution de KOH (10%) et quelques gouttes d'HCl (10%). La formation d'un trouble indique la présence de coumarines [264] [265].

- Recherche des glucosides

On ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4 1M) à 2 g de poudre végétale. La formation d'une coloration rouge brique puis violette indique la présence de glucosides [263] [267].

- Recherche des terpènes et des stérols

On ajoute 100 mL d'éther à 5 g de la poudre végétale, l'ensemble est macéré pendant 24 h. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec 1mL d'anhydride acétique puis 1mL de chloroforme. On dépose de l'acide sulfurique au fond du tube contenant l'extrait. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette [267].

2.2.4.2 Dosage des composés phénoliques

2.2.4.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux contenus dans les extraits : EMeOH/F ; EMeOH/Flr ; D/F et D/Flr est effectué par la méthode du Folin-Ciocalteu selon le protocole décrit par Singleton et Rossi [271], Pour cela, nous procédons comme suit :

On ajoute 1mL d'une solution de Folin-Ciocalteu (diluée 10 fois) à 200 μ L de chaque extrait (1 mg/mL), 4 minutes après 800 μ L d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés au mélange. Après 2 h d'incubation à l'obscurité et à

température ambiante, l'absorbance est mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

Le Blanc contient les mêmes réactifs en remplaçant l'échantillon par le solvant utilisé pour la solubilisation des extraits.

Une gamme étalon est préparé dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique à différentes concentrations pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage (Figure 2.6).

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits est calculée à partir de l'équation $y=ax+b$ de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g Es). Chaque essai est réalisé trois fois.

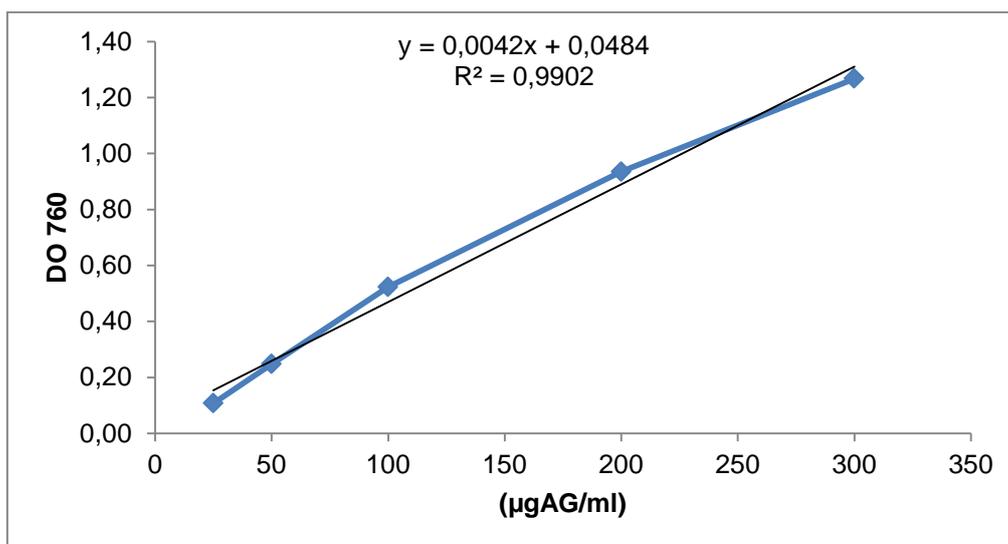


Figure 2.6. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

2.2.4.2.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des différents extraits (EMeOH/F ; EMeOH/Flr ; D/F et D/Flr) est déterminée par la méthode du chlorure d'Aluminium selon le protocole décrit par Bahorun et *al.*, [272], le protocole expérimental est le suivant :

On ajoute 1mL de la solution $AlCl_3$ (2%) à 1mL de chaque extrait (1 mg/mL). Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée contre un blanc à une longueur d'onde de 430 nm.

Le Blanc contient les mêmes réactifs en remplaçant l'échantillon par le solvant utilisé pour la solubilisation des extraits.

La quercétine à différentes concentrations est utilisée dans les mêmes conditions que les échantillons pour la préparation d'une courbe d'étalonnage (Figure 2.7).

La teneur en flavonoïdes des extraits est calculée à partir de l'équation $y=ax+b$ de la courbe d'étalonnage de la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g Es). Chaque test est réalisé trois fois.

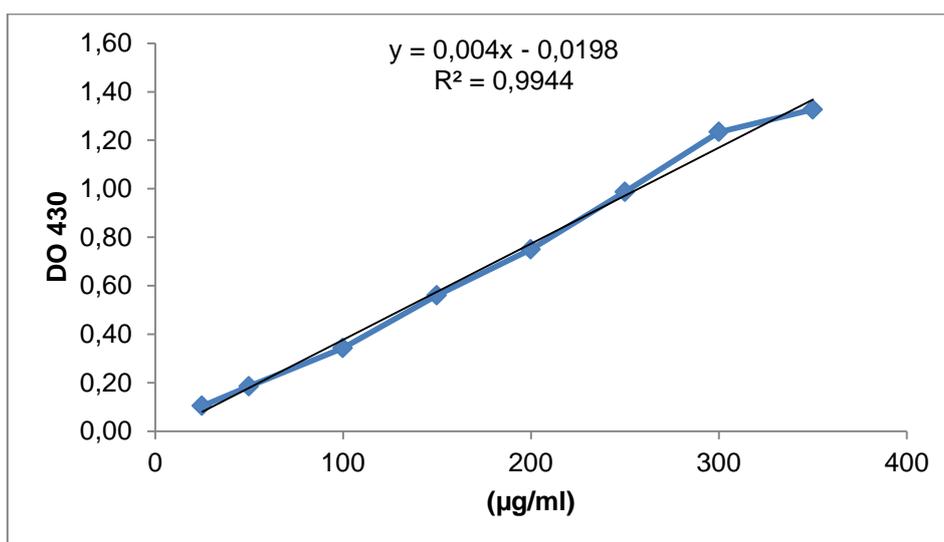


Figure 2.7. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

2.2.4.3 Analyse qualitative par HPLC-DAD-ESI-MS/MS

2.2.4.3.1 Principe

L'analyse des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* est réalisée en utilisant la Chromatographie à Haute Performance (HPLC) équipée d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) et couplée à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) à triple quadripôle équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) (HPLC-DAD-ESI-MS/MS).

- Chromatographe en phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

Le principe de la chromatographie liquide à haute performance peut être décrit comme suit :

La phase stationnaire, poreuse, est formée de petites billes contenues dans une colonne. Le liquide ou phase mobile, entre par une extrémité et sort par l'autre. Le solvant est déplacé activement par une pompe. Les molécules à analyser se déplacent différemment dans la colonne et prennent un certain retard dans la migration. Un détecteur placé à la sortie de la colonne va déceler le passage de chacune des substances. L'intensité de la réponse du détecteur va aussi permettre, après calibration, de donner la concentration de la molécule [273] [274].

La séparation des composés dépend de leur affinité pour les deux phases non miscibles, une phase stationnaire et une phase mobile (solvants d'élution de polarités différentes) [51] [274].

- Détecteur UV à barrettes de diodes (DAD)

Le détecteur à barrette de diodes est également un détecteur UV multi-longueurs d'ondes qui permet d'enregistrer simultanément la totalité du spectre UV de l'espèce éluee à différentes longueurs d'onde [275]. Le détecteur à barrette de diodes prend en continu un spectre UV de l'éluant au travers le développement complet du chromatogramme. Il s'ensuit qu'un chromatogramme peut être reconstruit en surveillant une longueur d'onde spécifique, ne représentant ainsi que les substances qui absorbent la lumière UV à la longueur d'onde choisie. [276].

- Source d'ionisation électrospray (ESI)

Le transfert des analytes ionisés de la phase liquide vers la phase gazeuse par ESI implique trois étapes : la dispersion d'une fine pulvérisation de gouttelettes, suivie de l'évaporation du solvant et l'éjection d'ions à l'état gazeux [277] [278].

Dans une source ESI, un flux continu de l'échantillon en solution (analyte+ éluant) est introduit dans la source à travers un tube capillaire en acier inoxydable ou en silice de quartz qui est soumis à un fort potentiel élevé (par exemple de 2,5 à 6,0 kV) induisant un champ électrique. Ce dernier entraîne la formation, d'une brume (spray) de gouttelettes fortement chargées. L'application d'un gaz (par exemple de l'azote) améliore la nébulisation. A l'aide d'une température de source ESI élevée et / ou d'un autre courant de gaz de séchage d'azote, les gouttelettes chargées sont continuellement réduites en taille par évaporation du solvant, entraînant la formation de gouttelettes de plus en plus fines jusqu'à ce que les ions à la surface des gouttelettes soient éjectés dans la phase gazeuse. Les ions émis sont échantillonnés par un cône et sont ensuite transférés dans l'analyseur de masse pour analyse ultérieure de la masse moléculaire et mesure de l'intensité des ions [277].

En mode positif la charge se fait généralement par protonation et donne des ions $[M+H]^+$, mais en mode négatif, la charge est déprotonée et donne des ions $[M-H]^-$ [278].

- Spectromètre de masse en tandem (MS/MS) à triple quadripôle

L'ESI transforme l'analyte en phase gazeuse sans rompre les liaisons covalentes et fournit les informations sur le poids moléculaire. Ce dernier seul ne permet pas de déterminer la structure d'un analyte inconnu. Ainsi, la fragmentation de l'analyte gazeux est requise pour l'élucidation structurelle [278]. Dans un système quadripolaire tandem typique, trois quadripôles sont mis en place de façon linéaire. L'analyte d'intérêt (habituellement appelé ion précurseur) est sélectionné en masse par le premier quadripôle (Q1) et peut entrer en collision avec un gaz de collision (habituellement de l'argon) dans une seconde cellule de collision quadripolaire qui opère en radio-fréquences « RF » (Q2), où les ions précurseurs sont activés par collision et subissent une fragmentation supplémentaire. Ce processus est connu sous le nom de dissociation induite par collision (DIC). Les ions fils issus de la DIC

sont liés à la structure moléculaire des ions et peuvent être surveillés par un troisième analyseur de masse quadripolaire (Q3) fournissant des informations structurales sur les ions moléculaires. Ce système en tandem est couramment désigné par MS / MS dans la littérature [277].

Lorsque les ions traversent un champ magnétique ou électrique, leur mouvement est affecté par leur rapport m/z qui est le principe de la séparation des ions dans la MS [277].

- Détecteur

Le détecteur sert à mesurer le nombre d'électron et à amplifier le signal pour atteindre une bonne sensibilité. Un moyen plus moderne de mesurer le faible flux d'ions est l'utilisation d'un multiplicateur d'électrons. Il s'agit probablement du mode de détection le plus utilisé en spectrométrie de masse de nos jours. Le schéma général est l'impact d'un ion sur la première surface conductrice, surface d'entrée du détecteur maintenue à très haute tension, qui va générer des électrons. Ces électrons sont accélérés vers une seconde surface qui va générer un plus grand nombre d'électrons. Au final, pour un ion arrivé sur la dynode d'entrée, un courant faible mais mesurable après amplification sera récupéré sur la dernière dynode [278][279].

2.2.4.3.2 Conditions opératoires

La séparation a été réalisée par une colonne ODS (125 mm de longueur ; 2mm de diamètre et 4 μ m de porosité). La phase mobile est constituée d'eau ultra pure contenant 0,1% d'acide acétique (solvant A) et d'Acétonitrile (solvant B). L'élution est réalisée à un débit de 250 μ L/min. Le gradient d'élution est le suivant: 0-1min (95% A), 1-30 min (40% A), 30-30,1 min (100% B), 30,1-37,1 min (95% A), 37,1-50 min (95% A). La température est fixée à 35°C et la quantité de l'échantillon injectée est de 25 μ L (1mg/mL). L'acquisition des spectres UV est réalisée entre 200 et 550 nm.

L'ionisation ESI est réalisée en mode négatif ce qui conduit à la formation d'ions moléculaires de type $[M-H]^-$, les paramètres d'ionisation et de fragmentation de chaque composé dépendent essentiellement de ses propriétés physicochimiques.

Les paramètres relatifs au fonctionnement du spectromètre de masse sont les suivants : Gamme de masse (mode fullscan) m/z (135-650), tension du capillaire : 3,2 kV, tension du cône : 40V, température de la source : 110°C, température du gaz (N₂): 400°C et tension du multiplicateur : 550 V.

2.2.4.3.3 Lecture

L'acquisition des données est effectuée par le logiciel MassLynx (Version 4.0). La tentative d'identification des différents composés est basée sur la comparaison de leurs spectres d'absorption en UV et leurs types de fragmentation en spectromètre de masse avec les spectres connus et ceux publiés dans la littérature.

2.2.5 Etude des activités biologiques d'*Inula viscosa* L.

2.2.5.1 Activités *In Vitro*

2.2.5.1.1 Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydante des extraits des plantes. Le potentiel antioxydant des différents extraits (H/F ; H/Flr ; MeOH/F ; MeOH/Flr ; D/F et D/Flr) a été évalué par la méthode relative au piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) ainsi que par la méthode de réduction du fer (FRAP).

2.2.5.1.1.1 Piégeage du radical libre DPPH

Le piégeage du DPPH est tributaire de sa réactivité avec des composés anti-radicalaires dont le mécanisme principal d'action se traduit par la réduction de ce monoradical en DPPHH suite au transfert d'un atome d'hydrogène [280].

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) est un radical libre stable qui montre une coloration violette foncée mais, lorsqu'il est réduit, cette coloration devient jaune pâle [280] [281].

Le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué selon la méthode décrite par Sanchez-Moreno et *al.*, [282] comme suit :

a. Préparation de la solution du DPPH

Une solution de 0,025 g/L de DPPH est préparée dans du méthanol absolu, le mélange de couleur violette est conservé à l'abri de la lumière pour éviter son oxydation.

b. Préparation des échantillons

On prépare une solution mère en dissolvant 1mg de chaque extrait dans 1mL de méthanol. A partir de cette solution, on réalise une série de dilutions de 0,6 ; 0,4; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0,01 mg/mL.

c. Mode opératoire

Dans des tubes stériles, on introduit 50µL de chaque concentration des différents extraits, auxquels on ajoute 1950 µL de la solution de DPPH, le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique (Abs) se fait à 515 nm.

Des solutions d'acide ascorbique (témoin positif) sont préparées dans les mêmes conditions que les échantillons. Un blanc composé de 50 µL de méthanol et 1950 µL de la solution de DPPH est également préparé pour le calcul des pourcentages d'inhibitions des extraits. Le témoin négatif est constitué uniquement de méthanol. Chaque essai est répété trois fois.

d. Expression des résultats

L'activité antioxydante exprime la capacité de piéger le radical libre. Elle est estimée par le degré de décoloration du DPPH en solution dans du méthanol selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs blanc}] \times 100$$

La valeur EC₅₀ (appelée aussi CI₅₀) est déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH [283].

Les valeurs moyennes des EC_{50} sont calculées à partir des régressions linéaires des trois répétitions de chaque extrait [283].

2.2.5.1.1.2 Pouvoir réduction du fer (FRAP)

La présence des composés réducteurs dans les extraits provoque la réduction des ions ferrique Fe^{3+} (Complexe ferricyanide) en ions ferreux Fe^{2+} . La formation du Fe^{2+} peut être évaluée en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700nm, par conséquent plus la coloration est intense plus l'échantillon analysé est considéré comme un bon réducteur [284].

Le pouvoir réducteur du Fe^{3+} par les différents extraits a été évalué selon la méthode décrite par d'Oyaizu [285] comme suit :a

a. Préparation des échantillons

On prépare une solution mère en dissolvant 1mg de chaque extrait dans 1mL de méthanol. A partir de cette solution, on réalise une série de dilutions de 0,6 ; 0,4; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0,01 mg/mL.

b. Mode opératoire

Dans des tubes stériles, on introduit 1mL de chaque concentration des différents extraits (0,6 ; 0,4; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0,01 mg/mL), auquel on ajoute 2,5 mL d'une solution tampon de phosphate (0,2 mol/L, pH=6,6) et 2,5 mL d'une solution de Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le mélange est vigoureusement agité puis incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes. Après incubation, on ajoute 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% pour stopper la réaction, les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. A 2,5 mL du surnageant sont ajoutés 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique $FeCl_3$ à 0.1%. La lecture de la densité optique se fait à 700 nm.

Les solutions d'acide ascorbique sont préparées dans les mêmes conditions que les échantillons. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions mais en remplaçant l'extrait par du méthanol. Chaque essai est réalisé trois fois.

c. Expression des résultats

L'absorbance augmente avec l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits.

Les valeurs moyennes des EC₅₀ correspondant aux concentrations efficaces donnant une absorbance de 0,5 de pouvoir réducteur du Fer, elles sont calculées par régressions linéaires des trois répétitions de chaque extrait [286].

2.2.5.1.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.2.5.1.2.1 Evaluation de l'activité antibactérienne et anticandidosique

a. Souches microbiennes étudiées

Dans cette partie, nous avons testé la sensibilité de certaines souches microbiennes référenciées (ATCC) et de quelques souches isolées à partir de prélèvements hospitaliers (Pat) (Tableaux 2.3 et 2,4), vis-à-vis des différents extraits de la plante (H/F ; H/Flr ; EMeOH/F ; EMeOH/Flr ; D/F ; D/Flr) (Appendice D).

Tableau 2.3. Souches microbiennes ATCC étudiées

	Souches	ATCC
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
	<i>Enterococcus faecalis</i>	51299
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	10536
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
Levure	<i>Candida albicans</i>	10231

Tableau 2.4.Souches microbiennes isolées et identifiées étudiées (Pat)

	Souches	Origine du prélèvement
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	Bronchique
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Urine
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Fissure Anal
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Pus d'une plaie
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Liquide céphalo-rachidien
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	Urinaire
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sécrétion nasale
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus d'une plaie
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Prélèvement distal protégé
	<i>Salmonella spp.</i>	Selles
Levure	<i>Candida albicans</i>	Vaginale
	<i>Candida glabrata</i>	Vaginale
	<i>Candida tropicalis</i>	Ongle de la main
	<i>Candida parapsilosis</i>	Ongle de la main

b. Principe de la technique de diffusion sur milieu gélosé

On a utilisé la méthode de diffusion sur milieu gélosé [287]. Elle consiste à déposer des disques de papier Wattman imprégnés des substances actives à étudier à la surface d'une gélose préalablement inoculée avec une suspension de la souche à tester. Après incubation, une zone d'inhibition circulaire se forme autour des disques, traduisant l'inhibition de la croissance de cette souche [288] [289].

Toutes les étapes de l'activité antimicrobienne sont réalisées dans des conditions d'asepsie devant un Bec bunsen

c. Contrôle microbiologique des souches

Avant la réalisation des tests, toutes les souches bactériennes subissent des repiquages, des examens microscopiques, des colorations de Gram et des identifications biochimiques afin de s'assurer de leur identité et de leur pureté.

d. Préparation des cultures microbiennes

On ensemence les différentes souches bactériennes dans des tubes à essai contenant un bouillon nutritif, ces derniers sont incubés à 37°C pendant 24 h. A partir des différents tubes on ensemence les souches par la méthode de stries sur des géloses nutritives préalablement coulées dans des boîtes de Pétri qu'on incube à 37°C pendant 24 h.

Les levures du genre *Candida* sont égalementensemencées par la méthode de stries, sur milieu Sabouraud déjà coulé dans des boîtes de Pétri, puis sont incubées à 25°C pendant 48 h.

e. Préparation des extraits

On prépare à partir des différents extraits à tester trois concentrations de 50 ; 100 et 200 mg/mL de DMSO.

f. préparation des milieux de culture

On fait fondre les différents milieux de cultures (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) dans un Bain-marie à 90±3°C. Après liquéfaction des milieux, on les verse aseptiquement dans des boîtes de Pétri à raison de 10 mL par boîte et on les laisse se solidifier à température ambiante sur la paillasse.

g. Mode opératoire

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes de 24 h de chaque bactérie (3 à 5 colonies). Ces dernières sont émulsionnées dans 9 mL d'eau physiologique stérile. La densité optique des différentes suspensions bactériennes est ensuite ajustée à 0,5 MC Farland à l'aide d'un densitomètre ce qui correspond à une concentration de 10⁸ UFC/mL [290].

La suspension de levures est préparée selon le même protocole à partir de cultures de 48 h (4 à 5 colonies) pour obtenir un inoculum de 10⁸ UFC/mL.

Les différents inoculums ainsi préparés doivent être ensemencés dans les 15 minutes qui suivent leur préparation.

- Ensemencement des boîtes

On imbibe un écouvillon stérile avec l'inoculum préparé et on l'ensemence en stries serrées sur la gélose appropriée en faisant pivoter la boîte de pétri horizontalement à 60°, pour couvrir toute sa surface.

- Dépôt des extraits et incubation

On imbibe des disques stériles de 6 mm de diamètres avec 15 µL de chaque concentration d'extrait à tester, que l'on dépose sur la surface de la gélosé préalablement ensemencée avec la suspension microbienne. Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 minutes, puis dans une étuve à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour les levures [288] [289]. Chaque test est réalisé trois fois.

Une boîte dite témoin négatif ne contenant que le milieu de culture, le germe à étudier et les disques imbibés par du DMSO est préparée dans les mêmes conditions afin de vérifier l'effet du DMSO sur les souches étudiées.

Des témoins positifs à base d'antibiotiques (Vancomycine à 30µg par disque/Gram positif et Imipéneme à 10µg par disque /Gram négatif) ou d'antifongiques (Nystatine à 10µg par disque /Levures) sont également testés sur les souches dans les mêmes conditions que les extraits.

- Lecture

Après incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibitions (DZI) formée autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse (mm) [291].

Selon Ponce et *al.*, [292], la zone d'inhibition est définie comme étant une auréole claire formée autour du disque, où aucune croissance n'est observée.

D'après Carović-Stanko et *al.*, [293], Les résultats sont classés suivant la sensibilité des souches vis-à-vis des substances testées comme suit :

- Diamètre < 10mm : souche non sensible ou résistante
- Diamètre de 10 à 15 mm : souche moyennement sensible
- Diamètre de 15 à 19 mm : souche très sensible
- Diamètre \geq 20 mm: souche extrêmement sensible

g. Détermination des paramètres antibactériens (CMI, CMB)

La CMI et CMB vis-à-vis des souches de *Candida* n'ont pas été réalisées

g.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Elle est définie comme étant la plus faible concentration de la substance à tester à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée au bout de 24h [294]. Elle est déterminée pour les extraits qui présentent une zone d'inhibition \geq à 15 mm.

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de contact direct en milieu liquide [295].

- Préparation de l'inoculum

Deux colonies bactériennes d'une culture jeune de 24 heures sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et émulsionnées dans un tube à essai stérile contenant 10mL du bouillon Muller-Hinton. Le mélange est incubé à 37°C pendant 3 h. Après cette incubation, une suspension de 0,3 mL de cette pré-culture est prélevée et diluée dans 10 mL du bouillon Muller-Hinton puis homogénéisée.

- Préparation de la gamme de concentration

On prépare à partir des extraits à tester une solution mère d'une concentration de 100 mg/mL à partir de laquelle une série de dilutions au demi est réalisée dans des tubes à hémolyse afin d'obtenir une gamme de concentrations allant de 50 mg/mL à 1.56 mg/mL.

- Réalisation du test

On introduit 1 mL de chaque concentration dans un tube à essai contenant 1mL de l'inoculum bactérien. Deux tubes ne contenant pas d'extrait sont préparés afin de servir de témoin de contrôle de la croissance des germes et de la stérilité du milieu. Les différents tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures.

- Lecture et interprétation

Après incubation, on effectue une observation à l'œil nu des différents tubes et la plus faible concentration à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée (milieu trouble) correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

g.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) désigne la plus petite concentration d'une substance qui laisse au maximum 0,01% de bactéries survivantes après 24 heures d'incubation à 37 °C [295].

On prépare des dilutions allant 10^{-1} à 10^{-4} de l'inoculum de départ. Ces dilutions sontensemencées à l'aide d'une anse en stries (sur 5 cm de long) sur des boites de Pétri contenant du milieu Muller-Hinton solide. Ces boites nommées 'A' sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après la lecture des CMI, les tubes dans lesquels il n'y a pas eu de croissance visible de bactérie servent à ensemenecer en stries, sur 5 cm de long, des boites contenant de la gélose Muller-Hinton. Cette série de boîtes de Pétri est nommée 'B' et est incubée à 37°C pendant 24 heures.

La CMB est ensuite déterminée en comparant la croissance bactérienne des boites A et B. Le premier tube expérimental dont le nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} (0,01% de croissance) correspondra à la CMB.

a. Calcul du rapport CMB/CMI

Le rapport CMB/CMI permet de préciser la modalité d'action de la substance testée [296].

Selon Oussou et *al.*, [297], l'extrait est bactéricide si le rapport CMB/CMI ≤ 4 . Il est dit bactériostatique quand le rapport CMB/CMI > 4 .

2.2.5.1.2.2 Evaluation de l'activité antileishmanienne

2.2.5.1.2.2.1 Activité antileishmanienne sur la forme promastigote

a. Souches de leishmanies

Dans cette étude, les souches utilisées sont conservées dans de l'azote liquide (Tableau 2.5).

Tableau 2. 5. Souches de leishmanies étudiées

Code OMS	Espèce	Zymodème
MHOM/DZ/2005/LIPA 15/05	<i>Leishmania Infantum</i>	MON 1
MHOM/DZ/2009/LIPA 100/09	<i>Leishmania major</i>	MON 25

b. Principe

La culture des promastigotes en milieu axénique permet le criblage de l'activité anti-leishmanienne de nombreuses molécules. Cette méthode d'évaluation repose sur l'estimation de la viabilité ou l'inhibition de la prolifération des cellules parasitaires [298].

L'activité leishmanicide est réalisée suivant les protocoles opératoires internes du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

c. Décongélation et entretien des souches

Les souches sont retirées de l'azote liquide et décongelées sous la hotte pendant 3 minutes puis transférées rapidement dans des tubes contenant du milieu Novy-Mc Neal-Nicolle (NNN). La viabilité et la mobilité des parasites sont vérifiées entre lame et lamelle sous microscope optique. Les tubes sont incubés à 25°C pendant 5 jours.

d. Préparation de la suspension parasitaire (Promastigotes)

On prélève 200 µL de chaque culture parasitaire à partir des tubes NNN (Novy Nicolle Mc Neal) que l'on ajoute à 2 mL de RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau fœtal) pour préparer la première suspension. Les tubes sont ensuite incubés à 25°C pendant 5 jours. Un

deuxième passage sur milieu RPMI est réalisé en rajoutant 200 μ L de la première suspension à 2 mL de RPMI (10% de SVF) qu'on incube à 25°C pendant 5 jours.

Les suspensions parasitaires obtenues sont centrifugées à 2500 rpm pendant 10 min. On récupère le culot contenant les parasites et on le remet en suspension dans du RPMI frais.

Le comptage des parasites est réalisé sur cellule Thoma sous microscope optique en mélangeant 20 μ L de la suspension de leishmanies, 20 μ L de formol à 10% et 20 μ L de bleu de Trypan.

Les suspensions parasitaires sont ensuite ajustées à 10^6 dans du RPMI et incubées à 25 °C pendant 5 jours. Au bout des 5 jours, les cultures parasitaires sont à nouveau ajustées à volume constant dans du RPMI (10^6 parasites/mL de RPMI) pour tester l'activité leishmanicide des extraits.

e. Préparation des extraits

On dissout l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr dans du DMSO, puis on les dilue dans du RPMI de manière à ce que la concentration finale de DMSO ne dépasse pas 0,3%. Quant aux D/F et D/Flr, ils sont dissouts directement dans du RPMI.

Les extraits sont par la suite filtrés à travers des membranes de PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,22 μ m de porosité pour assurer leur stérilité.

On prépare une série de dilutions à partir de chaque extrait (6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 μ g/mL de RPMI).

f. Mode opératoire

Dans des microplaques stériles à fond plat (96 puits), on met en contact 10 μ L de chaque concentration d'extrait avec 80 μ L de la suspension parasitaire (10^6 parasites/mL de RPMI).

Un témoin négatif est réalisé en remplaçant les 10 μ L d'extrait par du RPMI, un témoin positif est également préparé en utilisant le produit de référence : antimoine (SBIII) aux mêmes concentrations que les extraits. L'effet du RPMI à 0,3% de DMSO est également vérifié. Les microplaques sont ensuite incubées à 25°C pendant 72h [299] [300].

On prépare deux microplaques différentes pour faire une lecture au Bleu de Trypan (Chaque test est réalisé quatre fois) et une lecture au MTT (Chaque test est réalisé trois fois) [299] [300].

Dans la microplaque destinée à la révélation par le MTT, on prévoit deux puits qui contiennent 10µL de chaque concentration d'extrait avec 80µL de RPMI ; ces derniers vont nous permettre de mesurer la DO du bruit de fond (coloration de l'extrait). Deux autres puits contenant uniquement du RPMI (90 µL) sont préparés pour mesurer la DO du bruit de fond du RPMI (bruit de fond du témoin négatif).

g. Révélation au Bleu de Trypan

- Principe

Ce test est utilisé pour déterminer le nombre de cellules viables présentes dans une suspension cellulaire. Il est basé sur le principe que les cellules vivantes possèdent des membranes cellulaires intactes qui excluent certains colorants, tels que le bleu Trypan, contrairement aux cellules mortes. Dans ce test, une suspension cellulaire est simplement mélangée avec une quantité de colorant, puis examinée visuellement pour déterminer si les cellules absorbent ou excluent le colorant, une cellule viable aura un cytoplasme clair alors qu'une cellule morte aura un cytoplasme bleu [299].

- Mode opératoire

Après incubation, on procède à la coloration au bleu de Trypan en mélangeant 10 µL de la suspension parasitaire de chaque micropuits avec 10 µL de formol (10%) et 10 µL de bleu de Trypan. L'ensemble est déposé sur une cellule Thoma pour réaliser un comptage visuel des promastigotes viables sous microscope optique (Appendice E).

- Expression des résultats

Le pourcentage de viabilité des parasites est calculé suivant la formule [299] :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{MPech}{MPT} \times 100$$

- MPech : Moyenne des parasites pour chaque concentration d'extrait
- MPT : Moyenne des parasites dans les puits témoins

La valeur CI_{50} est déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui entraîne la mort de 50% des parasites [301].

h. Révélation au MTT

- Principe

Ce test est basé sur la conversion du MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (Jaune) en cristaux de formazan (Violet) par des cellules vivantes, ce qui détermine l'activité mitochondriale des cellules. L'intensité de la coloration violette est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Ainsi, toute augmentation ou diminution des cellules viables peut être détectée en mesurant la concentration de formazan reflétée en densité optique (DO) en utilisant un lecteur de plaque à 540 nm [302].

- Mode opératoire

Après incubation des plaques destinées à la lecture par réduction du MTT, On ajoute 10 μ L de MTT à 10mg/mL à chaque puits. Les microplaques sont incubées de nouveau à 37°C pendant 4h. On rajoute ensuite dans chaque puits 100 μ L d'une solution d'isopropanol à 50% et SDS 10% qu'on laisse agir pendant 30 min à température ambiante sous agitation. La densité optique est enfin mesurée à 570nm à l'aide d'un lecteur ELISA [300].

- Expression des résultats

Le pourcentage de viabilité des leishmanies est calculé selon la formule [303] :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{(MDO - DO_{BDF}) \text{ échantillon}}{(MDO - DO_{BDF}) \text{ témoin négatif}} \times 100$$

MDO : Moyenne de la densité optique

BDF : contient l'extrait sans le parasite

Les valeurs des CI_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) sont déterminées pour chaque extrait.

2.2.5.1.2.2.2 Evaluation de la cytotoxicité

a. Principe

L'étude de la viabilité des cellules est souvent utilisée pour le criblage des composés afin de déterminer si ces molécules ont un effet sur la prolifération cellulaire ou des effets cytotoxiques directs conduisant à la destruction des cellules. Quel que soit le type de cellules étudiées il est important de connaître à la fin du test le nombre de cellules viables restantes pour déterminer l'effet cytotoxique du produit testé [304].

Le test de cytotoxicité des extraits est réalisé sur des macrophages issus de la différenciation *In vitro* de la lignée de cellules monocytaires : THP-1 suivant le protocole interne du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie

b. Mode opératoire

- Différenciation des monocytes (THP 1) en macrophages

On met en culture dans des flasques 200 μ L de la suspension de cellules dans 2 mL du milieu RPMI qu'on incube ensuite à 37°C à 5% de CO_2 pendant 3 à 4 jours. Après incubation les flasques sont mélangées et centrifugées à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le comptage des cellules est réalisé sur cellule Thoma sous microscope optique après coloration au bleu de Trypan (30 μ L de la culture+30 μ L de bleu de Trypan). La culture cellulaire est ensuite ajustée à 5.10^5 cellules/mL de RPMI (10% de SVF), on y ajoute 20ng/mL de Phorbol Myrisate Acétate (PMA) ce qui va entraîner la différenciation des monocytes en macrophages [305].

On dépose 100 μ L de cette suspension dans chaque puits de microplaque à fond plat (96 puits) de manière à favoriser l'adhérence des cellules au fond des puits. Les microplaques sont incubées à 37°C à 5% de CO_2 pendant 48 heures. Les macrophages différenciés adhèrent au fond des puits.

- Dépôts des extraits

Après incubation, les macrophages différenciés adhèrent au fond des puits, le milieu de culture est retiré et chaque puits fait l'objet de deux rinçages successifs avec du RPMI. On dépose 100µL de chaque concentration d'extrait (6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100µg/mL) dans chaque puits, les microplaques sont ensuite incubées à 37°C (5% de CO₂) pendant 72 heures. Un témoin négatif ne contenant que du milieu RPMI et des macrophages est réalisé. L'effet du RPMI à 0,3% de DMSO est également vérifié.

Deux microplaques différentes sont prévues pour la lecture au bleu de Trypan (4 répétitions par extrait) et au MTT (3 répétitions par extrait+ 2 répétitions BDF).

- c. Révélation par coloration au bleu de Trypan

Après les 72h d'incubation, chaque puits est lavé avec du PBS. On ajoute 50µL de la solution de bleu de Trypan dans chaque puits et on laisse agir pendant 5 min. les puits sont ensuite lavés de nouveau 2 fois avec du PBS. On ajoute à la fin 100µL de PBS dans chaque puits.

- d. Expression des résultats

La lecture est réalisée sous microscope inversé, on compte le nombre de cellules vivantes (blanches) et le nombre total de cellules dans chaque puits à raison de 3 champs par puits (Appendice E).

Le pourcentage de viabilité des macrophages est calculé suivant la formule [299] [306] :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{MCv}{MCT} \times 100$$

- MCv : Moyenne des cellules vivantes pour chaque concentration d'extrait
- MCT : Moyenne totale des cellules pour chaque concentration d'extrait

La valeur CC_{50} est déterminée pour chaque extrait. Elle correspond à la concentration du substrat qui entraîne la mort de 50% des macrophages [301].

e. Révélation par MTT

Après 72h d'incubation, on ajoute 10 μ L de la solution de MTT à 10mg/mL à chaque puits. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C (5% de CO₂) pendant 4h. Le milieu est retiré et on ajoute dans chaque puits 100 μ L d'une solution d'isopropanol à 50% et SDS 10% qu'on laisse agir pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. La lecture des microplaques est réalisée à 570 nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

f. Expression des résultats

La viabilité des cellules est calculée selon la formule [306] [307] :

$$\% \text{ de viabilité} = (\text{MDO-DO}_{\text{BDF}})_{\text{échantillon}} / (\text{MDO-DO}_{\text{BDF}})_{\text{témoin négatif}} \times 100$$

2.2.5.1.2.2.3 Détermination de l'indice de sélectivité

Le rapport des deux activités étudiées : CC_{50} Activité Cytotoxique / CI_{50} Activité Leishmanicide nous permet de calculer l'indice de sélectivité (IS). Son interprétation nous renseigne sur le potentiel d'un échantillon testé à provoquer une activité toxique sélective envers les parasites [308].

$$IS = CC_{50} / CI_{50}$$

2.2.5.1.2.2.4 Test des comètes

a. Principe

Le test des comètes est une méthode utilisée pour étudier les dommages de l'ADN. Dans cette technique d'électrophorèse des cellules sont mélangées avec du microgel d'agarose sur une lame de microscope puis lysées. Elles sont ensuite soumises à une électrophorèse et enfin colorées avec un colorant fluorescent [309].

A l'état normal, une molécule d'ADN située dans le noyau se présente sous une forme superenroulée. Une cassure peut provoquer la rupture du brin d'ADN entraînant un relâchement de cette structure en double hélice. Sous l'effet d'un champ électrique les cellules dont l'ADN est endommagé voient une augmentation de la migration de l'ADN chromosomique du noyau vers l'anode, leur forme ressemble alors à une comète [310].

Le test des comètes est réalisé sur les cellules promastigotes des souches *L. Infantum* et *L. major* traitées par l'EMeOH/F ou l'EMeOH/Flr à la dose de 25 µg/mL selon la méthode décrite par Singh et *al.*, [311] :

b. Mode opératoire

b.1. Préparation du gel d'agarose

On prépare deux solutions d'agarose comme suit :

- Gel d'agarose à point de fusion normal (NA), préparé à 0,8% dans du PBS et utilisé pour réaliser la couche primaire lors de la préparation des lames, maintenu à 45°C.
- Gel d'agarose à faible point de fusion (LMA), préparé à 0,65% dans du PBS, dans lequel les cellules seront incluses lors de la réalisation du test, maintenu à 37°C.

b.2. Préparation des lames

- Première couche : La veille de l'essai, des lames en verre sont trempées dans la solution d'agarose (NA, 0,8 %) de manière à former un film avec le gel. Elles sont ensuite séchées à l'air libre. Cette couche a pour but principal l'attachement et le maintien de la couche de cellules sur la lame.
- Deuxième couche : Le jour du test, 50µL de la suspension de leishmanies de promastigotes à 10^6 préalablement traitées sont mises en contact avec 50 µL d'agarose (LMA, 37°C). on dépose 100µL de cette solution (cellules/ agarose LMA) sur les lames d'agarose NA préparées la veille, ces dernières sont ensuite recouvertes par des lamelles. On place les lames dans des boîtes de pétri et on les met dans une chambre froide (4°C) pendant 5 minutes. Un témoin négatif est préparé avec 50 µL de la suspension de leishmanies non traitées et 50 µL de LMA selon le même protocole.

b.3. Lyse des cellules

Après 5 minutes, on retire délicatement les lamelles, et on plonge les lames directement dans un bac opaque contenant le tampon de lyse. L'ensemble est ensuite emballé avec du papier d'aluminium et incubé à l'obscurité pendant 1h dans une chambre froide à 4°C.

b.4. Electrophorèse

A la fin de la lyse, on rince les lames avec le tampon d'électrophorèse, puis on les dépose dans la cuve électrophorétique contenant la solution de tampon d'électrophorèse durant 20 minutes à 25 Voltes et 300 mA.

Cette étape est réalisée en conditions alcalines (pH>13) afin de permettre la visualisation des lésions de l'ADN.

b.5. Neutralisation

L'électrophorèse s'étant déroulée en milieu alcalin, il est nécessaire de neutraliser les gels pour permettre de rétablir des appariements des brins d'ADN.

Les lames sont retirées délicatement de la cuve, égouttées puis placées dans une solution tampon de neutralisation pendant 5 à 10 minutes. Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau distillée pendant 5 à 10 minutes pour éliminer l'excès de solution.

b.6. Fixation des lames

Les lames sont ensuite séchées et fixées par du méthanol absolu pendant 5 minutes. Elles peuvent ainsi être conservées à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à la lecture.

b.7. Coloration des lames

Au moment de la lecture, on dépose 20 µL d'une solution de sybr green I (10%) sur chaque lame qui est recouverte par la suite avec une lamelle. Le sybr green I en se liant aux acides nucléiques émet une fluorescence.

b.8. Lecture et expression des résultats

La lecture des lames est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence relié à une caméra qui permet la visualisation des comètes sur ordinateur (Figure 2.7).

Pour chaque extraits 3 répliquats sont réalisés (3 lames) et 100 comètes et/ou noyaux sont observés et classés, afin de calculer le score d'endommagement de l'ADN.

La classification est réalisée suivant le niveau d'endommagement de l'ADN [309]:

- Classe 0, noyau intact, pas d'endommagement,
- Classe 1, ADN peu endommagé,
- Classe 2, ADN moyennement endommagé,
- Classe 3, ADN fortement endommagé
- Classe 4, ADN complètement endommagé.

Le score de l'endommagement de l'ADN est obtenu en multipliant le nombre de comètes et/ou de noyaux retrouvés dans chaque classe par la valeur de leur classe comme suit:

$$\text{Score} = [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / \text{le nombre total de cellules}$$

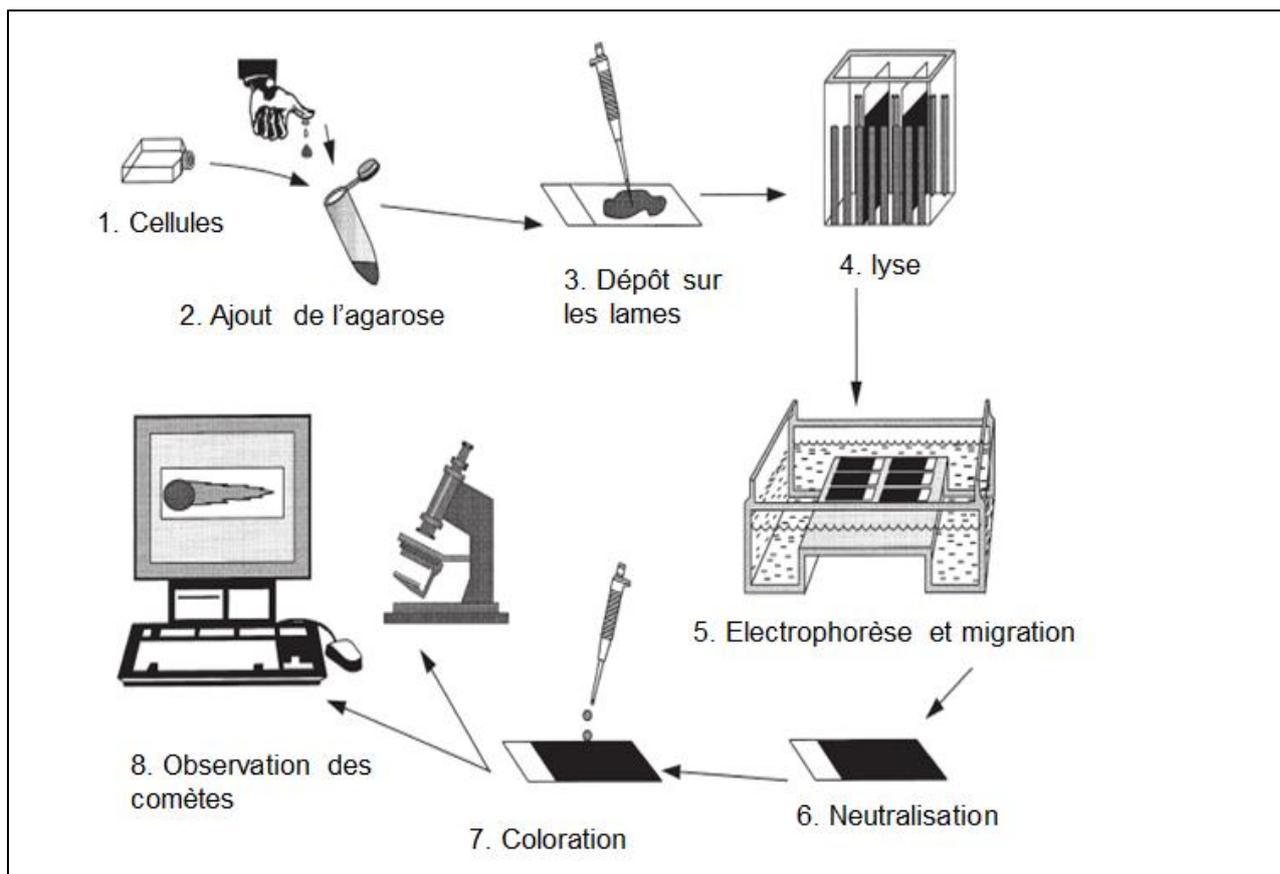


Figure. Schéma des étapes de la réalisation du test des comètes [309]

2.2.5.2 Activités *In Vivo*

2.2.5.2.1 Evaluation de la toxicité

L'étude de la toxicité aiguë a concerné les extraits MeOH/F, MeOH/Flr, D/F et DFlr, alors que l'étude de la toxicité subaiguë (sub-chronique) n'a concerné que les extraits MeOH/F et MeOH/Flr qui ont donné les meilleurs résultats dans les études *In Vitro*.

2.2.5.2.1.1 Toxicité aiguë

Le principe consiste en l'administration de doses croissantes du produit à analyser à plusieurs lots de souris réparties d'une manière homogène. Les souris de chaque lot reçoivent la même dose du produit. L'observation des effets toxiques du produit sur les souris se fait pendant les 14 jours qui suivent son administration [312].

Le test de toxicité aiguë est réalisé selon le protocole décrit par Costa-Silva et *al.*, [313]:

a. Préparation des souris

Quelques jours avant le test, des souris dont le poids corporel est de 20 à 30 g sont prélevées au hasard et sont réparties en 13 lots de 6 souris chacun (3 mâles et 3 femelles) dans des cages différentes et numérotées portant la dose et la date du gavage avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Les mâles et les femelles de chaque lot sont séparés dans des cages différentes.

La veille de l'expérimentation les souris sont mises à jeun pendant 18 heures avant l'administration des différents extraits.

a. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400, 800 et 2000 mg/Kg.

b. Mode opératoire

Les souris reçoivent par voie orale les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme témoin reçoit de l'eau physiologique,
- Lots 2, 4 et 5 : reçoivent l'EMeOH/F aux doses de 400, 800 et 2000 mg/Kg respectivement,
- Lots 6, 4 et 8: reçoivent l'EMeOH/Flr aux doses de 400, 800 et 2000 mg/Kg respectivement,
- Lots 9, 10 et 11 : reçoivent le D/F aux doses de 400, 800 et 2000 mg/Kg respectivement,
- Lots 11, 12 et 13 : reçoivent le D/Flr aux doses de 400, 800 et 2000 mg/Kg respectivement,

On surveille les changements de comportement général et/ ou la mortalité des souris pendant 14 jours.

2.2.5.2.1.2 Toxicité subaiguë

Cet essai consiste à administrer des extraits par voie orale, une fois par jour pendant 28 jours. La détermination de l'effet toxique se fait par l'observation du comportement des rats, par des tests hématologiques et biochimiques du sang et par des examens histologiques des organes des rats traités [314].

L'évaluation de la toxicité subaiguë (subchronique) est réalisée pour l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr selon le protocole décrit par Silva et *al.*, [315] et Musa et *al.*, [316] :

a. Préparation des rats

Des rats dont le poids corporel est de 100 à 120 g sont prélevés au hasard et répartis en 5 lots de 6 rats chacun (3 mâles et 3 femelles) dans des cages différentes et numérotées portant la dose et la date du gavage. Les mâles et les femelles de chaque lot sont séparés dans des cages différentes et ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Leurs poids sont enregistrés avant le début du traitement.

b. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400 et 800 mg/Kg.

c. Mode opératoire

Les rats reçoivent quotidiennement par voie orale pendant 28 jours les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme lot témoin reçoit de l'eau physiologique,
- Lots 2 et 3: reçoivent l'EMeOH/F aux doses 400 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 4 et 5 : reçoivent l'EMeOH/Flr aux doses 400 et 800 mg/Kg respectivement.

d. Observation clinique

Les rats sont observés au début et pendant la durée de l'expérimentation (28 jours) de manière à détecter toutes manifestations éventuelles de toxicité qui peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans l'organisme:

- L'observation minutieuse du comportement général des rats
- La mesure de l'évolution pondérale durant l'expérimentation de 28 jours : de J₁ à J₂₈, la pesée des rats de chaque lot utilisé se fait de façon hebdomadaire pendant 28 jours à compter du 1^{er} jour de l'administration des extraits méthanoliques de feuilles ou de fleurs.

e. Sacrifice et prélèvement sanguin

La veille du sacrifice, tous les rats sont mis à jeun pendant 16h. Les prélèvements sanguins sont effectués directement après le sacrifice par décapitation des rats qui sont légèrement anesthésiés par inhalation d'éther. Les échantillons de sang sont recueillis dans 2 tubes différents portant le numéro de chaque rat et le numéro du lot:

- Tubes avec anticoagulant EDTA (éthylène diamine tétra acétate) sont utilisés pour l'examen des paramètres hématologiques
- Tubes sans anticoagulant sont utilisés pour les analyses biochimiques

f. Transport des échantillons au laboratoire

Les échantillons sanguins sont stockés dans un réfrigérateur juste après le prélèvement, et sont ensuite transportés au laboratoire le jour même dans une glacière dont la température est de 4°C.

g. Examens hématologiques

Les paramètres hématologiques (Tableau 2.6) sont déterminés à l'aide d'un automate d'hématologie.

h. Examens biochimiques

Les paramètres biochimiques (Tableau 2.6) sont déterminés après centrifugation du sang à 3000 rpm pendant 10 min. Le sérum est séparé du culot et est recueilli pour la réalisation des analyses à l'aide d'un automate biochimique.

Le dosage des paramètres analysés est réalisé selon les méthodes analytiques utilisées pour les analyses biochimiques sériques (Spinreact, Espagne) (Appendice F).

Tableau 2.6. Paramètres hématologiques et biochimiques étudiés

Examens hématologiques	Examens biochimiques
Hématocrite (HCT), Taux d'hémoglobine (Hb), Nombre de Plaquettes (PLT), Numération globulaire (Erythrocytes : GR et Leucocytes : GB), Volume Corpusculaire Moyen (MCV), Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCHC), Lymphocytes (LYM).	Taux de glucose (Gly) Bilan hépatique : Aspartate Amino Transferase (ASAT), Alanine amino transferase (ALAT), Phosphatase alcaline (PA), Triglycérides (TG), Cholestérol totale (Chol), Bilirubine totale (Bil T), Gamma GT (GT), Albumine (Alb). Bilan Rénal : Urée, Acide urique (AU), Créatinine (Créat), Protides (Prot).

i. Dissection et autopsie

Après le sacrifice, les rats des différents lots témoins et traités subissent une dissection. Les organes tels que le foie, les reins, les poumons, le cœur et la rate sont recueillis et pesés.

j. Examen histo-pathologique du foie et des reins

Les échantillons des foies et des reins des rats traités avec la dose la plus élevée (800 mg/Kg) des extraits EMeOH/F et EMeOH/flr sont fixés dans du formol à 10%. Ces organes subissent une série de déshydrations dans des bains d'éthanol et une inclusion dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm sont réalisées au microtome puis colorées par l'Hématoxyline et l'Éosine (H&E) et sont observées au microscope optique. Des photos des différentes coupes histologiques sont prises à l'aide d'une caméra numérique reliée à un logiciel [317] [318] (Appendice G).

2.2.5.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Nous avons évalué l'activité anti-inflammatoires des extraits EMeOH/F ; D/F ; EMeOH/Flr et D/Flr par deux méthodes différentes qui consistent à provoquer une inflammation de la patte des souris avec de la carragénine dans la première méthode et une inflammation de l'oreille des souris avec du xylène dans la deuxième méthode.

2.2.5.2.2.1 Induction de l'œdème plantaire

Le principe du test consiste à provoquer un gonflement aigu de la patte d'une souris réalisé par l'injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Celle-ci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires [319].

Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en comparant, à différents moments, le volume/épaisseur (mm) de la patte des souris des lots traités avec celle du lot témoin [319].

L'étude de l'activité anti-inflammatoire est évaluée par la méthode décrite par Winter et *al.*, [320]:

a. Préparation de la solution de carragénine

On dissout 1 g de carragénine dans 100 mL d'eau physiologique stérile pour obtenir une solution à 1%.

b. Préparation des souris

Des souris Swiss albinos sont réparties en 14 lots (de 1 à 14) différents (6 souris par lot). Les souris sont mises à jeun 18 h avant la réalisation du test tout en ayant un accès libre à l'eau.

c. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400, 600 et 800 mg/Kg.

d. Mode opératoire

Avant l'injection de la carragénine les souris reçoivent par voie orale les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme témoin négatif reçoit de l'eau physiologique stérile ,
- Lot 2: reçoit le produit de référence Diclofénac à la dose de 50 mg/Kg,
- Lots 3, 4 et 5: reçoivent l'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 6, 7 et 8: reçoivent le D/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 9, 10 et 11: reçoivent EMeOH/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 12, 13 et 14: reçoivent le D/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement.

Trente minutes après l'administration des différentes substances, l'inflammation est induite par l'injection de 0,1 mL de la solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de chaque souris. L'épaisseur des pattes est mesurée avec un pied à coulisse avant et après l'induction de l'inflammation à 0, 1, 2, 3 et 4h.

e. Expression des résultats

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage d'inhibition de l'œdème ($I\%$) des pattes des souris traitées par rapport au groupe témoin négatif selon la formule de Cheng et *al.*, [321]:

$$I\% = \left[1 - \frac{\text{Différence de l'épaisseur de la patte des souris traitées}}{\text{différence de l'épaisseur de la patte des souris témoins}} \right] \times 100$$

2.2.5.2.2.2 Induction de l'œdème des oreilles

Le principe consiste en l'application d'une quantité de xylène sur la surface de l'oreille des souris qui va induire une inflammation neurogène aiguë se traduisant par un gonflement de l'oreille des souris. Ce dernier peut être réduit par l'administration de substances anti-inflammatoires [322].

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est réalisée suivant la méthode décrite par Hosseinzadeh et *al.*, [323]:

a. Préparation des souris

Des souris Swiss albinos sont réparties en 14 lots (de 1 à 14) différents (6 souris par lot). Les souris sont mises à jeun 18 h avant la réalisation du test tout en ayant un accès libre à l'eau.

a. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400, 600 et 800 mg/Kg.

b. Mode opératoire

Avant l'application du xylène les souris reçoivent par voie orale les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme témoin négatif reçoit de l'eau physiologique stérile,
- Lot 2: reçoit le produit de référence Diclofénac à la dose de 50 mg/Kg,
- Lots 3, 4 et 5: reçoivent l'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 6, 7 et 8: reçoivent le D/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 9, 10 et 11: reçoivent EMeOH/Fir aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,

- Lots 12, 13 et 14: reçoivent le D/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement.

Trente minutes après l'administration des différentes substances, l'inflammation est provoquée par l'application cutanée de 0,03 mL de xylène sur la face intérieure et postérieure de l'oreille droite des souris, l'oreille gauche est considérée comme témoin. Deux heures après l'application du xylène les souris sont sacrifiées par inhalation d'éther, les deux oreilles (gauche et droite) de chaque souris sont retirées. Des sections circulaires de 7 mm sont réalisées au niveau des oreilles. Ces sections seront ensuite pesées.

c. Expression des résultats

Pour chaque souris la mesure de la différence du poids des oreilles est réalisée par la soustraction du poids des sections de l'oreille gauche de celui des sections de l'oreille droite.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage d'inhibition de l'œdème ($I\%$) des oreilles des souris traitées par rapport au groupe témoin négatif selon la formule de Dkhil et *al.*, [324]:

$$I\% = \left[1 - \frac{\text{Différence du poids des sections des oreilles des souris traitées}}{\text{différence du poids des sections des oreilles des souris témoins}} \right] \times 100$$

2.2.5.2.3 Evaluation de l'activité antalgique

Nous avons évalué l'activité antalgique des extraits EMeOH/F ; D/F ; EMeOH/Flr et D/Flr d'*Inula viscosa* par la méthode de l'induction de crampes avec de l'acide acétique (Writhing test).

Le test consiste en l'injection intrapéritonéale d'une solution d'acide acétique à des souris ce qui leur provoque des douleurs abdominales qui se manifestent par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes) [325].

L'étude de l'activité antalgique est évaluée par la méthode décrite par Koster et *al.*, [324] :

a. Préparation de la solution d'acide acétique

Dans une fiole jaugée de 100 mL contenant 1 mL d'acide acétique, on ajoute de l'eau physiologique stérile jusqu'au trait de jauge pour obtenir une solution d'acide acétique à 1%.

b. Préparation des souris

Des souris Swiss albinos sont réparties en 14 lots (de 1 à 14) différents (6 souris par lot). Les souris sont mises à jeun 18 h avant la réalisation du test tout en ayant un accès libre à l'eau.

c. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400, 600 et 800 mg/Kg.

d. Mode opératoire

Avant l'injection de l'acide acétique les souris reçoivent par voie orale les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme témoin négatif reçoit de l'eau physiologique stérile,
- Lot 2: reçoit le produit de référence Diclofénac à la dose de 50 mg/Kg,
- Lots 3, 4 et 5: reçoivent l'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 6, 7 et 8: reçoivent le D/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 9, 10 et 11: reçoivent EMeOH/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 12, 13 et 14: reçoivent le D/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement.

Trente minutes après l'administration des différentes substances, les crampes sont induites par l'injection intrapéritonéale de 0,2 mL de la solution d'acide acétique à 1% aux souris.

Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de contorsions de chaque souris est compté pendant 15 minutes.

e. Expression des résultats

L'activité antalgique est exprimée par le pourcentage de réduction des contorsions (spasmes) (I%) des souris traitées par rapport au groupe témoin négatif selon la formule suivante Eidi et *al.*, [326] ; Kolhe, et Kale [327] :

$$I (\%) = \frac{\text{Moyenne des spasmes du lot témoin} - \text{Moyenne des spasmes du lot traité}}{\text{Moyenne des spasmes du lot témoin}} \times 100$$

2.2.5.2.4 Evaluation de l'activité antipyrétique

Nous avons évalué l'activité antipyrétique des extraits EMeOH/F ; D/F ; EMeOH/FI_r et D/FI_r d'*Inula viscosa* par la méthode de l'induction de la fièvre par l'injection sous cutanée d'une solution de levure de bière à des rats.

L'évaluation de l'activité antipyrétique est réalisée en suivant la méthode décrite par Asongalem et *al.*, [328] et Sengar et *al.*, [329]. Le principe consiste en l'injection d'une solution de levure de bière qui va entraîner la libération de nombreux médiateurs qui vont agir sur l'hypothalamus (centre thermorégulateur) ce qui va provoquer l'augmentation de la température des rats [330].

a. Préparation de la solution de levure de bière

On dissout 15 g de levure de bière dans 100 mL d'eau physiologique stérile pour obtenir une solution à 15%.

b. Préparation des rats

Des rats mâles Wistar albinos sont répartis en 14 lots différents (6 rats par lot). Les rats sont mis à jeun 18 h avant l'administration des substances à tester tout en ayant un accès libre à l'eau.

c. Préparation des extraits

On dissout les différents extraits à tester dans une solution d'eau physiologique stérile pour obtenir les concentrations de 400, 600 et 800 mg/Kg.

d. Mode opératoire

Avant l'injection de la solution de levure de bière la température rectale des rats est mesurée en utilisant un thermomètre digital. La fièvre est ensuite induite par l'injection sous cutanée de 10 mL/Kg de la solution de levure de bière. 18 h après, la température rectale de chaque rat est mesurée, seuls les rats qui montrent une augmentation de la température de 0,5 à 1 °C sont retenus et sélectionnés pour l'expérimentation. Les rats reçoivent les différents extraits aux concentrations suivantes :

- Lot 1: utilisé comme témoin négatif reçoit de l'eau physiologique stérile,
- Lot 2: reçoit le produit de référence Ibuprofène à la dose de 100 mg/Kg,
- Lots 3, 4 et 5: reçoivent l'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 6, 7 et 8: reçoivent le D/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 9, 10 et 11: reçoivent EMeOH/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement,
- Lots 12, 13 et 14: reçoivent le D/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg respectivement.

La température rectale des rats est ensuite mesurée 1 h, 2 h, 3 h et 4 h après l'administration des différents extraits.

e. Expression des résultats

L'activité antipyrétique est exprimée par le pourcentage de réduction de la fièvre (I%) des rats traités par rapport au groupe témoin négatif selon la formule suivante:

$$I (\%) = \frac{(T^{\circ} 4 \text{ h} - T^{\circ} \text{initiale})_{\text{témoin}} - (T^{\circ} 4 \text{ h} - T^{\circ} \text{initiale})_{\text{traité}}}{(T^{\circ} 4 \text{ h} - T^{\circ} \text{initiale})_{\text{témoin}}} \times 100$$

2.2.5.3 Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard moyenne (\pm SEM). La comparaison des moyennes et des variances est effectuée par le test ANOVA à un seul facteur (One-way) suivi par :

- Les tests de Dunnett et de Tukey pour les activités biologiques *In vivo*
- Le test de Tukey pour les activités biologique *In vitro*

L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel XL-STAT version 2014 ou version 2016.

Concernant l'activité leishemancide et cytotoxique la détermination des IC_{50} et CC_{50} est effectuée avec le logiciel GraphPad Prism version 5.3.

Les différentes représentations graphiques sont réalisées à l'aide du logiciel Excel version 2010.

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats de l'enquête ethnobotanique

L'enquête a été effectuée auprès de 100 personnes interrogées principalement sur leur connaissance de la plante *Inula viscosa* L.

Les résultats sont les suivants :

a. Question n° 1 : Connaissez-vous la phytothérapie ?

Les 100 individus questionnés ont répondu positivement.

b. Question n°2 : Si oui, comment la connaissez-vous?

La figure 3.1., montre que 62% des individus interrogés reconnaissent avoir entendu parler de la phytothérapie par leur entourage et seulement 38% disent avoir déjà eu recours à la phytothérapie pour se soigner.

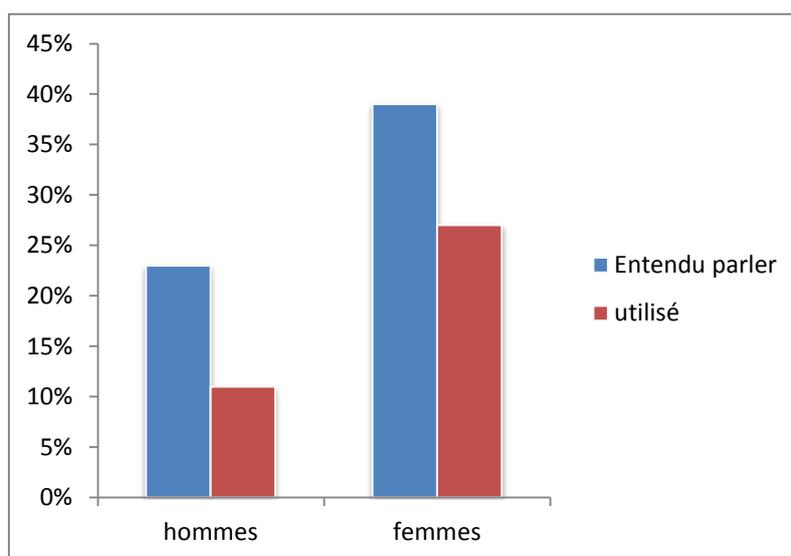


Figure 3.1. Pourcentage des connaisseurs en phytothérapie

c. Question n°3 : Connaissez-vous l'inule visqueuse?

Nous avons noté (Figure 3.2), que seulement 39% des personnes questionnées connaissaient l'inule visqueuse et 61% ont déclaré n'avoir jamais entendu parler de la plante.

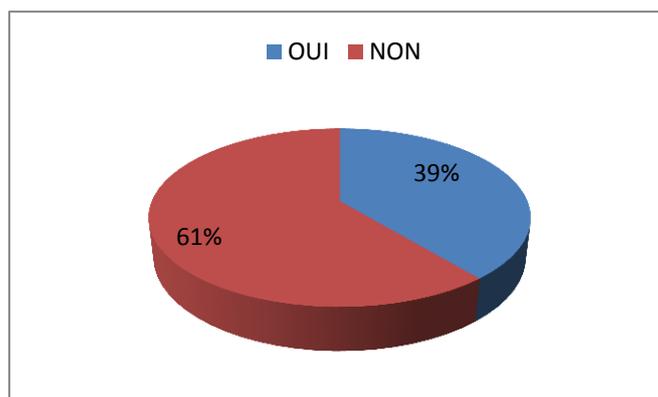


Figure 3.2. Connnaissance de la plante par la population

d. Question n°4 : Si oui, Comment la connaissez-vous ?

Parmi les 39 personnes qui connaissent l'Inule visqueuse, 59% ont répondu avoir entendu parler de la plante par leur entourage et 41% ont déclaré avoir déjà utilisé cette plante pour se soigner (Figure 3.3).

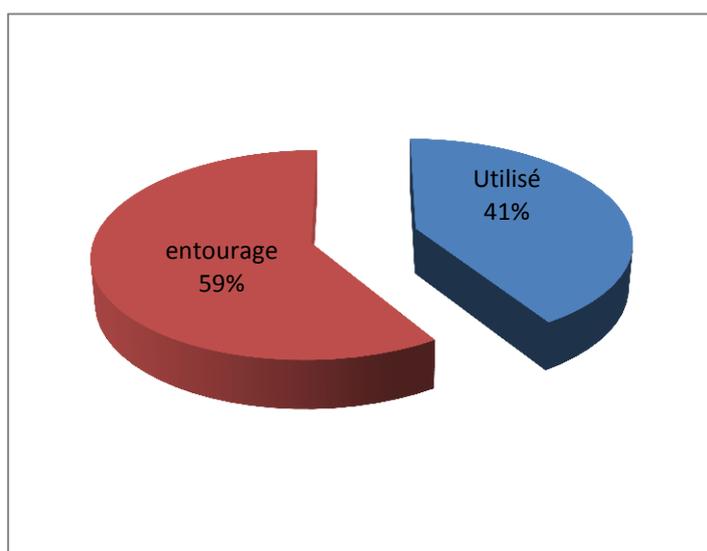


Figure 3.3. Comment la population connaît la plante

e. Question n°5 : Pour quelles maladies avez- vous l'habitude de l'utiliser ?

Sur 41% des personnes questionnées ayant déjà utilisé *Inula viscosa* pour se soigner (Figure 3.4.), 50% ont déclaré l'utiliser pour soigner le rhumatisme, 38% pour les douleurs de dos et les douleurs gastro-intestinales et 12% pour stimuler la fertilité des femmes.

La plante posséderait un pouvoir anti-inflammatoire d'où son utilisation dans le cas du rhumatisme [41]. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Baba Aissa [10].

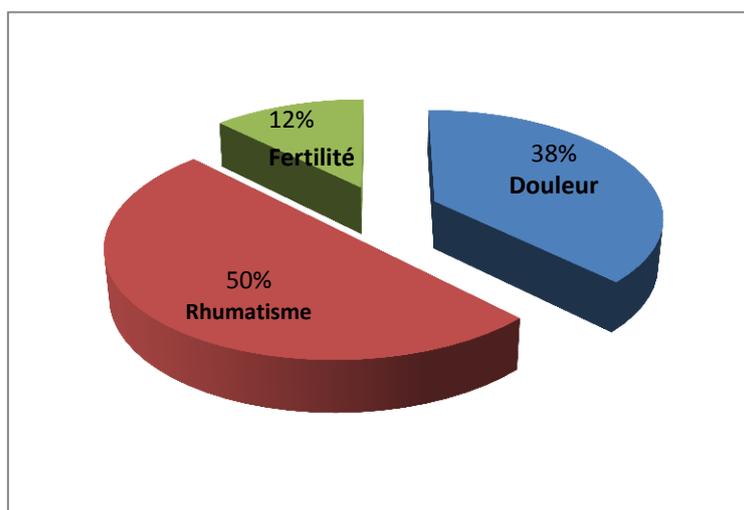


Figure 3.4. Les maladies traitées par *Inula viscosa*

f. Question n°6 : Quelle partie de la plante utilisez-vous pour vous soigner ?

La figure 3.5., montre que sur les personnes qui ont utilisé l'inule visqueuse 75% ont déclaré avoir utilisé les feuilles et 25% ont répondu avoir utilisé la partie aérienne complète de la plante y compris les fleurs. Par conséquent, les feuilles sont les organes les plus utilisés [10].

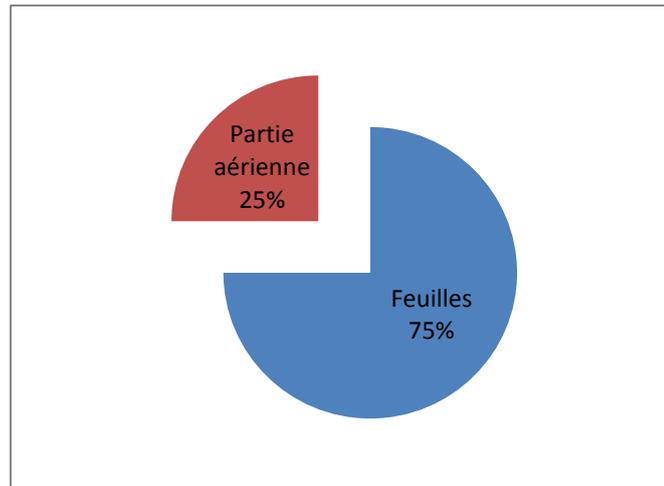


Figure 3.5. Parties utilisées de la plante

g. Question n°7 : Comment avez-vous l'habitude d'utiliser l'inule visqueuse pour vous soigner ?

D'après les réponses que nous avons recueillies auprès des utilisateurs d'*Inula viscosa*, les principaux modes d'emploi de cette plante sont les suivants :

- ✓ Pour l'usage externe : les feuilles et/ou la partie aérienne complète sont passées à la vapeur et mélangées avec de l'huile d'olive, afin d'être appliquées sous forme de cataplasme.
- ✓ les feuilles sont appliquées directement sous forme de cataplasme pour stimuler la fertilité.
- ✓ pour l'usage interne : les feuilles et/ou la partie aérienne complète sont préparées sous forme de décoction et ou d'infusion.

h. Question n°8 : Avez-vous été satisfaits du résultat ?

La figure 3.6., montre que la majorité des utilisateurs de la plante reconnaissent l'efficacité de l'inule visqueuse (81%).

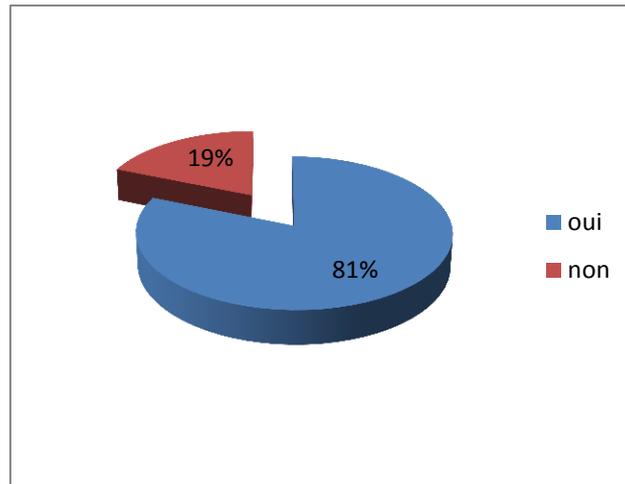


Figure 3.6. Efficacité de la plante

i. Question n°9 : Avez-vous constaté des effets secondaires suite à l'utilisation de l'inule visqueuse ?

L'ensemble des personnes questionnées utilisant *Inula viscosa*, ont affirmé n'avoir constaté aucun effet secondaire suite à son utilisation (Figure 3.7).

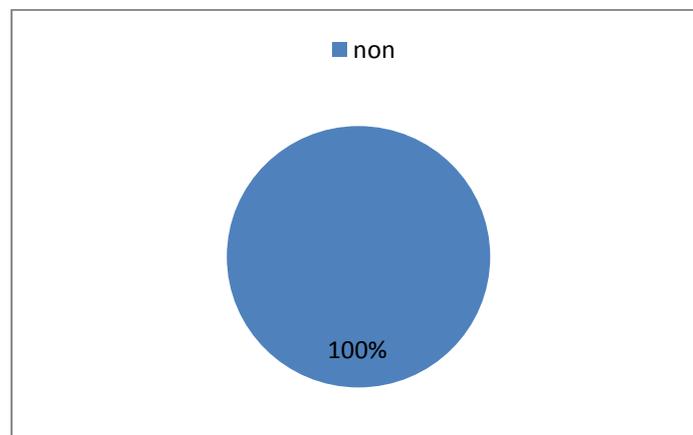


Figure 3.7. Effets secondaires d'*Inula viscosa*

j. Question n°10 : Que préférez-vous comme traitement ?

La figure 3.8., montre que sur les 100 personnes interrogées 36% d'entre elles préfèrent associer les deux traitements (médical et naturel). Toutefois, 35% préfèrent le traitement médical et 29% le traitement naturel.

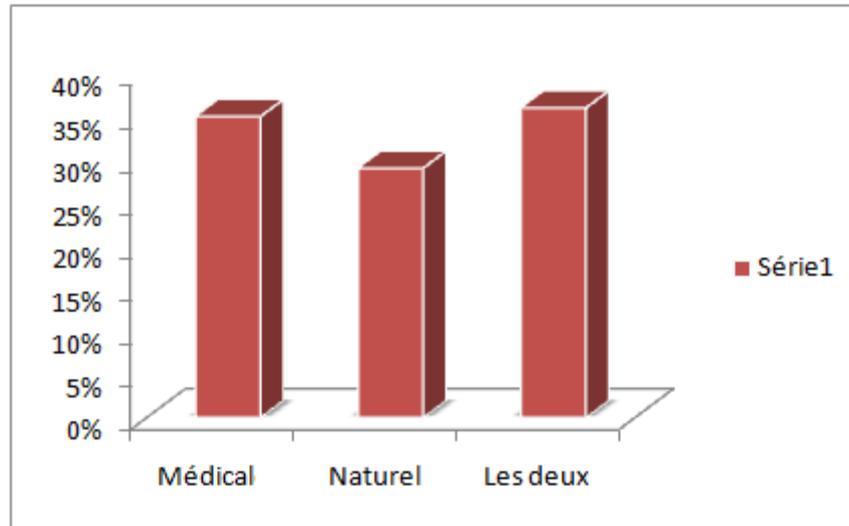


Figure 3.8. Traitement utilisé par la population questionnée

3.2 Résultats de l'étude microscopique

3.2.1 Etude microscopiques des feuilles

L'examen microscopique de la nervure principale de la feuille (Figure 3.9) met en évidence les structures suivantes :

- ✓ Poils tecteurs et poils sécréteurs glandulaires à tête vésiculaire.
- ✓ Tissus protecteurs : Un épiderme qui recouvre entièrement la feuille, il est constitué d'une seule assise de cellule.
- ✓ Tissus de soutien : Sous l'assise de cellules épidermiques, nous observons le collenchyme dont les parois des cellules sont épaissies par une substance perméable, la cellulose sous forme d'un anneau : C'est le collenchyme annulaire. C'est un tissu vivant.
- ✓ Le parenchyme cortical constitué par des cellules isodiamétriques qui laissent des méats entre elles. Il est constitué de plusieurs couches de cellules.
- ✓ Tissus conducteurs : Ils sont de deux types primaire et secondaire.

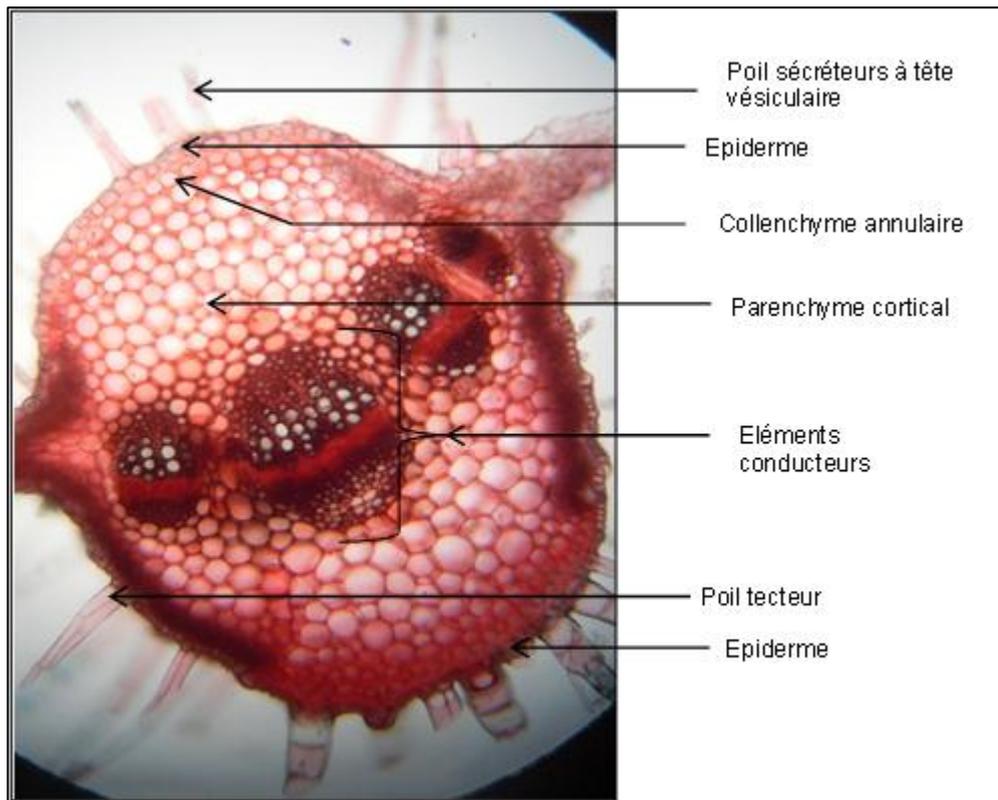


Figure 3.9. Coupe transversale au niveau de la nervure principale de la feuille d'*Inula viscosa* (GX10)

Nous remarquons (Figure 3.10), la présence d'éléments conducteurs primaires et secondaires au niveau de la nervure principale de la feuille.

De la périphérie vers le centre nous distinguons la présence du:

- ✓ Xylème : tissu conducteur issu du méristème primaire, il conduit la sève brute,
- ✓ Phloème : tissu conducteur issu du méristème primaire, il conduit la sève élaborée,
- ✓ Bois ou xylème secondaire : tissu conducteur issu du méristème secondaire, il conduit la sève brute
- ✓ Liber ou phloème secondaire : tissu conducteur issu du méristème secondaire, il conduit la sève élaborée

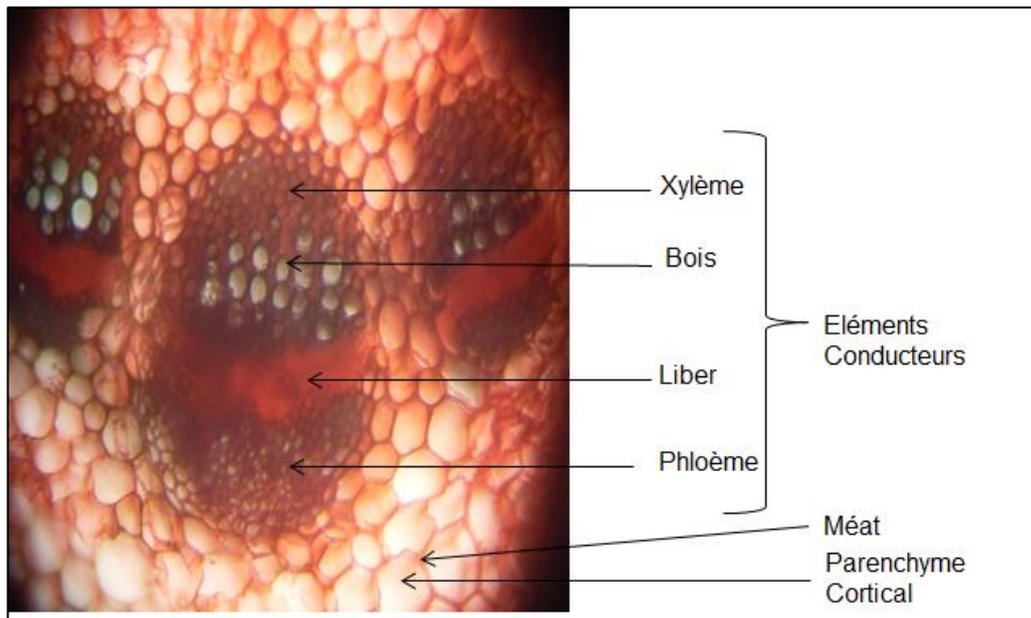


Figure 3.10. Détails des éléments conducteurs de la feuille d'*Inula viscosa* (Gx40)

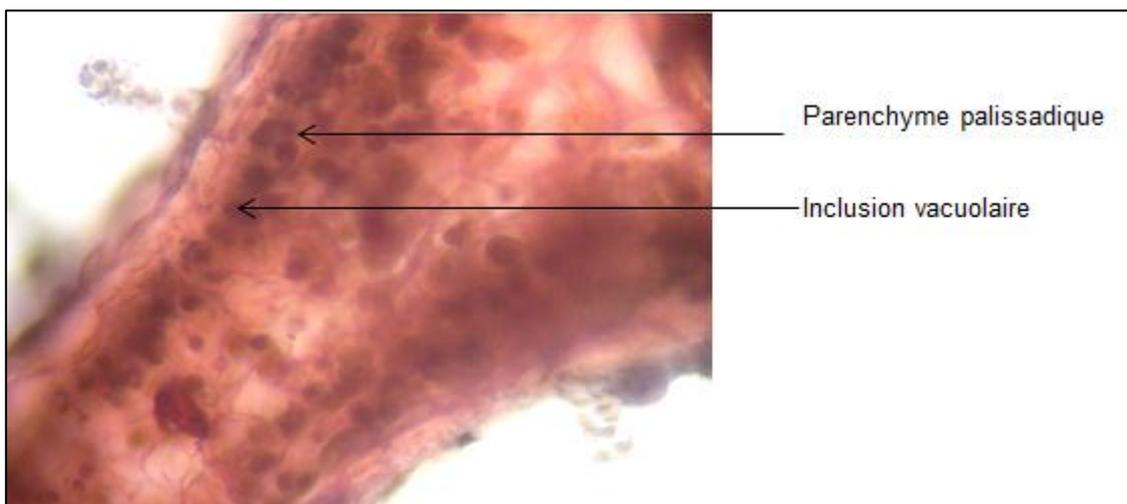


Figure 3.11. Limbe de la feuille d'*Inula viscosa* (Gx40)

Nous observons (Figure 3.11), des cellules du parenchyme palissadique possédant des inclusions vacuolaires. Selon Nikolakaki et Christodoulakis [331], Certaines de ces cellules sont de forme sphérique (apparaissent toujours sous une forme arrondie en coupes histologiques) et sont de nature lipidique.

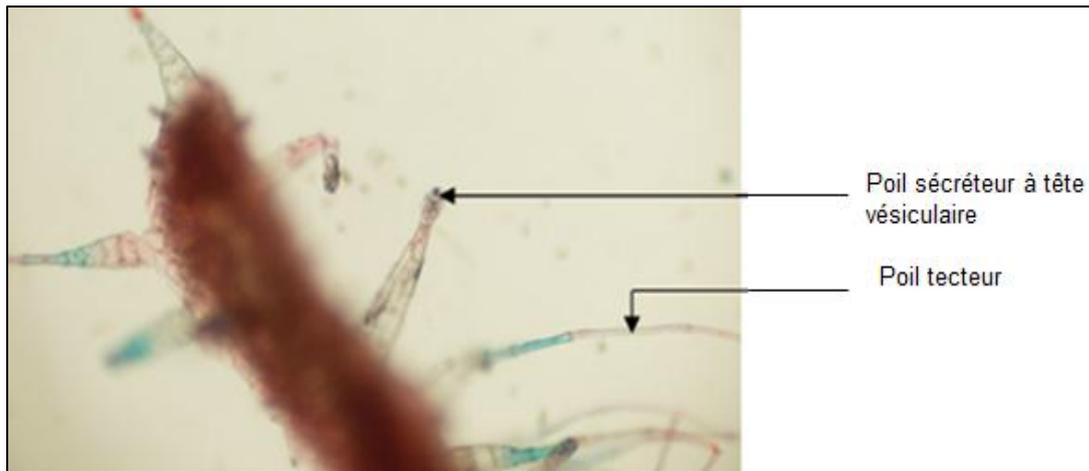


Figure 3.12. Détails des poils sécréteurs et des poils tecteurs (Gx10)

La figure 3.12, met en évidence la présence de poils glandulaires (sécréteurs) et de longs poils tecteurs pluricellulaires plus au moins denses sur la feuille d'*Inula viscosa*.

Les poils glandulaires constituent la structure sécrétrice d'*Inula viscosa*, en effet d'après Werker [332], ils sécrètent des polysaccharides, des lipides, des phospholipides et des protéines.

3.2.2 Etude microscopique de la tige

L'examen microscopique d'une coupe transversale de la tige d'*Inula viscosa* (figure 3.13) révèle la présence de:

- ✓ Tissus protecteurs : Un épiderme recouvre entièrement la tige constitué d'une seule assise de cellule. Cette dernière est protégée par une cuticule. Certaines cellules épidermiques présentent des prolongements vers l'extérieur pour donner des poils tecteurs et sécréteurs à tête vésiculaire.
- ✓ Tissus de soutien : Sous les cellules épidermiques, nous retrouvons le collenchyme dont les cellules sont épaissies de cellulose, substance perméable. Au-dessus de chaque fascicule est observé un amas de fibres sclérifiées. C'est un tissu mort car ses cellules sont imprégnées par la lignine, substance imperméable.
- ✓ On note la présence d'un parenchyme cortical lacuneux à la périphérie de la tige. Au centre, on observe le parenchyme médullaire

- ✓ Tissus conducteurs : les éléments conducteurs en l'occurrence le bois et le liber sont superposés. Ils se retrouvent sur un seul cercle. A l'intérieur de la fascicule le cambium donne naissance au bois et du liber. A l'extérieur de la fascicule le cambium donne naissance au parenchyme secondaire. Il s'agit d'une pachyte discontinue.

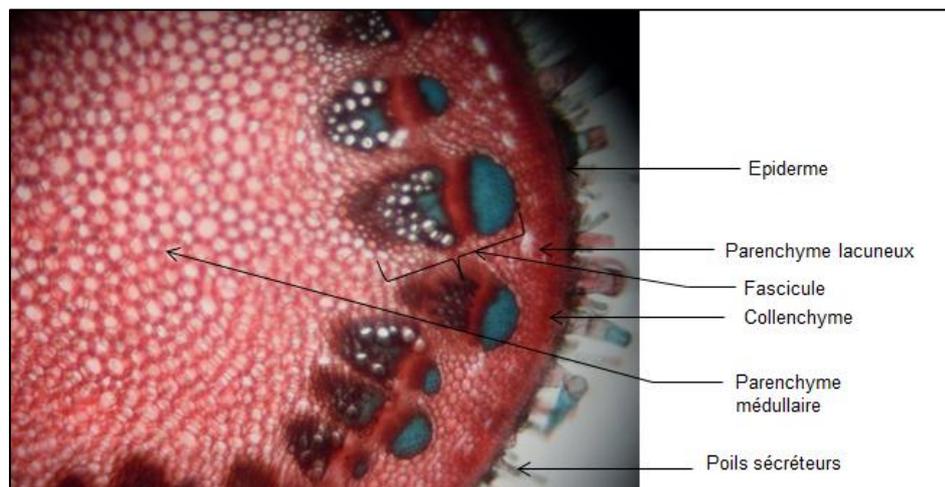


Figure 3.13. Coupe transversale de la tige d'*Inula viscosa* (Gx40)

Nous remarquons (Figure 3.14), la présence d'éléments conducteurs de type secondaires superposés au niveau de la tige : le liber (phloème secondaire, tissu conducteur secondaire de la sève élaborée) et le bois (xylème secondaire, tissu conducteur secondaire de la sève brute) [83].

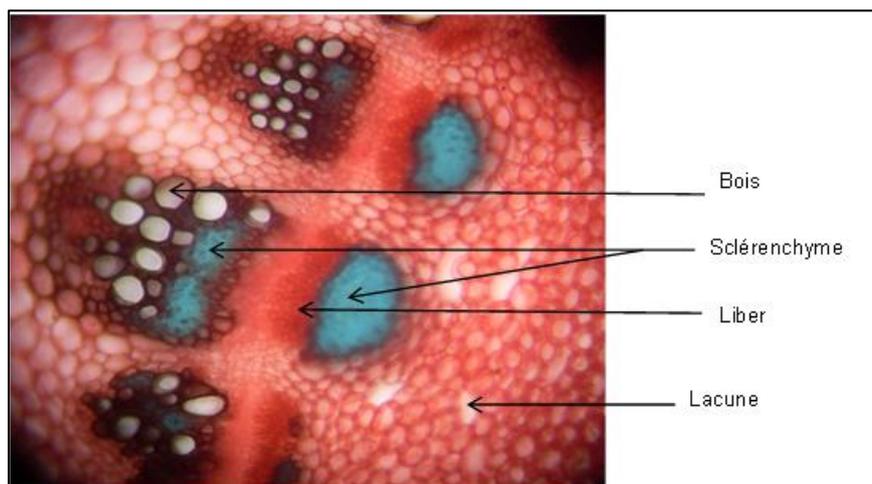


Figure 3.14. Détails des éléments conducteurs de la tige d'*Inula viscosa* (Gx40)

Dans la tige on note aussi la présence de poils sécréteurs à tête vésiculaire (figure 3.15.) et de poils tecteurs pluricellulaires.

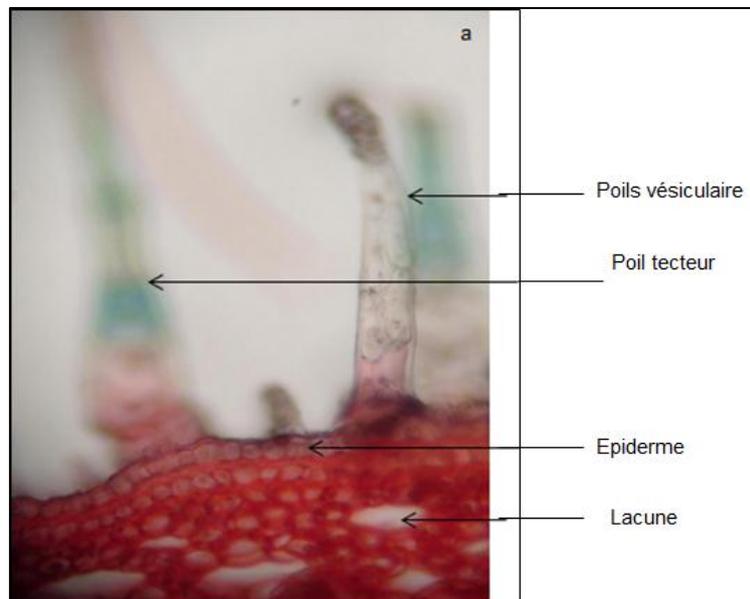


Figure 3.15. Détails des structures sécrétrices de la tige d'*Inula viscosa* a,b (Gx40)

3.3 Rendements d'extraction

Les processus d'extraction par l'appareil de type Soxhlet (H/F ; H/Flr ; MeOH/F et MeOH/Flr) et la méthode de décoction (D/F et D/Flr) nous ont permis de calculer les rendements à partir de la masse initiale de la plante et de la masse de l'extrait brut (sec) obtenu (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Rendement en extraits bruts des deux organes d'*Inula viscosa*

Extraits	Rendement d'extraction (%)	Aspect	Couleur de l'extrait
EH/F	11,33±0,38	Collant pâteux	vert
EH/Flr	8,33±0,33	Collant pâteux	jaune
EMeOH/F	27,26±0,21	Friable	marron vert
EMeOH/Flr	16,47±0,27	Friable	marron vert
D/F	18,5±0,28	Friable	Marron
D/Flr	13,15±0,18	Friable	Marron

Le tableau montre que les rendements obtenus à partir des deux organes de la plante varient selon le solvant d'extraction utilisé et l'organe (feuilles et fleurs). Les rendements les plus importants sont obtenus pour la fraction polaire où l'extrait méthanolique des feuilles a enregistré un rendement appréciable (27,26%) suivi par le décocté des feuilles (18,5%), l'extrait méthanolique des fleurs (16,47%) et enfin le décocté des fleurs (14,15%).

Concernant la fraction apolaire, l'extraction par le n-hexane a montré de faibles teneurs aussi bien pour les feuilles (11,3%) que pour les fleurs (8,3%).

Divers travaux sur *Inula viscosa* ont rapporté des rendements d'extraction différents. En effet Chebouti-Meziou [333], a rapporté un rendement de 37,41% de l'extrait méthanolique par macération des feuilles récoltées en avril dans la région de Dellys (Boumerdes, Algérie). En Turquie, Gökbulut et *al.*, en 2013 [97], ont obtenu après macération dans du méthanol un rendement de 15% pour une cueillette en pleine floraison alors qu'Orhan et *al.*, [334], ont rapporté un rendement de 15,1% pour les feuilles et 13% pour les fleurs récoltées en floraison après macération dans du méthanol. Au Maroc, Laghrifi et *al.*, [335], ont quant à eux obtenu un rendement 44,95 % après macération des feuilles dans du méthanol absolu (Avril et Août). Concernant l'étude de Salim et *al.*, [336] en Palestine le rendement de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs obtenus par macération dans du méthanol étaient respectivement de 16,02 % et 11,12% pour une récolte en période de floraison.

D'une manière générale, les rendements en extraits varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide: la température, le solvant d'extraction, la

taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant ainsi que la saison de récolte de la plante et le type d'organe utilisé [337] [338].

3.4 Résultats de l'étude phytochimique

3.4.1 Screening phytochimique

Le criblage phytochimique basé sur des réactions de précipitation ou de coloration permet de détecter les classes de composés présentes dans les différents organes de la plante (Tableau 3.1).

A l'issue du screening phytochimique, nous avons constaté une richesse de la partie aérienne de la plante (tige, feuilles et fleurs) en composés phénoliques (flavonoïdes, tanins galliques, anthocyanes et coumarines), en saponosides, en terpènes et en stérols. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Khalil et *al.*, [339] et Abduhamdah et *al.*, [340] en Jordanie qui ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, de coumarines et de terpènes dans la partie aérienne de la plante.

Les flavonoïdes qui contribuent entre autre à colorer les feuilles, les fleurs et les fruits [56] sont dotés de propriétés antibactériennes, antivirales, antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et hépato protectrice [341]. Les tanins galliques sont également dotés de propriétés antimicrobienne, antivirale [342] et anti-oxydante [343]. Les coumarines possèdent des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antivirales [344]. Selon Sparg et *al.*, [345], les saponosides possèdent de nombreuses activités biologiques (anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antiparasitaire et antivirale). Certaines molécules terpéniques sont connues pour leurs activités antibactériennes [346] antifongiques [157] et anti-inflammatoires [110] [347].

La richesse d'*Inula viscosa* en métabolites secondaires justifie son utilisation en médecine traditionnelle principalement comme anti-inflammatoire, antalgique et antiseptique [10] [25] et pourrait également expliquer les différents usages rapportés dans l'enquête ethnobotanique.

Les résultats obtenus (tableau 3.2), indique l'absence d'alcaloïdes, de leucoanthocyanes, de tanins condensés et de quinones. En effet selon Khalil et *al.*,

[339] et Abduhamdah et *al.*, [340], la partie aérienne de la plante ne contient pas d'alcaloïdes et d'antraquinones ce qui concorde avec nos résultats.

Tableau 3.2. Résultats du screening phytochimique

Composés	Réaction	Tige	Feuilles	Fleurs
Flavonoïdes	Coloration rouge	+	+	+
Tanins galliques	Coloration bleue foncée	+	+	+
Tanins condensés	Coloration rouge	-	-	-
Anthocyanes	Coloration bleue violacée	+	+	+
Leucoanthocyanes	Coloration rouge	-	-	-
Coumarines	Trouble	+	+	+
Glucosides	Coloration rouge brique puis violette	+	+	+
Quinones libres	Coloration rouge	-	-	-
Quinones combinés	Coloration rouge	-	-	-
Saponosides	Indice de mousse	+	+	+
Terpènes et stérols	Anneau rouge-brunâtre	+	+	+
Alcaloïdes	Précipité blanc jaunâtre	-	-	-

(-) absence ; (+) présence

3.4.2 Dosage des composés phénoliques

3.4.2.1 Dosage des polyphénols totaux

L'étude quantitative des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode Folin-Ciocalteu. La teneur en composés phénoliques des différents extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 3.16).

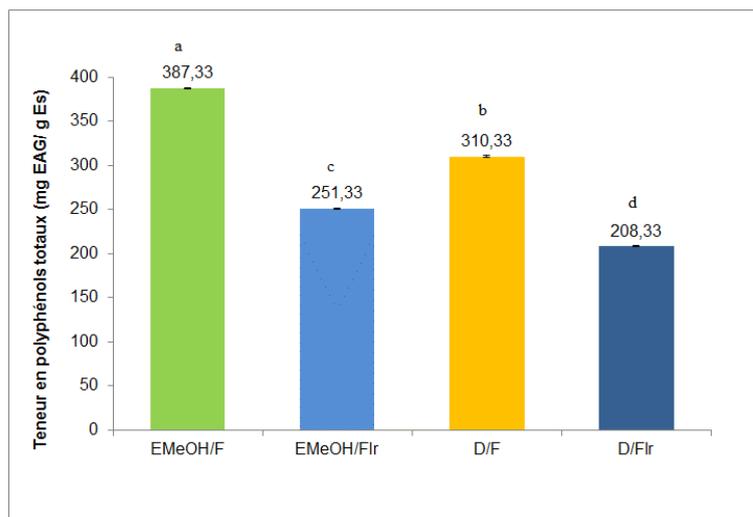


Figure 3.16. Teneurs en polyphénols totaux des extraits d'*Inula viscosa*

Différentes lettres alphabétiques sont utilisées pour indiquer les différences significatives . $p < 0,05$; $n = 3$ pour chaque groupe

Les résultats du dosage des phénols totaux (Figure 1), révèlent que la teneur la plus importante a été retrouvée dans l'extrait méthanolique des feuilles (387,33 mg d'EAG/g Es), suivi par le décocté des feuilles (310,33 mg d'EAG/g Es) ($p < 0,05$), l'extrait méthanolique des fleurs (251,33 mg d'EAG/g Es) et le décocté des fleurs (208,33 mg d'EAG/g Es) ($p < 0,05$). Nous avons noté que les teneurs en polyphénols sont plus élevés dans les feuilles.

Les teneurs en polyphénols dans les extraits méthanoliques obtenus dans cette étude sont supérieurs à ceux cités par la bibliographie. En effet dans l'étude Abu-Qatouseh et ses collaborateurs [348], la teneur en composés phénoliques retrouvée dans l'extrait méthanolique obtenu par macération (méthanol 80%) des feuilles récoltées dans la région de Jijel est de 314.55 mg d'EAG/g Es.

En Tunisie, Mahmoudi et *al.*, [91] et Rhimi et *al.*, [92], ont rapporté que la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique des feuilles (macération dans du méthanol) est de 103 mg d'EAG/g Es et de 123,07 mg d'EAG/g Es respectivement.

En Palestine, Salim et *al.*, [336], ont retrouvé des teneurs en phénols totaux de 152,7 et 173,1 mg d'EAG/gEs respectivement dans l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs. En Turquie, Orhan et *al.* [334], ont rapporté que la teneur en polyphénols des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs récoltées en

période de floraison était de 178,16 mg d'EAG/g Es pour les feuilles et de 172,88 mg d'EAG/g Es pour les fleurs. Au Maroc, Chahmi et *al.*, [349] ont constaté que les teneurs en polyphénols totaux des extraits organiques des feuilles obtenues par macération dans de l'éthanol à 10% (w/v) variaient d'une région à une autre allant de 140 à 274 mg d'EAG/g Es.

Selon Medeni et *al.*, [350], les teneurs en polyphénols totaux varient selon les facteurs environnementaux (situation géographique et climat) et les stades de développement de la plante étudiée.

3.4.2.2 Dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes (Figure 3.17) indiquent que la teneur la plus importante a été retrouvée dans l'extrait méthanolique des feuilles (141mg d'EQ/g Es), suivi par l'extrait méthanolique des fleurs (128,33 d'EQ/g Es), le décocté des feuilles (115 d'EQ/g Es) et le décocté des fleurs (109,67 d'EQ/g Es).

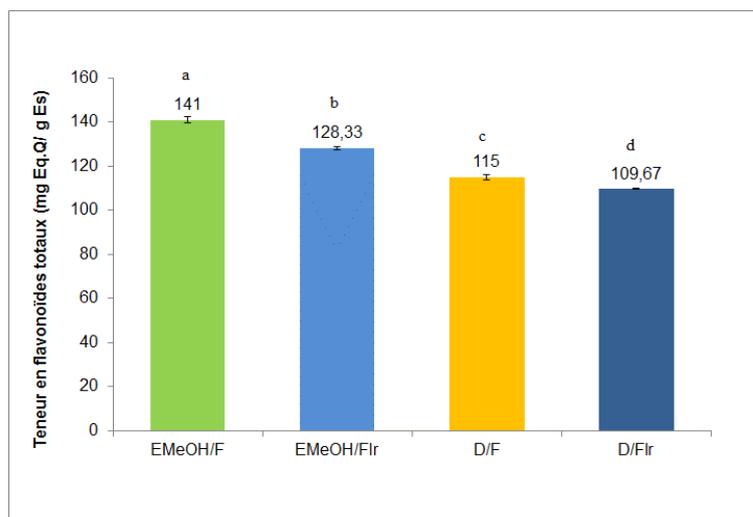


Figure 3.17. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d'*Inula viscosa*

Différentes lettres alphabétiques sont utilisées pour indiquer les différences significatives . $p < 0,05$; $n = 3$ pour chaque groupe

Les résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques obtenus dans cette étude se rapprochaient de ceux obtenus par Salim et *al.*, [189] en Palestine (142,5 et 123,8mg d'E Catéchine /g Es pour les feuilles et les fleurs respectivement) et sont supérieurs à ceux retrouvés par Abu-Qatouseh et *al.*, [348] (48.34 mg d'EQ/Es EMeOH/F) ; Mahmoudi et *al.*, [91] (84,92 d'E Catéchine /gEs EMeOH/F) ; Rhimi et *al.*, [92] (30,86 d'EQ/gEs EMeOH/F) en Tunisie; Orhan et *al.*,

[334] (77,50 et 81,36mg d'EQ/gEs pour les feuilles et les fleurs respectivement) en Turquie et Chahmi et *al.*, [349] (44,80 d'EQ/gEs extrait éthanolique des feuilles) au Maroc.

D'après Ribereau-Gayon, [351], le méthanol est un solvant approprié pour l'extraction des composés phénoliques.

Le contenu polyphénolique notamment les flavonoïdes peut varier qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre et même au sein de la même espèce selon les facteurs climatiques et environnementaux, la période de récolte, le stade de développement de la plante, l'organe utilisé et la méthode d'extraction (polarité des solvants) [352] [353].

3.4.3 Caractérisation des composés phénoliques des extraits méthanoliques par HPLC-DAD-ESI-MS/MS

L'utilisation de la HPLC-DAD-ESI-MS/MS en mode négatif nous a permis de caractériser respectivement 20 et 19 composés dans les extraits foliaires et floraux d'*Inula viscosa* (Tableau 3.3 et 3.4 ; Figure 3.18 et 3.19). L'identification des principaux constituants est basée sur la comparaison de leur temps d'élution (tr), leurs données spectrales (absorbance Uv et spectres de masse) avec ceux de certains standards purs disponibles et/ou les données de la littérature (Appendice H).

3.4.3.1 Caractérisation de l'extrait méthanolique des feuilles

Comme nous pouvons le constater, le profil chromatographique indique la présence d'acides phénoliques, de flavonols, de flavones et de flavanone (Tableau 3.3).

Tableau 3.3. Temps de rétention, absorbance UV et spectres de masse MS des composés phénoliques identifiés dans l'extrait méthanolique des feuilles d' *Inula viscosa* (HPLC-DAD-ESI-MS/MS)

Pic	Tr (min)	λ_{max} (absorbance)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Ions fragments (<i>m/z</i>)	Tentative d'identification (molécules proposées)
1	2,89	326	191		Acide quinique
2	3,17	325	353	191	Acide neochlorogénique
3	3,69	325	353	191	Acide chlorogénique
4	4,15	325	353	191	Acide crypto-chlorogénique
5	6,55	254; 355	477	301 (M-176)	Quercétine glucuronide
6	7,41	325	515	353; 191	Acide 1,3-dicaffeoylquinique
7	7,999	325	515	353; 173	Acide 1,4-dicaffeoylquinique
8	9,27	325	515	353; 191	Acide 1,5-dicaffeoylquinique
9	9,702	325	515	353; 173	Acide 3,4-dicaffeoylquinique
10	10,96	325	515	353; 191	Acide 3,5-dicaffeoylquinique
11	14,025	325	515	353; 173	Acide 4,5-dicaffeoylquinique
12	18,93	255; 355	301	179, 151	Quercétine
13	19,52	345	285		Kaempférol
14	22,75	258; 361	493	317 (M-176)	Myricétine glucuronide
15	29,7	250; 344	299		Diosmétine
16	32,93	295; 330	329	659 [2M-H], 314, 299	5-hydroxy-3'4'7 trimethoxy-flavanone
17	35,49	255; 359	317		Myricétine
18	35,73	256; 353	315		Isorhamnétine
19	36,64	255; 359	359	317	Acétyle myricétine
20	38,074	255; 359	341	299	Acétyle diosmétine

- Les acides phénoliques et les composés apparentés

Ces composés sont facilement repérables par leur absorbance UV typique qui présente un maximum aux alentours de 325 nm. Il s'agit respectivement des pics 1-4 ; 6-11.

Le composé numéro 1 élué à 2,89 min et présentant un pic moléculaire [M-H]⁻ à *m/z*= 191 est identifié comme étant l'acide quinique en comparaison avec le standard commercial.

Les pics 2, 3 et 4 élués respectivement à 3,17 ; 3,69 et 4,15 min montrent une absorbance maximale (λ_{max}) à 325 nm avec un ion précurseur déprotoné [M-H]⁻ à *m/z*= 353 qui après perte d'un résidu cafféoyl ([M-H-162]⁻) et un unique fragment en

MS² à [m-H]⁻ à $m/z=191$ (indicatif de l'aglycone acide quinique), laissant supposer que ce sont des dérivés de l'acide cafféoylquinique. Le pic numéro 3 a été identifié comme étant l'acide chlorogénique (acide 3-cafféoylquinique) en comparaison avec le spectre UV et MS et le temps de rétention du standard disponible. Les pics 2 et 4 ont été déduits en se référant à l'ordre hiérarchique d'élution des dérivés de l'acide chlorogénique proposé par Clifford et *al.*, [354] [355] [356]. Ainsi, le composé 2 correspond probablement à l'acide néochlorogénique (acide 5-cafféoylquinique) et le composé 4 correspond à l'acide cryptochlorogénique (acide 4-cafféoylquinique).

Les composés 6, 7, 8, 9, 10 et 11 élués respectivement à 7,41 ; 7,99 ; 9,27 ; 9,70 ; 10,96 et 14,02 min montrent un pic moléculaire [m-H]⁻ à $m/z= 515$, qui après perte d'un résidu cafféoyl ([M-H-162]⁻) donne un fragment majeur en MS² à [m-H]⁻ $m/z= 353$ (M-H-162)⁻ et des fragments [m-H]⁻ à $m/z= 191$ ou à [m-H]⁻ à $m/z= 173$. Ce type de fragmentation est typique des dérivés de l'acide di-cafféoylquinique. Selon l'ordre hiérarchique d'élution antérieurement proposé par Clifffaurd et *al.*, [355], ces composés pourraient correspondre à :

- Pic 6 : acide 1,3 di-cafféoylquinique
- Pic 7 : acide 1,4 di-cafféoylquinique
- Pic 8 : acide 1,5 di-cafféoylquinique
- Pic 9 : acide 3,4 di-cafféoylquinique
- Pic 10 : acide 3,5 di-cafféoylquinique
- Pic 11 : acide 4,5 di-cafféoylquinique

Certains composés ont déjà été identifiés dans les spécimens grecques [90], tunisiens [91] [92] et palestiniens [89] [357]. Les dérivés de l'acide chlorogénique ainsi que la série des acides di-cafféoylquinique sont considérés comme marqueurs taxonomiques de la famille des Astéraceae. Ainsi, la présence de ces métabolites dans les extraits foliaires d'*I. viscosa* confirme l'appartenance de notre espèce à cette famille. A ce niveau, il serait plausible de supposer que les voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez l'espèce *I. viscosa* en particulier et la famille des Astéraceae en général sont hautement conservés et stables quelques soit la région [90] [91] [92] [356] [358] [359].

- Les flavonols

A l'image des acides phénoliques, l'absorbance en UV permet facilement l'identification des flavonols ayant un maximum d'absorbance aux alentours des bandes 250-260 et 350-360 nm. En utilisant ce critère d'identification, 7 dérivés flavonoliques ont pu être identifiés.

Le pic numéro 5 ($t_r=6,55$ min) présentant un pic moléculaire $[m-H]^-$ à $m/z=477$ et un fragment fils majeur en MS^2 $[m-H]^-$ à $m/z=301$ (indicatif de l'aglycone quercétine) correspondant à la perte d'un résidu d'un acide glucuronique ($[m-H-176]^-$) a été identifié en tant que quercétine glucuronide. La quercétine et ses dérivés ont été identifiés précédemment dans l'extrait méthanolique des feuilles d'*Inula viscosa* par Trimeche et *al.*, [90] et Rhimi et *al.*, [92].

Le pic 12 élué à 18,93 min montre un pic moléculaire $[m-H]^-$ à $m/z=301$ a été identifié comme étant la quercétine en comparaison avec le temps de rétention et les données spectrales (UV et MS) du standard disponible [360].

Le pic numéro 13 élué à 19,52 min montre une absorbance maximale (λ_{max}) à 345 nm et un ion précurseur $[m-H]^-$ à $m/z=285$. Ces données sont similaires à celles du standard Kaempférol [360]. Ce composé a antérieurement été identifié dans l'extrait méthanolique des fleurs d'*Inula viscosa* en Turquie [97].

Le pic 17 élué à 35,49 min présentant une absorbance maximale (λ_{max}) à 255 et 359 nm et un ion moléculaire $[m-H]^-$ à $m/z=317$ a été identifié comme étant la myricétine en comparaison avec le temps de rétention et les spectres UV et MS du standard disponible. Cette molécule a été identifiée dans l'extrait méthanolique des fleurs d'*Inula helenium* [97]. Le pic 14 ($t_r=22,75$ min et λ_{max} à 258 et 361 nm) présente un ion précurseur $[m-H]^-$ à $m/z=493$ et un ion fils majeur en MS^2 $[m-H]^-$ à $m/z=317$ (indicatif de l'aglycone myricétine) qui s'est formé suite à la perte d'un résidu $[m-H-176]^-$ correspondant à l'acide glucuronique, de ce fait le composé 14 a été identifié en tant que myricétine glucuronide. Le pic 19 ($t_r=36,64$ min et une absorbance maximale (λ_{max}) à 255 et 359 nm) a présenté un ion précurseur déprotoné (ou ion pseudomoléculaire) $[m-H]^-$ à $m/z=359$ et un ion fils majeur en MS^2 $[m-H]^-$ à $m/z=317$ (indicatif de l'aglycone myricétine) qui s'est formé suite à la perte

d'un résidu acétyl [m-H-42]⁻. Ainsi, la structure 19 est identifiée comme étant l'acétyle myricétine [361].

Le pic 18 élué à 35,73 min montre les mêmes caractéristiques spectrales que le standard isorhamnétine (λ_{\max} 256-353 nm) et un ion moléculaire [m-H]⁻ à $m/z=315$. Ce composé a été déjà identifié par Mahmoudi et *al.*, [91].

- Les flavones

En se basant sur les spectres UV, 2 flavones avec un maximum d'absorbance aux alentours de 330-340 et 250-260 nm ont pu être identifiés.

Le pic 15 élué à 29,7 min présentant une absorbance maximale (λ_{\max}) à 250 et 344 nm et un ion moléculaire [m-H]⁻ à $m/z=299$ a été identifié en tant que diosmétine par comparaison avec le temps de rétention et les spectres UV et MS du standard disponible.

Le pic 20 ($t_r=38,074$ min et λ_{\max} à 255 et 359 nm) a présenté une molécule déprotoné (ion précurseur) [m-H]⁻ à $m/z=341$ ainsi qu'un fragment ionique en MS² [m-H]⁻ à $m/z=299$ (indicatif de l'aglycone diosmétine) qui s'est formé suite à la perte d'un groupement acétyl [m-H-42]⁻. Ainsi le composé 20 a été identifié en tant que acétyle diosmétine [361].

- Les flavanones

Le pic 16 élué à 32,93 min présente un ion moléculaire [m-H]⁻ à $m/z=329$ et son dimer [2M-H]⁻ a été identifié comme étant le 5-hydroxy-3,4,7- trimethoxy-flavanone selon Simirgiotis et *al.*, [362].

K5

2017120709-ES-K6 Sm (Mn, 2x3); Sm (Mn, 2x3)

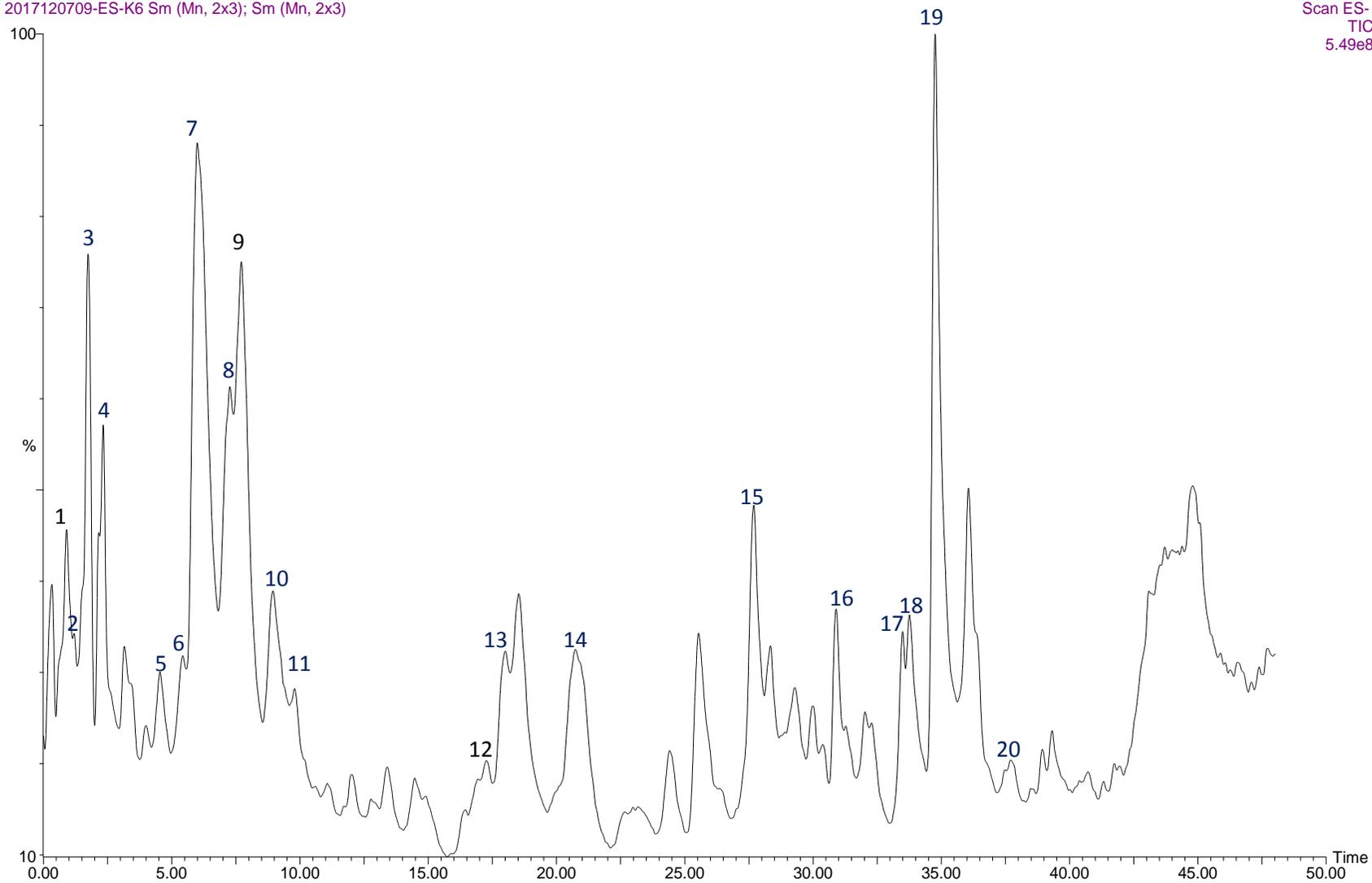
Scan ES-
TIC
5.49e8

Figure 3.18. Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Inula viscosa*

3.4.3.2 Caractérisation de l'extrait méthanolique des fleurs

Nous avons suivi le même résonnement d'identification que pour les feuilles. Comme nous le montre le tableau 3.4, le profil chromatographique est également caractérisé par la présence des acides phénolique (9), de flavonols (7), de flavones (2), et un flavanone.

De plus le pic 5 élué à 6,065 min avec une absorbance maximale (λ_{max}) à 250 et 350 nm a présenté un ion moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z=463$ avec un ion fils $M^2 [M-H]^-$ à $m/z=301$ (indicatif de l'aglycone quercétine) qui s'est formé suite à la perte d'un résidu hexoside $[m-H-162]^-$. Ce composé a été identifié en tant que quercétine glucoside. cette molécule a également été identifié par Trimeche et *al.*, [90] dans l'extrait méthanolique d'*inula viscosa* « quercétine hexoside ».

Tableau 3.4. Temps de rétention, spectres UV et MS des composés phénolique (molécules proposées) contenus dans l'extrait méthanolique des fleurs d'*Inula viscosa* (HPLC-DAD-ESI-MS/MS)

Pic	Tr (min)	λ_{max}	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragments (m/z)	Tentative d'identification (molécules proposées)
1	2,89	326	191		Acide quinique
2	3,14	325	353	191	Acide neochlorogénique
3	3,69	325	353	191	Acide chlorogénique
4	4,33	32	353	191	Acide crypto-chlorogénique
5	6,065	250-350	463	301 (463-162)	Quercétine glucoside
6	6,55	254-355	477	301 (477-176)	Quercétine glucuronide
7	7,51	325	515	353; 191	Acide 1,3-dicaffeoylquinique
8	8,002	325	515	353; 173	Acide 1,4-dicaffeoylquinique
9	9,27	325	515	353; 191	Acide 1,5-dicaffeoylquinique
10	9,68	325	515	353; 173	Acide 3,4-dicaffeoylquinique
11	10,99	325	515	353; 191	Acide 3,5-dicaffeoylquinique
12	18,93	255-355	301	179, 151	Quercétine
13	22,67	258-361	493	317 (M-176)	Myricétine glucuronide
14	29,7	250-344	299		Diosmétine
15	32,88	295-330	329	659 [2M-H], 314, 299	5-hydroxy-3'4'7 trimethoxy- flavanone
16	35,49	255-359	317		Myricétine
17	35,76	256-353	315		Isorhamnétine
18	36,64	255-359	359	317	Acétyle myricétine
19	38,124	255-359	341	299	Acétyle diosmétine

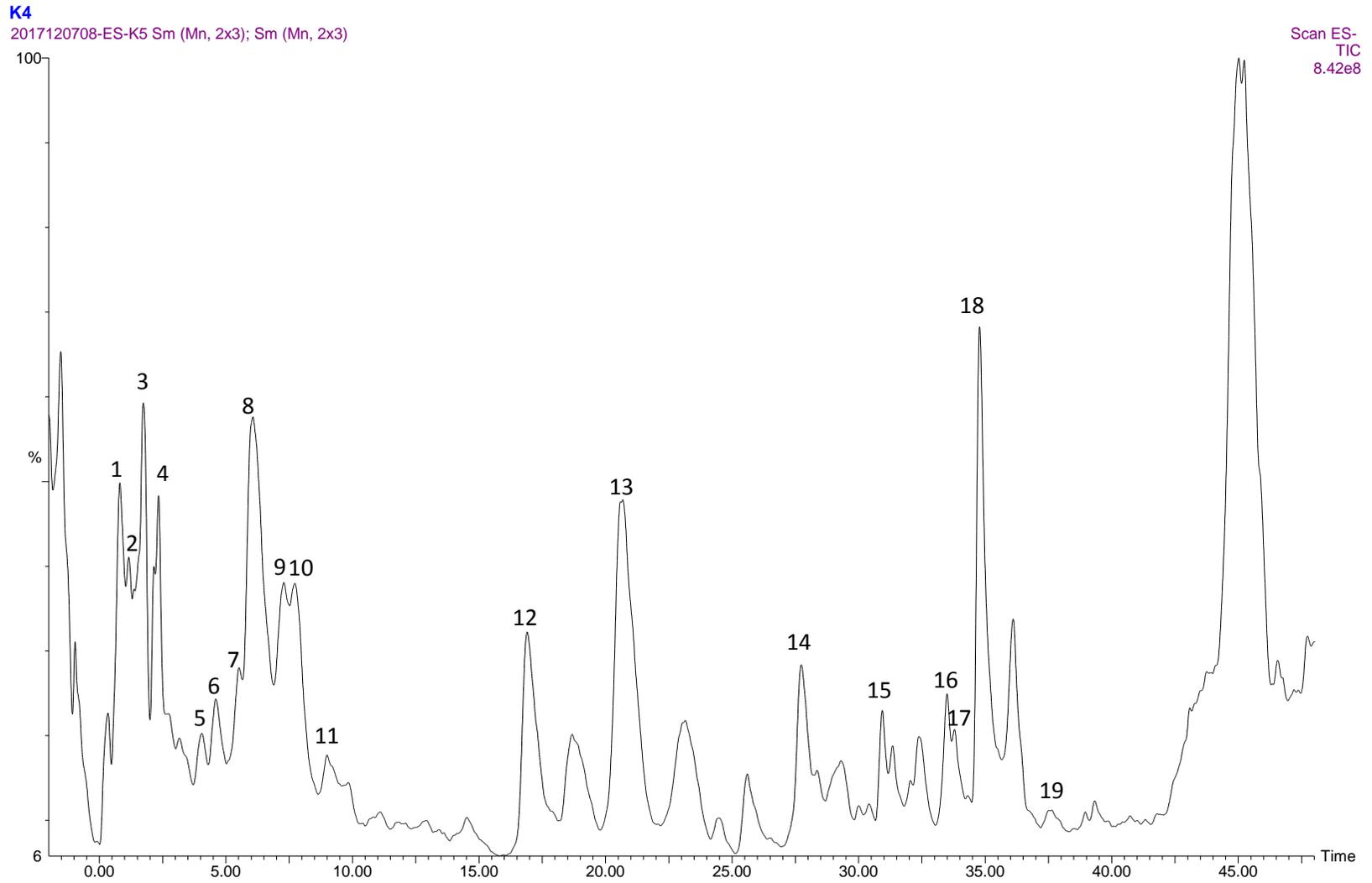


Figure 3.19. Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Inula viscosa*

3.5 Activités biologiques

3.5.1 In Vitro

3.5.1.1 Résultats de l'activité antioxydante

La recherche de nouvelles molécules aux propriétés antioxydantes à partir de ressources naturelles ne cesse de se développer. Pour cela de nombreuses méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant des composés de plantes ont été développées [363] [364] [365]. Parmi elles, le test d'évaluation du piégeage du radical libre DPPH et le test d'évaluation du pouvoir réducteur du Fer que nous avons adoptés pour étudier l'activité antioxydante des extraits H/F, H/Flr, EMeOH/F, EMeOH/Flr, D/F et D/Flr d'*Inula viscosa*.

a. Piégeage du radical libre DPPH

En raison de sa simplicité, sa rapidité d'exécution et sa sensibilité, la méthode au DPPH est représentative des techniques employant les radicaux libres comme modèle dans l'évaluation de la capacité des antioxydants naturels à piéger ces radicaux par donation d'un atome d'hydrogène [366] [367].

- Pouvoir de piégeage du DPPH par les extraits des feuilles

La figure 3.20, montre que l'activité inhibitrice du radical libre DPPH des extraits des feuilles d'*Inula viscosa* ainsi que celle de l'acide ascorbique (AA) augmente en fonction des concentrations des extraits.

L'acide ascorbique utilisé comme standard a présenté la meilleure activité de piégeage du DPPH avec une EC_{50} de 0,07 mg/mL. En effet le changement de couleur de la solution de DPPH du violet au jaune, exprimant le passage du radical DPPH de la forme oxydée (DPPH*) à la forme réduite stable (DPPH-H), s'est fait dans un temps extrêmement court (Tableau 3.5).

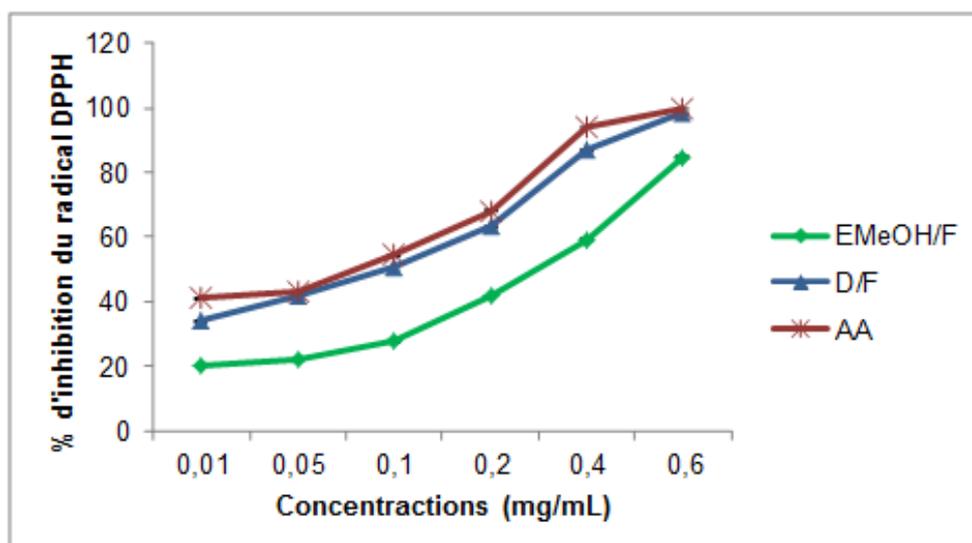


Figure 3.20. Pourcentage du piégeage du radical libre DPPH des extraits de feuilles d'*Inula viscosa*

Le D/F a montré une activité inhibitrice du radical libre DPPH supérieur à celle de l'EMeOH/F. En effet l' EC_{50} du D/F était de 0,11 mg/mL et celle de l'EMeOH/F était de 0,31 mg/mL. Cependant, nous avons constaté l'absence de l'activité inhibitrice du radical libre par l'extrait l'H/F aux concentrations testées, cela suppose que son EC_{50} est supérieur à 0,6 mg/mL $p < 0,05$.

Tableau 3.5. Valeurs des EC_{50} du piégeage du DPPH des extraits d'*Inula viscosa*

Substances testées	EC_{50}
EMeOH/F	0,31 \pm 0,0004 ^e
EMeOH/Flr	0,27 \pm 0,0008 ^d
D/F	0,11 \pm 0,0004 ^c
D/Flr	0,092 \pm 0,0004 ^b
AA	0,072 \pm 0,0007 ^a

Différentes lettres alphabétiques sont utilisées pour indiquer les différences significatives $p < 0,05$; $n = 3$ pour chaque groupe

- Pouvoir de piégeage du DPPH par les extraits des fleurs

D'après la figure 2 le pouvoir antioxydant des extraits de fleurs augmente considérablement avec l'augmentation de la concentration des extraits à tester, il s'agit donc d'une relation de type dose-dépendante.

Nous avons également constaté (Figure 3.21; tableau 3.5) que le D/Flr a présenté une meilleure capacité de piégeage du radical DPPH que celle de l'EMeOH/Flr avec des EC₅₀ de 0,09 mg/mL et de 0,28 mg/mL respectivement. Quant à l'extrait H/Flr, ce dernier n'a montré aucun effet inhibiteur du radical libre aux concentrations testées, la coloration du mélange (extrait/DPPH) est restée violette.

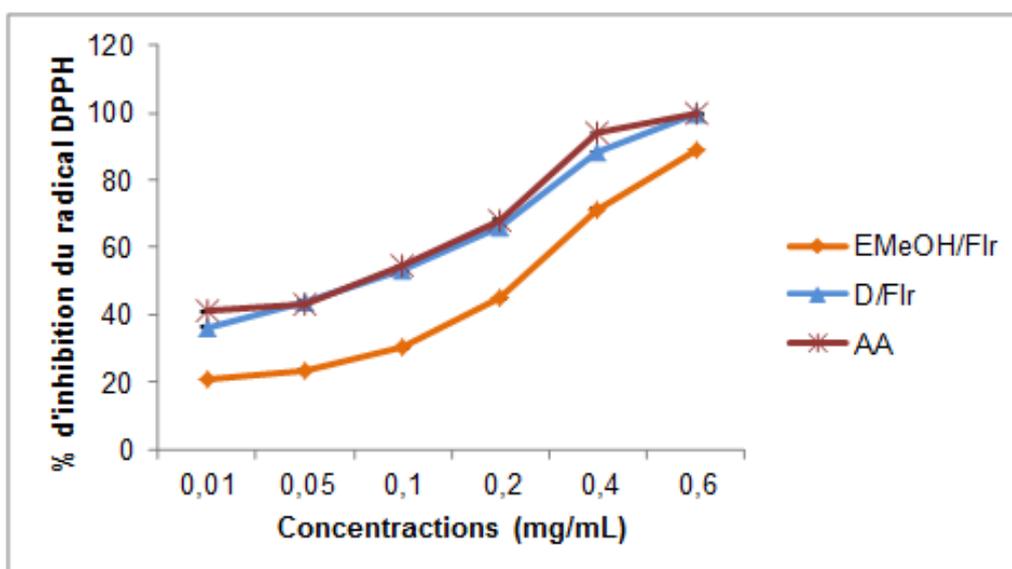


Figure 3.21. Pourcentage du piégeage du radical libre DPPH des extraits de fleurs *d'Inula viscosa*

La comparaison des valeurs des EC₅₀ des différents extraits d'*Inula viscosa* et celle du standard (Tableau 1) nous permettent de les classer par ordre décroissant comme suit :

$$AA > D/Flr > D/F > EMeOH/Flr > EMeOH/F$$

Les décoctés ont présenté une meilleure activité antioxydante que celles des extraits méthanoliques.

Selon Bondet et *al.*, [366], quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant.

Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies et affections comme les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, le diabète et le cancer. Les antioxydants peuvent prévenir ces maladies en offrant une résistance contre le stress oxydatif par le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la peroxydation lipidique et d'autres mécanismes [368].

Les composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes. Ces molécules constituent une source importante d'antioxydants naturels qui peuvent inhiber ou réduire la production de radicaux libres [369] [370] [286] par divers mécanismes incluant le piégeage des radicaux libres, la désactivation de l'oxygène singulet et la chélation des ions métalliques [128] [371].

On peut expliquer l'effet antioxydant des extraits méthanoliques et des décoctés d'*Inula viscosa* par leur richesse en composés phénoliques qui a été démontrée par les dosages spectrophotométriques.

En l'absence de standardisation de la méthode au DPPH, l'utilisation de différents modes opératoires (nature et concentrations initiales des extraits testés et du DPPH) conduit à l'obtention de résultats difficilement comparables [372]. Néanmoins, les études menées en Grèce par Trimech *et al.*, [90], au Maroc par EL Guiche *et al.*, [373] et Chami *et al.*, [349], en Tunisie par Mahmoudi *et al.*, [91], en Palestine par Salim *et al.*, [336] et en Turquie par Gökbulut *et al.*, [97] ont toutes démontré que les extraits d'*Inula viscosa* possèdent un bon pouvoir de piégeage du radical libre DPPH. Par ailleurs Mahmoudi *et al.*, [91] ; Salim *et al.*, [336] et Gökbulut *et al.*, [97] ont rapporté que les extraits de fleurs ont un meilleur pouvoir antiradicalaire (DPPH) que celui des feuilles ce qui concorde avec les résultats obtenus dans cette étude.

Selon Ksouri *et al.*, [374], la teneur totale en composés phénoliques et l'activité antioxydante des plantes dépendent de facteurs biologiques (espèces, organes utilisés : feuilles, fleurs), de l'environnement et des solvants d'extraction.

Ces éléments sont des facteurs importants qui peuvent influencer la capacité antioxydante des plantes.

Danino et *al.*, [89], ont isolé l'acide 1,3-dicaffeoylquinique à partir des feuilles d'*Inula viscosa* et ont mis en évidence sa capacité de piégeage des radicaux libres (DPPH, et ABTS) et les ERO impliquées dans le stress oxydatif (incriminé dans les maladies neurodégénératives) ce qui confirme son potentiel antioxydant. Jun et ses collaborateurs [375], ont également rapporté que la cynarine (acide 1,3-dicafféoylquinique) isolée à partir de l'Artichaut présente un puissant pouvoir antioxydant contre les radicaux DPPH et ABTS. Ma et *al.*, [376], ont classé l'effet inhibiteur du radical libre DPPH de certains dérivés de l'acide cafféoylquinique isolés de *Coreopsis tinctoria* (Asteraceae) par ordre décroissant : acide 3,5-dicafféoylquinique > acide 4,5-dicafféoylquinique > acide chlorogénique. Kim et *al.*, [377], ont eux aussi démontré que les acides 3,5-dicaffeoylquinique et 4,5-dicafféoylquinique présentent une plus forte activité de piégeage du radical libre DPPH que l'acide chlorogénique. D'après Ohnishi et *al.*, [378], l'acide chlorogénique et l'acide 3,5-DCQ possèdent un meilleur pouvoir anti-radicalaire (DPPH) que l'acide ascorbique. Iwai et *al.*, [379], ont également rapporté que les acides dicafféoylquiniques (3,4 ; 3,5 et 4,5) ont un meilleur pouvoir de piégeage des radicaux DPPH que le trolox et l'acide ascorbique, qui sont couramment utilisés comme antioxydants. Selon Fraisse et ses collaborateurs [380], les dérivées de l'acide dicafféoylquinique et plus particulièrement l'acide 3,5-DCQ sont dotés d'un important pouvoir anti-radicalaire qui serait à l'origine du potentiel antioxydant de nombreuses plantes appartenant à la famille des Asteraceae.

Les flavonoïdes en raison de leurs nombreux groupements hydroxyles présentent un pouvoir antioxydant important, notamment dans le piégeage des radicaux libres impliqués dans de nombreuses maladies [367] [381] [382] [383]. Iacopini et *al.*, [384] ; Wang et *al.*, [385], ont rapporté que la quercétine et la myricétine présentent un bon effet de piégeage du radical libre DPPH.

b. Réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) est souvent utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant à céder un électron. La présence du réducteur (antioxydant) dans l'extrait entraîne la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure en forme ferreuse [386].

- Pouvoir réducteur des feuilles

La figure 3.22, montre que l'activité réductrice du fer de l'acide ascorbique et des extraits de feuilles augmente d'une manière proportionnelle à l'augmentation des concentrations des substances testées.

L'acide ascorbique a exercé la meilleure activité réductrice des ions de fer ferrique en fer avec une EC_{50} de 0,03 mg/mL (figure 3.22, Tableau 3.6).

Le décocté des feuilles (D/F) a présenté un pouvoir réducteur du Fe^{3+} supérieur à celui de l'EMeOH/F, en effet l' EC_{50} obtenu avec le D/F (0,1 mg/mL) était plus faible que celle de l'EMeOH/F (0,21 mg/mL) (Figure 3, Tableau 2).

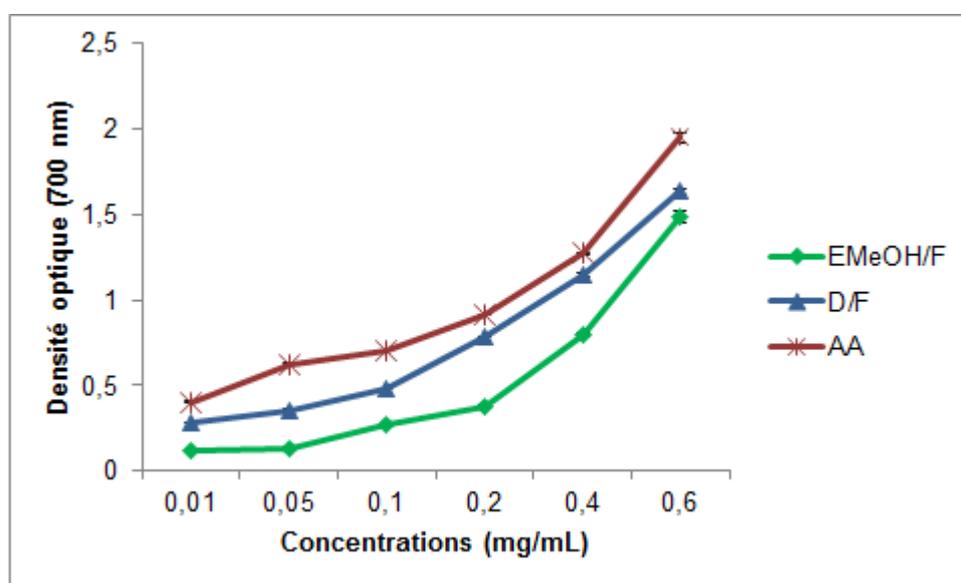


Figure 3.22. Pouvoir de réduction du fer des extraits de feuilles d'*Inula viscosa*

Tableau 3.6. Valeurs des EC₅₀ du piégeage du fer des extraits d'*Inula viscosa*

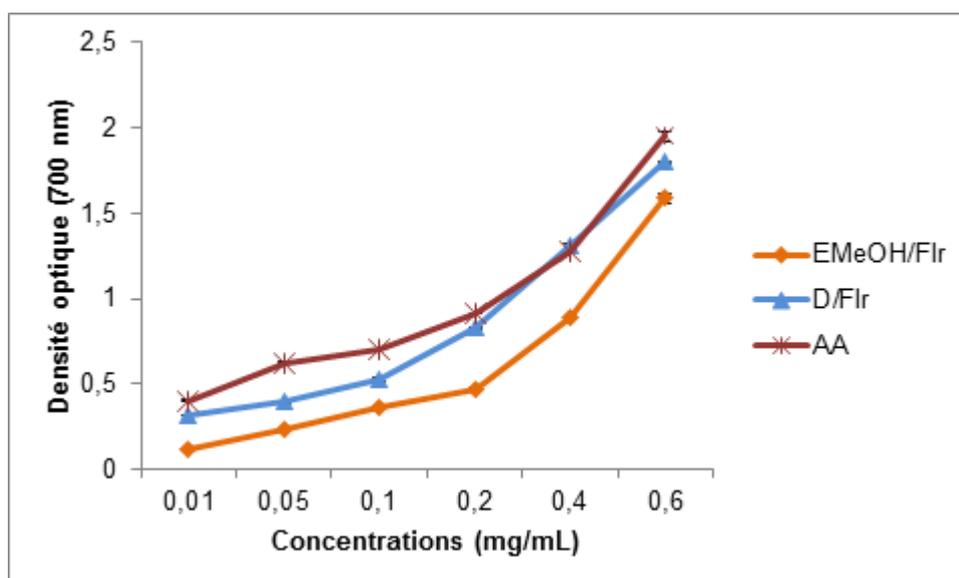
Extract	EC ₅₀
EMeOH/F	0,21 ±0,003 ^e
EMeOH/Flr	0,18 ±0,002 ^d
D/F	0,10 ±0,0003 ^c
D/Flr	0,09 ±0,003 ^b
AA	0,03 ±0,002 ^a

Différentes lettres alphabétiques sont utilisées pour indiquer les différences significatives .p<0,05; n = 3 pour chaque groupe

- Pouvoir réducteurs des fleurs

Nous constatons une nouvelle fois que l'activité réductrice du fer ferrique en fer ferreux des extraits de fleurs augmente en fonction des concentrations des extraits (Figure 3.23)

Le D/Flr a également montré un meilleur effet réducteur du Fe³⁺ en Fe²⁺ que l'EMeOH/Flr avec des EC₅₀ de 0,09 mg/mL pour le D/Flr et de 0,18 mg/mL pour l'EMeOH/Flr. Cependant le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique s'est encore avéré supérieur à celui des extraits des fleurs (Figure 3.23 et Tableau 3.6).

Figure 3.23. Pouvoir de réduction du fer des extraits de fleurs d'*Inula viscosa*

Cependant les extraits apolaires (H/F et H/Flr) n'ont montré aucune activité réductrice du Fe^{3+} aux concentrations testées. Aucun changement des DO n'a été constaté malgré l'augmentation des concentrations.

En comparant les données obtenues concernant les EC_{50} des différents extraits d'*Inula viscosa* et celui du standard (AA), on peut les classer en ordre décroissant de leur pouvoir réducteur du Fer:

AA > D/Flr > D/F > EMeOH/Flr > EMeOH/F

Les résultats de notre étude ont révélé que les extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* possèdent un bon pouvoir réducteur du fer ce qui pourrait être justifié par leur forte teneur en polyphénols. Nos résultats sont confortés par ceux obtenus dans l'étude d'Orhan et ses collaborateurs [334], qui ont travaillé sur l'effet réducteur du fer des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa*.

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'effet antioxydant de certains acides phénoliques isolés et purifiés à partir de plantes. Khallouki et *al.*, [359], ont démontré l'effet antioxydant de l'acide chlorogénique ; l'acide neochlorogénique ; l'acide 3,5-DCQ ; l'acide 3,4-DCQ ; l'acide 4,5-DQC isolés à partir de *Cotula Cinerea* par la méthode du DPPH et celle de FRAP. En 2007, Wu [387] a aussi rapporté que l'acide chlorogénique isolé et purifié à partir de *Flos Lonicerae* a montré une meilleure activité de piégeage du radical DPPH et de réduction du Fe^{3+} à Fe^{2+} que l'acide ascorbique. Plus récemment, Hong et *al.*, [388], ont également signalé que l'acide 3,5-dicafféoylquinique isolé à partir de *Ligularia fischeri* présentait une forte activité antioxydante évaluée par la méthode du DPPH FRAP et ABTS.

D'autres auteurs comme Firuzi et *al.*, [389], ont indiqué que les flavonoïdes tels que la myricétine, quercétine et le kaempférol sont dotés d'un pouvoir de réduction du fer plus important que le Trolox. Lesjak et ses collaborateurs [390], ont également rapporté que la quercétine et certains de ses dérivés notamment l'isorhamnotine et la quercétine glucuronide possèdent un important pouvoir antioxydant (DPPH et FRAP).

D'autres modèles d'évaluation du potentiel antioxydant *in vitro* ont également démontré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Inula viscosa* prévient la peroxydation lipidique enzymatique et non-enzymatique et montre également une activité de piégeage du radical superoxyde [391].

Wang et *al.*, [385], ont prouvé l'effet cytoprotecteur de la myricétine à restaurer l'activité et l'expression protéique des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase) des cellules ayant subi un stress oxydatif induit par peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans leur étude Morel et ses collaborateurs [392], ont également rapporté l'effet cytoprotecteur de la quercétine et de la diosmétine dans la prévention de la peroxydation lipidique et la libération des enzymes intracellulaires des hépatocytes chargées en fer.

La présence de ces acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits méthanoliques des feuilles et/ou des fleurs d'*Inula viscosa* pourrait donc justifier leur important effet antioxydant.

Selon Alexieva et *al.*, [393], l'activité antioxydante des plantes dépend de l'espèce, de l'organe utilisé (feuilles, fleurs, graines), des conditions climatiques, des solvants d'extraction.

3.5.1.2 Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne

3.5.1.2.1 Activité antibactérienne

La vérification de l'effet du DMSO utilisé comme solvant pour la dissolution des extraits vis-à-vis des souches étudiées a révélé que celui-ci n'a provoqué aucun effet inhibiteur de la croissance bactérienne, aucune zone d'inhibition n'ayant été observée autour du disque.

- Effet antibactérien des différents extraits de feuilles d'*Inula viscosa*

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé sont représentés par

les figures 3.24 et 3.25 et tableaux (Appendice I). Il est à signaler que le diamètre des disques (6mm) est inclus dans le DZI des différents extraits.

Toutes les souches à Gram négatif ont présenté une résistance vis-à-vis du D/F à l'exception d'*A. baumannii* qui a montré une sensibilité à cet extrait avec une moyenne de DZI de 12,33 mm (souche pathogène) et de 13,67 mm (Souche ATCC) à la dose de 200 mg/mL.

A la même dose l'extrait H/F a présenté une activité inhibitrice modérée contre *E. coli*, *Salmonella spp.*, *A. baumannii* et la souche ATCC de *P.aeruginosa* avec des DZI se situant entre 10 et 13,33 mm. Cependant la souche pathogène de *P.aeruginosa* et *K. pneumoniae* se sont avérées résistantes vis-à-vis de cet extrait <10mm.

Laghrifi et ces collaborateurs [394], ont rapporté que l'extrait H/F est inactif sur *E.coli*, *P.aeruginosa*, et *A. baumannii*.

L'extrait EMeOH/F à la dose de 200 mg/mL a présenté une activité antibactérienne modérée vis-à-vis *Salmonella spp.*, *d'E. coli* et *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* ATCC avec des moyennes de DZI de 10,33 à 12,33 mm, alors que la souche Pat. de *K. pneumoniae* s'est avéré résistante à cet extrait DZI<10mm.

Nous avons également constaté que *A. baumannii* était extrêmement sensible à l'EMeOH/F avec une moyenne de DZI se situant entre 24 et 26,67 mm.

L'imipénème a présenté une meilleure activité inhibitrice sur l'ensemble des souches à Gram négatif testées en comparaison avec les extraits de feuilles à l'exception de la souche de *A.baumannii* qui a montré une plus forte sensibilité vis-à-vis de l'EMeOH/F à la dose de 200 mg/mL ($p<0,05$).

Par ailleurs, l'ensemble des extraits ont été actifs sur la totalité des souches à Gram positif (Figure 3.25) avec des activités variables selon l'extrait et la souche testée.

Le D/F à la dose de 200 mg/mL s'est avéré actif sur les *S. aureus*, *S.epidermidis*, *E.faecalis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* et *S. saprophyticus* avec une moyenne de DZI allant de 10 à 13,66 mm.

Les souches *S.epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* ont toutes présenté une sensibilité à l'égard de l'extrait H/F (200mg/mL) avec un DZI variant de 10,67 à 13 mm. Néanmoins cet extrait a montré une meilleure activité vis-à-vis de *S. aureus* (15 mm à 16 mm).

Nous avons constaté une très bonne activité de l'EMeOH/F à la dose de 200 mg/mL contre *S.epidermidis* *E. faecalis* ATCC et *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* avec une moyenne des DZI se situant entre 15,67mm et 16, 33 mm. Les souches de *S.aureus* ATTC et SARM se sont montrées extrêmement sensibles vis-à-vis de cet extrait avec une moyenne de DZI de 23 mm (ATTCC) et de 21,67 mm (SARM).

La vancomycine a présenté une plus forte activité inhibitrice que celle des extraits des feuilles sur *S. Saprophyticus*, *E. faecalis* et *S. pneumoniae* que ($p < 0,05$) alors que son effet sur *S.epidermidis*, *S. pyogenes* et *E. faecalis* (Pat) était comparable à celui de l'EMeOH/F à la dose de 200mg/mL. En revanche on note que l'EMeOH/F (200mg/mL) s'est révélé plus actif sur *S.aureus* ATCC et SARM que l'antibiotique de référence ($p < 0,05$).

Les travaux d'Ali-Shtayeh et *al.*, [25] ainsi que ceux de Chebouti-Meziou [333], rapportent que les extraits de feuilles d'*Inula viscosa* possèdent une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* et sont peu actifs ou inactif sur *E.coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Selon Oskay et Sari [395], les extraits polaires (éthanoliques) sont actifs sur *S. aureus*, SARM, *E.epidermidis*, *E. faecalis* *S. typhymurium* et inactif sur *E.coli*.

Side larbi et ses collaborateurs [396], ont rapporté que l'EMeOH/F est plus actif sur *S.aureus* et *E. faecalis* que sur *E.coli* ce qui concorde avec les résultats obtenus dans cette étude.

Selon Laghrifi et *al.*, [335], *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* et *Salmonella Paratyphi* A sont très sensible vis-à-vis de l'extrait méthanolique des feuilles avec des DZI se situant entre 55 à 60 mm. Ce qui est largement supérieur aux résultats obtenus dans cette étude.

Selon Rojas et *al.*, [397] ; Marjorie [398], l'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents composés qu'ils contiennent. Les acides phénoliques,

les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoides sont classés comme étant des composés antibactériens très actifs. La diversité de la composition chimique des extraits explique donc les variations observées dans l'activité antibactérienne d'une même plante. En effet l'efficacité optimal d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés contenus dans cet extrait [399].

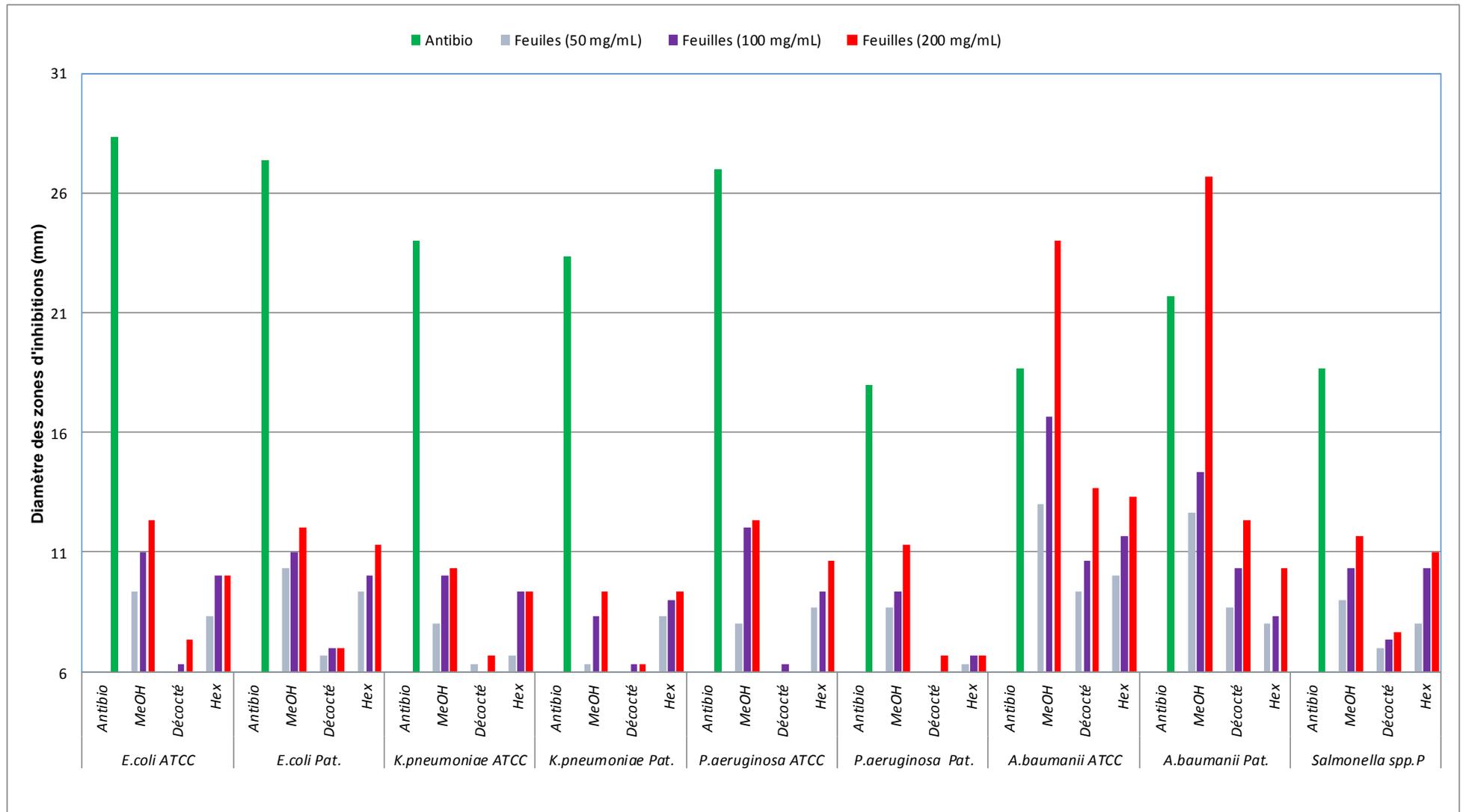


Figure 3.24. Activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* sur les bactéries à Gram négatif

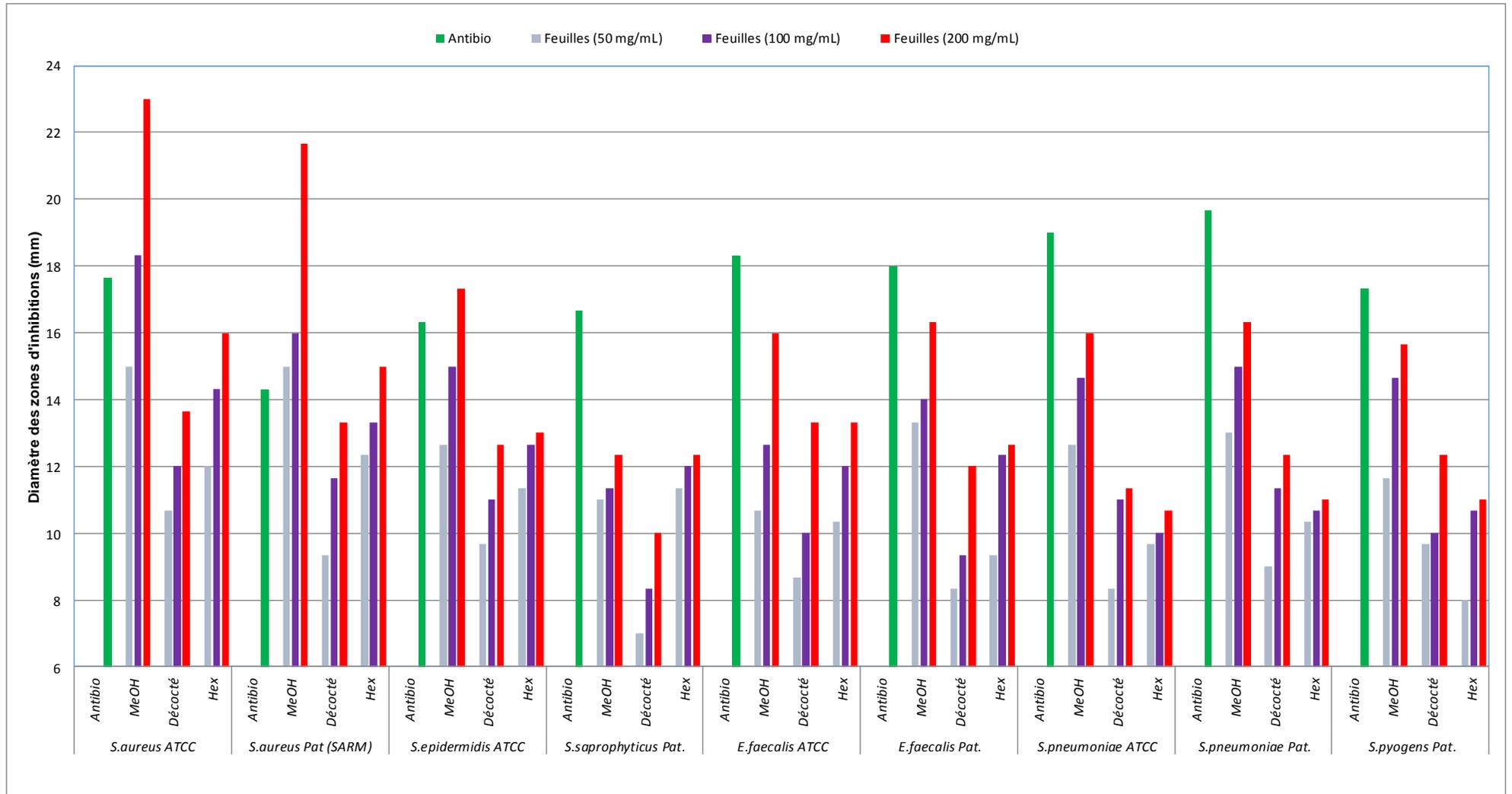


Figure 3.25. Activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* sur les bactéries à Gram positif

- Effet antibactérien des différents extraits fleurs d'*Inula viscosa*

L'étude de la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des différents extraits de fleurs d'*Inula viscosa* est représentée par les figures 3.26, 3.27 et les tableaux (appendice I).

Nous avons remarqué que le D/Flr à la dose de 200 mg/mL s'est montré inactif sur l'ensemble des bactéries à Gram négatif (DZI<10), à l'exception de *A. baumannii* qui a présenté une sensibilité moyenne vis-à-vis de cet extrait avec une moyenne de DZI de 12,67 mm (ATCC) et de 13 mm (souche Pat).

Les souches *K. pneumoniae* et la souche de *P. aeruginosa* 'Pat' ont montré une résistance à l'égard de l'extrait H/Flr (200mg/mL). Ce dernier a été peu actif sur *E.coli*, *A. Baumannii*, *Salmonella spp* et *P. aeruginosa* ATCC avec des moyenne de DZI comprises entre 10,33 et 12 mm.

On note que l'extrait EMeOH/Flr (200 mg/mL) a exercé une faible activité inhibitrice sur certaines bactéries à gram négatif : *E. coli*, *P.aeruginosa* et *Salmonella spp* avec des DZI allant de 10,67 à 12 mm. Néanmoins *A. baumannii* a présenté une grande sensibilité vis-à-vis de l'EMeOH/Flr avec une moyenne de DZI de 25 mm (Souche Pat) et de 20,67 mm (souche ATCC) ($p < 0,05$).

Nous remarquons aussi, que les souches de *K.pneumoniae* ATCC et Pat ont été résistantes à l'action de la totalité des extraits de fleurs.

L'antibiotique de référence (Imipenème) a montré un effet inhibiteur de la croissance bactérienne (Gram négatif) supérieur à celui de tous les extraits de fleurs sur l'ensemble des souches testées ($p < 0,05$) à l'exception d'*A. baumannii* qui a montré une meilleure sensibilité à l'EMeOH/Flr (200 mg/mL) ($p < 0,05$).

L'ensemble des extraits de fleurs ont présenté une activité inhibitrice sur la majorité des souches à Gram positif (Figure 3.27) avec des activités variables selon l'extrait et la souche testée.

Les souches *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* et *S. pyogenes* se sont montrées modérément sensibles vis-à-vis du D/Flr (200 mg/mL) avec des DZI variant entre 10 et 13,33mm. Seul *S. saprophyticus* a présenté une résistance à cet extrait DZI<10.

L'extrait H/Flr a montré une activité inhibitrice moyenne sur *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. Faecalis* et *S. pyogenes* avec des moyennes de DZI se situant entre 11,67 et 13,33 mm. Cependant les souches *S.aureus* ATCC et SARM ont été très sensibles à l'extrait H/F (15,67<DZI<16mm).

Selon Ben Sassi et *al.*, [400], les extraits obtenus par macération de la partie aérienne dans de l'hexane et du méthanol sont actifs sur *S.aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et inactif sur *E.coli* et *E. faecalis*.

L'effet inhibiteur observé avec l'extrait H/F pourrait être attribuée à la présence de composés terpéniques de type sesquiterpènes lactones [22] [114], qui possèdent une activité antibactérienne [401].

Les souches *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae* ATCC ont présenté une sensibilité moyenne à l'égard de l'EMeOH/Flr (12<DZI<13,33 mm), ce dernier a montré un fort effet inhibiteur sur *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (Pat) et *E. faecalis* avec une moyenne de DZI allant de 15 à 16,33 mm.

Les souches de *S.aureus* ATCC et SARM ont présenté des DZI de 21,67 mm, et de 19,33 mm respectivement témoignant de leur très forte sensibilité à l'EMeOH/Flr à la dose de 200 mg/mL.

Selon Gökbulut et *al.*, [97], les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs sont actifs contre *S.aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* et *P. aeruginosa* avec une meilleure sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif ce qui corrobore nos résultats.

La vancomycine a exercé un effet inhibiteur semblable à celui de l'EMeOH/Flr à la dose de 200 mg/mL sur *S. epidermidis*, *E. faecalis* ($p>0,05$) et une activité supérieur à tous les extraits sur *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ($p<0,05$).

Toutefois, nous avons constaté que l'EMeOH/Flr à la dose de 200 mg/mL a manifesté une meilleure activité inhibitrice de la croissance de *S.aureus* (ATCC et SARM) en comparaison avec le produit de référence (Vancomycine) $p < 0,05$.

Au vu des résultats de l'étude de l'activité antibactérienne, il nous apparait que les extraits méthanoliques ont été plus actifs que les extraits apolaires et les décoctés sur la majorité des souches testées.

En se référant aux résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ; il en ressort que l'activité inhibitrice des extraits d'*Inula viscosa* est plus importante sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Ces résultats ont également été constatés par Ali-Shtayeh et *al.*, [25]; Ben sassi et *al.*, [400]; Oskay et Sari [395]; Laghrifi et *al.*, [335] ; Abuhamdah et *al.*, [340] et par Chebouti-Meziou [333].

La différence de sensibilité des souches à Gram positif et celles à Gram négatif pourrait s'expliquer par l'aptitude des substances antimicrobiennes à se lier à leurs parois cellulaires. En effet les bactéries à Gram positif ont une couche externe plus perméable riche en peptidoglycane alors que les bactéries à Gram négatif ont une barrière extérieure plus rigide phospholipidique [402].

L'effet antibactérien obtenu avec les différents extraits méthanoliques de la plante pourrait être attribué à la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes [403] [404]. La sensibilité des bactéries aux différents polyphénols varie en fonction de la souche testée et de la structure du composé phénolique [405].

Cushnie et Lamb [406]; Xie et ses collaborateurs [404], ont rapporté que l'action antibactérienne des flavonoïdes pourraient être attribuée à différents mécanismes d'action : inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique (endommagement de la membrane ou augmentation de sa perméabilité) et inhibition du métabolisme énergétique bactérien.

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet antibactérien de certains flavonoïdes parmi elles, on note celles de Rauha et *al.*, [407]; Vaquero et *al.*, [408]; et de Li et Xu [409], qui ont rapporté que la quercétine possède une activité antimicrobienne contre *S.aureu*, *E.faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S.epidermidis*.

Par ailleurs Rajendran et ces collaborateurs [410], ont également mentionné dans leur étude que la quercétine et la quercétine glucoside présentent une bonne activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Dans leur étude, Puupponen-Pimiä et *al.*, [411], ont noté que la myricétine a une activité inhibitrice contre *E. faecalis* mais est inactive contre *salmonella*. D'après Demetzos et *al.*, [412], la myricétine est plus active sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram-négatif.

Xu et Lee [413], ont signalé que la myricétine, le kaempférol et la quercétine ont une bonne activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) [414]. Par ailleurs selon Lin et *al.*, [415], la quercétine et le kaempférol ont une faible concentration minimale inhibitrice du SARM.

Certains auteurs ont également étudié l'activité antibactérienne de quelques acides phénoliques parmi eux : Lou et ses collaborateurs [416], qui ont rapporté que l'acide chlorogénique a un fort effet inhibiteur contre de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif avec des CMI allant de 20 à 80 µg/mL. Selon cette étude l'acide chlorogénique lié à la membrane externe de la bactérie, perturbe sa perméabilité et entraîne une fuite du contenu cytoplasmique ce qui aboutit à la mort cellulaire.

Fiamegos et *al.*, [417], ont également démontré que l'acide chlorogénique isolé à partir d'*Artemisia absinthium* est plus actif contre *S.aureus* (ATCC et SARM), *E. faecalis* que sur *E.coli*. Puupponen-Pimiä et *al.*, [411], ont eux aussi rapporté son faible effet sur *E.coli*.

Dans cette même étude Fiamegos et ses collaborateurs [417], ont signalé l'effet inhibiteur des acides dicafféoylquiniques (1,3 ; 1,5 ; 3,5 et 4,5) sur les bactéries à Gram positif. En outre l'acide 4,5-dicafféoylquinique a été identifié et caractérisé comme ayant le potentiel de cibler et d'inhiber le système des pompes d'efflux de *E. faecalis* et *S.aureus* [418]. Sachant que ses pompes d'efflux sont responsables du rejet de diverses substances (dont les antibiotiques) hors de la cellule bactérienne ce qui engendre la résistance aux antibiotiques [419].

L'identification de ces différents composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes) dans les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* pourrait expliquer leur effet inhibiteur de la croissance des bactéries à Gram positif.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'activité antibactérienne varie selon la composition phytochimique des extraits (solvant d'extraction et organe végétal utilisé), des concentrations testées et selon la souche microbienne étudiée (Gram positif ou Gram négatif) [335].

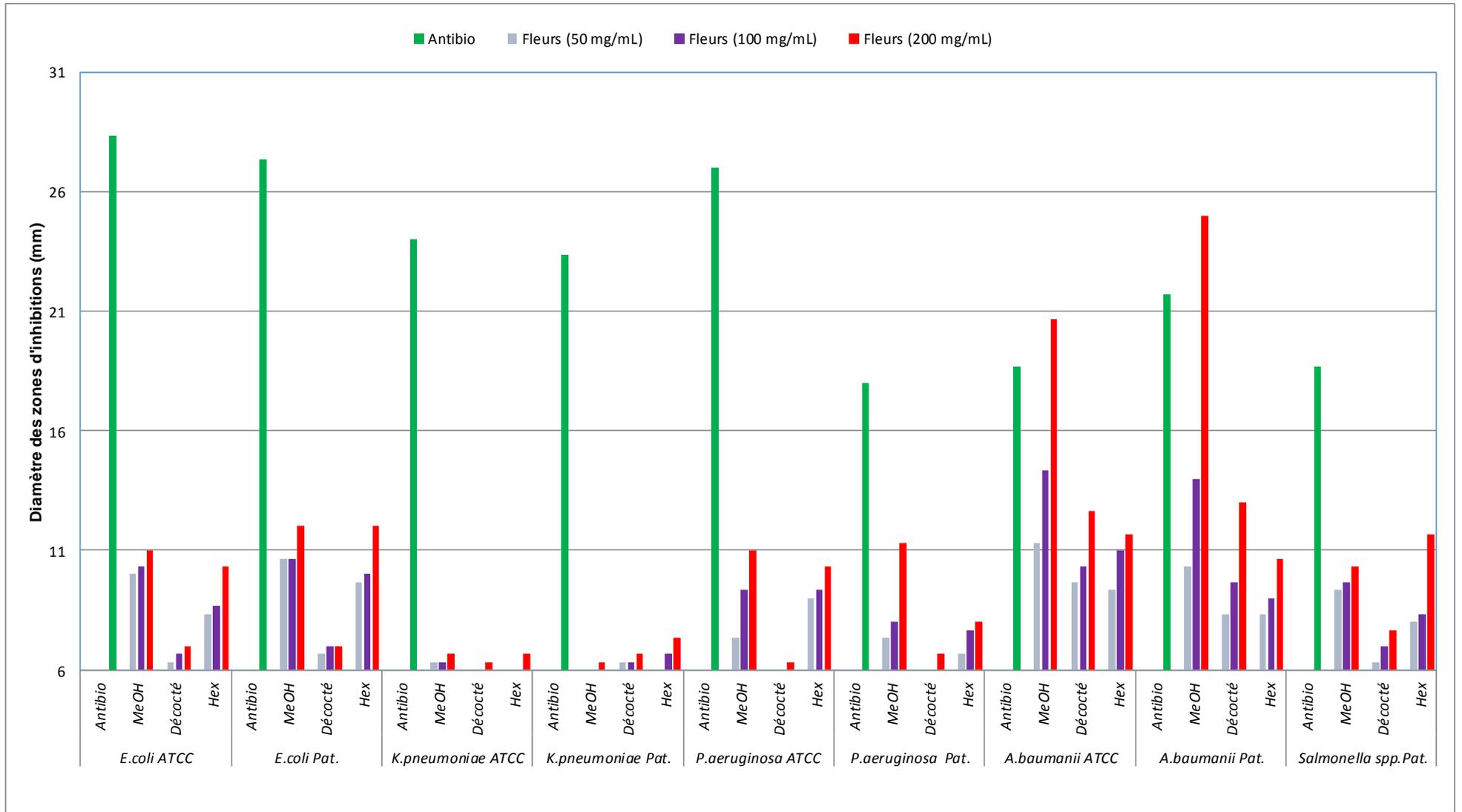


Figure 3.26. Activité antibactérienne des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* sur les bactéries à Gram négatif

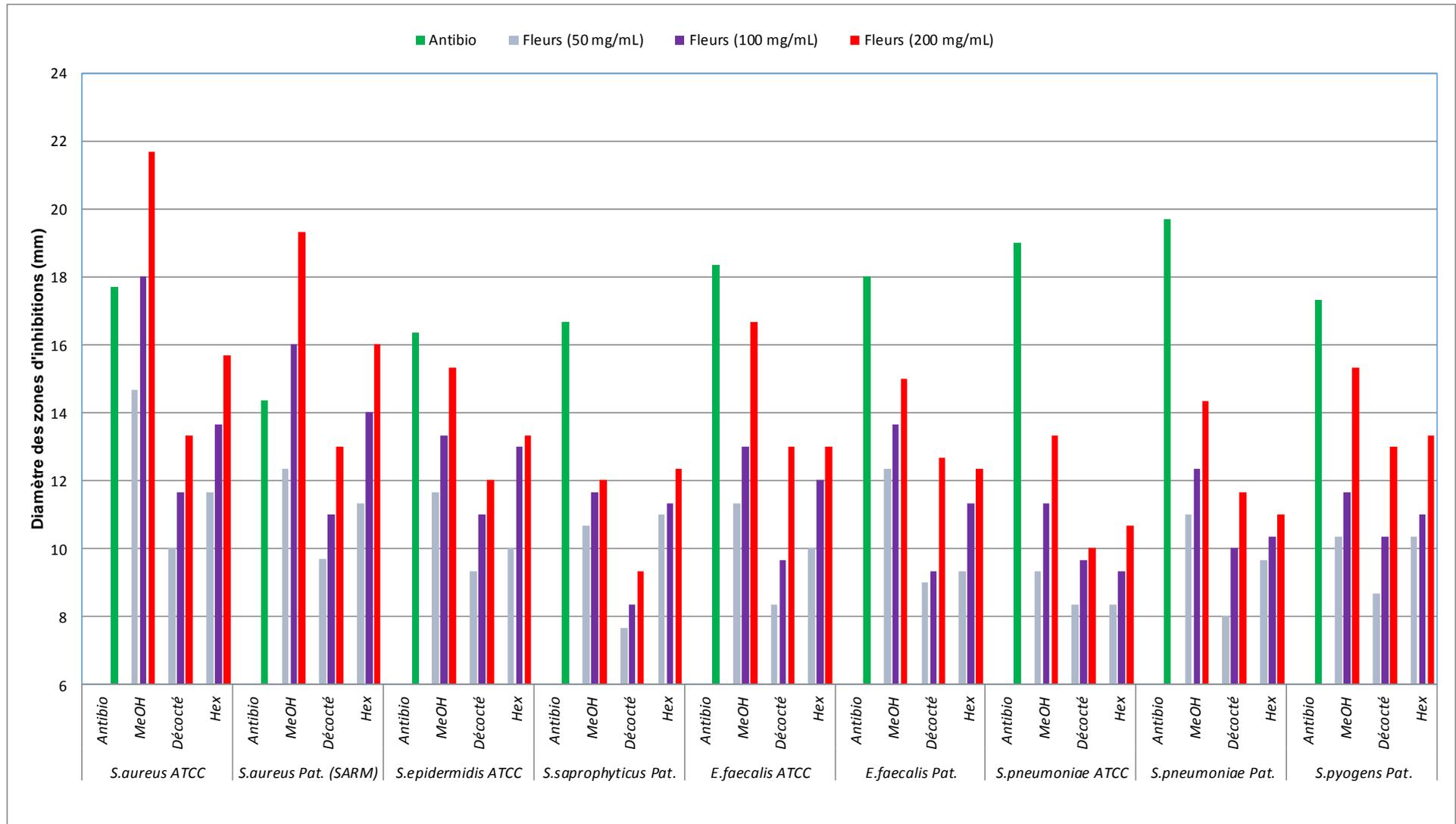


Figure 3.27. Activité antibactérienne des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* sur les bactéries à Gram positif

- Détermination des paramètres antibactériens (CMI, CMB)

La détermination des paramètres antibactériens a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide, sur 10 souches bactériennes (5 pathogènes et 5 de références) très sensibles vis-à-vis des différents extraits ($DZI \geq 15\text{mm}$) (Tableau 3.7).

La concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques et apolaires a été déterminée à partir d'une large gamme de concentrations allant de 1,56 à 100 mg/mL. Les CMI des extraits variaient entre 6,25 et 25 mg/mL.

D'après le tableau 1, on constate que les plus petites concentrations inhibitrices ont été obtenues avec l'EMeOH/F qui a présenté une très bonne activité sur *A.baumannii* et *S.pyogenes* (CMI=6,25 mg/mL) et *S.aureus* (CMI=12,5 mg/mL).

Les résultats de l'évaluation de l'effet bactéricide des méthanoliques et apolaires sont représentés dans le tableau 3.7, dans lequel sont incluses d'une part les concentrations minimales bactéricides (mg/mL) et d'autre part les valeurs du rapport entre la CMB/CMI.

Nous avons remarqué que les CMB des extraits variaient de 12,5 à 50 mg/mL pour les bactéries à Gram positif et de 25 à 50 mg/mL pour *A.baumannii*. Le rapport CMB/CMI pour l'ensemble des souches étudiées est compris entre 2 et 4, ce qui démontre que les extraits possèdent un effet bactéricide.

L'analyse des méthodes employées, par l'ensemble des travaux répertoriés, pour la détermination de la CMI a mis en évidence une grande variabilité entre les études. En effet, nous avons constaté que la majorité des études font appel à la technique de diffusion en milieu liquide. Selon l'étude de Budzyńska et ses collaborateurs [420], cette technique est plus sensible que la méthode de diffusion en milieu solide offrant ainsi une meilleure précision et une meilleure reproductibilité des résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sont dans l'ensemble comparables à ceux rapportés par Side larbi et *al.*, [396]. Cependant dans d'autres études les valeurs des CMI étaient inférieures à celles que nous avons enregistrées [97] [335] [400].

Tableau 3.7. Résultats de la CMI et de la CMB

Souches	CMI mg/mL				CMB mg/mL				Rapport CMB/CMI				interprétation
	MeOH/F	H/F	MeOH/Flr	H/Flr	MeOH/F	H/F	MeOH/Flr	H/Flr	MeOH/F	H/F	MeOH/Flr	H/Flr	
<i>A.baumannii</i> ATCC	12,5	/	12,5	/	25	/	25	/	2	/	2	/	Bactéricide
<i>A.baumannii</i> Pat	6,25	/	12,5	/	25	/	25	/	4	/	2	/	Bactéricide
<i>S.aureus</i> ATCC	12,5	25	12,5	25	25	50	25	50	2	2	2	2	Bactéricide
<i>S.aureus</i> Pat (SARM)	12,5	25	12,5	25	50	50	50	50	4	2	4	2	Bactéricide
<i>S.epidermidis</i> ATCC	25	/	25	/	50	/	50	/	2	/	2	/	Bactéricide
<i>E.faecalis</i> ATCC	25	/	12,5	/	50	/	25	/	2	/	2	/	Bactéricide
<i>E.faecalis</i> Pat	25	/	25	/	50	/	50	/	2	/	2	/	Bactéricide
<i>S.pneumoniae</i> ATCC	25	/	/	/	50	/	/	/	2	/	/	/	Bactéricide
<i>S.pneumoniae</i> Pat	25	/	25	/	50	/	50	/	2	/	2	/	Bactéricide
<i>S.pyogens</i>	6,25	/	12,5	/	12,5	/	25	/	2	/	2	/	Bactéricide

3.5.1.2.2 Activité anticandidosique

Les résultats obtenus avec l'ensemble des extraits méthanoliques, n-hexane et décoctés des feuilles et des fleurs sont rapportés dans les Tableaux 3.8 et 3.9.

Les souches de *Candida* (Tableau 3.8) se sont montrées peu sensibles à l'égard de l'extrait H/F et l'EMeOH/F et D/F en comparaison avec l'antifongique de référence ($p < 0,05$), à l'exception de *C.albicans ATCC* et *C. tropicalis* qui se sont révélés résistants à l'EMeOH/F.

Tableau 3.8. Activité antifongique des feuilles d'*Inula viscosa*

Souches	EMeOH/F	D/F	H/F	Antifongique
<i>C.albicans ATCC</i>	9,67±0,33 ^c	12,33±0,33 ^b	11,33±0,33 ^b	18,33±0,33 ^a
<i>C.albicans Pat</i>	10±0 ^b	11±0,58 ^b	10,33±0,33 ^b	20,67±0,33 ^a
<i>C.glabrata Pat</i>	10,33±0,33 ^c	12±0 ^b	12±0 ^b	18±0 ^a
<i>C.tropicalis Pat</i>	9±0 ^c	12,33±0,33 ^b	11,33±0,33 ^b	16±0,58 ^a
<i>C.parapsilosis Pat</i>	11±0,58 ^b	11,67±0,33 ^b	11,67±0,33 ^b	19±0 ^a

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et l'antifongique ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

Le test réalisé avec les extraits de fleurs (Tableau 3.9) a révélé également une résistance des souches de *Candida* à l'EMeOH/Flr et une faible activité des extraits H/Flr et D/F en comparaison avec la nystatine $p < 0,05$.

Tableau 3.9. Activité antifongique des fleurs d'*Inula viscosa*

Souches	EMeOH/Flr	D/Flr	H/F	Antifongique
<i>C.albicans ATCC</i>	8,67±0,33 ^c	12±0 ^b	11±0 ^b	18,33±0,33 ^a
<i>C.albicans Pat</i>	9±0 ^d	12,67±0,67 ^b	11,33±0,33 ^c	20,67±0,33 ^a
<i>C.glabrata Pat</i>	8,67±0,33 ^d	11±0 ^b	10±0 ^c	18±0 ^a
<i>C.tropicalis Pat</i>	9,33±0,33 ^c	11,67±0,33 ^{bc}	11,33±0,33 ^b	16±0,58 ^a
<i>C.parapsilosis Pat</i>	10,33±0,33 ^c	12,33±0,33 ^b	12±0 ^b	19±0 ^a

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et l'antifongique ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

Ali-Shtayeh et *al.*, [25], ont rapporté que l'infusé des feuilles d'*Inula viscosa* est actif sur *C.albicans* contrairement à l'extrait éthanolique.

Les travaux d'Oskay et Sari [395] ; Gökbulut et *al.*, [97] ; Chebouti-Mzeiou [333], ont démontré que les extraits d'*Inula viscosa* ont une bonne activité antifongique contre les souches de *candida albicans*. Gökbulut et *al.*, [196], ont ajouté que les extraits méthanoliques des racines sont plus actifs que ceux des feuilles et des fleurs.

Rhimi et ses collaborateurs [92], Ont rapporté que les différents extraits : éthanoliques, butanoliques et méthanoliques ont une même activité anti-candida variant de 7 à 14,5 mm selon la souche étudiée.

Maoz et Neeman [157], ont rapporté que les extraits des feuilles d'*Inula viscosa* ont entraîné une diminution de la teneur en chitine de la paroi de certains dermatophytes et de *Candida albicans*

Selon Cafarchia et *al.*, [421], Cafarchia et *al.*, [422], et Mahmoudi et *al.*, [91], les extraits d'*Inula viscosa* principalement ceux qui contiennent des sesquiterpènes seraient actifs contre les champignons filamenteux de type *Fusarium*, *microsporium*, *Septoria*, *Sclerotinia*.

Nous avons constaté que la composition chimique de l'extrait, les concentrations testées, l'organe végétal utilisé, le solvant et la méthode d'extraction peuvent influencer sur les résultats de l'activité antimicrobienne.

3.5.1.2.3 Résultats de l'activité leishmanicide

C'est en nous référant à une enquête ethnobotanique réalisé au Maroc par [423], dans laquelle *Inula viscosa* est recensée comme étant utilisée sous forme de cataplasme pour soigner la leishmaniose cutanée [424] que nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet leishmanicide de certains extraits d'*Inula viscosa* (EMeOH/F ;D/F ; EMeOH/FI_r et D/FI_r) .

Il existe plusieurs techniques expérimentales qui permettent l'évaluation de l'activité leishmanicide, dont des tests *in vitro* sur les deux formes promastigotes et amastigotes et des tests *in vivo* sur modèle animal [425] [426] [427]. Notre choix s'est

porté sur la méthode *in vitro* qui consiste à tester nos extraits sur des cultures parasitaires en milieu axénique. Ces tests rapides permettent le criblage de nombreuses molécules potentiellement leishmanicides et donnent des résultats cohérents [428].

3.5.1.2.3.1 Résultats de l'effet leishmanicide des extraits sur la forme promastigote

Deux méthodes qui révèlent le pourcentage de viabilité cellulaires ont été utilisées à savoir celle du bleu de Trypan (Comptage visuel) et celle du MTT (Colorimétrie) [307] [425] [429].

Les résultats du test de l'activité leishmanicide du DMSO à 0,3% utilisé comme solvant pour la dissolution des extraits méthanoliques (Tableau 3.10) suggèrent qu'à cette concentration le DMSO n'a pas eu d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la croissance des deux souches étudiées (*L. infantum*, *L. major*) et cela aussi bien par la méthode du bleu de Trypan que par celle du MTT.

Tableau 3.10. Effet du DMSO à 0,3% sur la croissance des souches de leishmanies

Lots	% de viabilité	
	Bleu de Trypan	MTT
<i>L. infantum</i>	100±2,50	100±1,44
<i>L. infantum</i> + DMSO à 0,3%	99,72±1,73	99,45±1,18
<i>L. major</i>	100±3,31	100±1,40
<i>L. major</i> + DMSO à 0,3%	99,33±2,46	99,31±1,01

a. Effet leishmanicide des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

Les résultats de l'activité leishmanicide des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles évaluées par méthode du bleu de trypan (BT) et celle du MTT (Figures 3.28 et 3.29) montrent une diminution de la viabilité des deux souches testées avec l'augmentation de la concentration des extraits et du SBIII ($p < 0,05$).

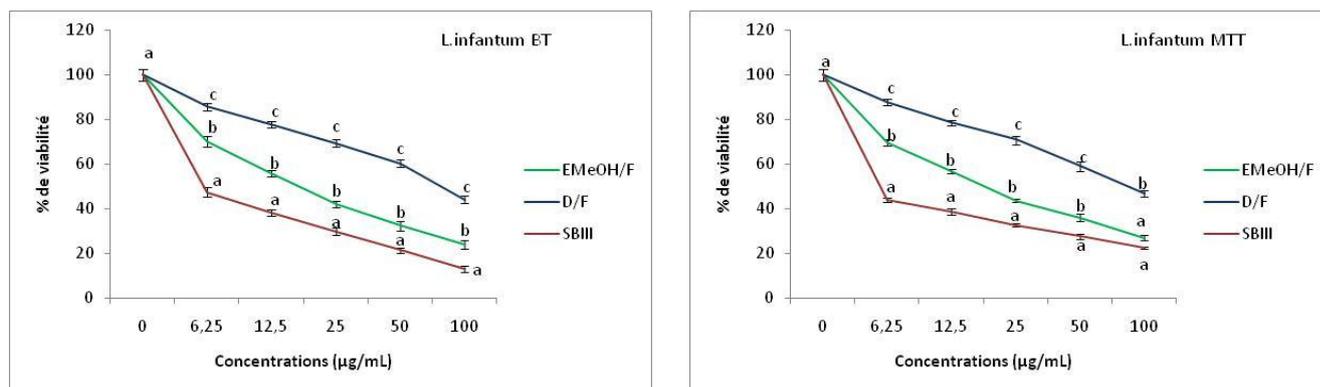


Figure 3.28. Activité leishmanicide des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* et SBIII sur la souche *L. infantum*

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et le SBIII ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

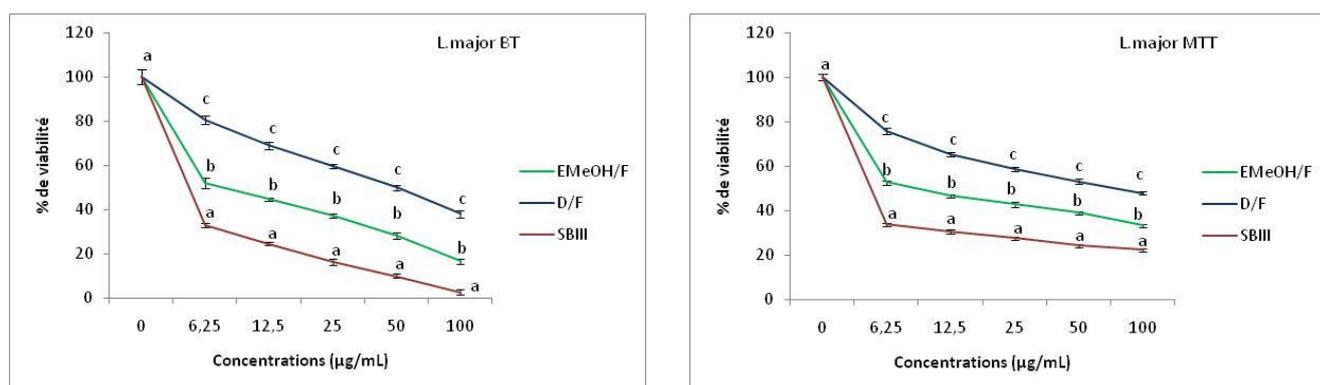


Figure 3.29. Activité leishmanicide des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* et SBIII sur la souche *L. major*

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et le SBIII ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

Les valeurs des CI_{50} ont été déterminées à partir des courbes de % de viabilité des souches parasitaires en fonction des concentrations (de 6,25 à 100 µg/mL) (Tableau 3.11).

L'évaluation de l'activité anti-leishmanienne par la méthode de coloration par le bleu de Trypan (Tableau 3.11) a révélé que la plus faible CI_{50} a été observée avec le SBIII (Témoin positif) : *L. infantum* ($7,98 \pm 0,15$ µg/mL) et *L. major* ($3,66 \pm 0,16$ µg/mL). Concernant les extraits de feuilles d'*Inula viscosa*, L'EMeOH/F a présenté

une CI_{50} plus faible ($18,84 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$) que celle du D/F ($65,69 \pm 1,96 \mu\text{g/mL}$) sur *L. infantum* et également sur *L. major* ($11,20 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$ pour l'EMeOH/F ; $42,16 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$ pour le D/F).

La méthode du MTT (Tableau 3.11) a également montré que la meilleure activité inhibitrice de la croissance des leishmanies a été obtenue avec le SBIII avec une CI_{50} de $8,67 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ sur *L. infantum* et de $5,66 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ sur *L. major*, suivi par l'EMeOH/F avec une CI_{50} de $20,50 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$ et de $15,58 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ sur *L. infantum* et *L. major* respectivement. Le D/F s'est encore avéré le moins actif avec les CI_{50} les plus élevées : $69,22 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ (*L. infantum*) et $45,87 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ (*L. major*) ($p < 0,05$).

Tableau 3.11. Valeurs des CI_{50} des extraits des feuilles d'*Inula viscosa* et du SBIII

Souches	Lots	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		Bleu de Trypan	MTT
<i>L. infantum</i>	EMeOH/F	$18,84 \pm 1,10^c$	$20,50 \pm 1,28^c$
	D/F	$65,69 \pm 1,96^e$	$69,22 \pm 1,23^e$
	SBIII	$7,98 \pm 0,15^{ab}$	$8,67 \pm 0,1^a$
<i>L. major</i>	EMeOH/F	$11,20 \pm 0,51^b$	$15,58 \pm 0,30^b$
	D/F	$42,16 \pm 1,86^d$	$45,87 \pm 0,49^d$
	SBIII	$3,66 \pm 0,16^a$	$5,61 \pm 0,13^a$

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits de feuilles et le SBIII sur les deux souches étudiées ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

b. Effet leishmanicide des extraits des fleurs d'*Inula viscosa*

Les résultats du test *in vitro* de l'activité anti-promastigote par les deux méthodes (Bleu de Trypan et MTT) des extraits des fleurs de l'*Inula viscosa* (Figures 3.30 et 3.31) révèlent que ces derniers inhibent la viabilité des deux souches de leishmanies d'une manière dépendante des concentrations des extraits ($p < 0,05$).

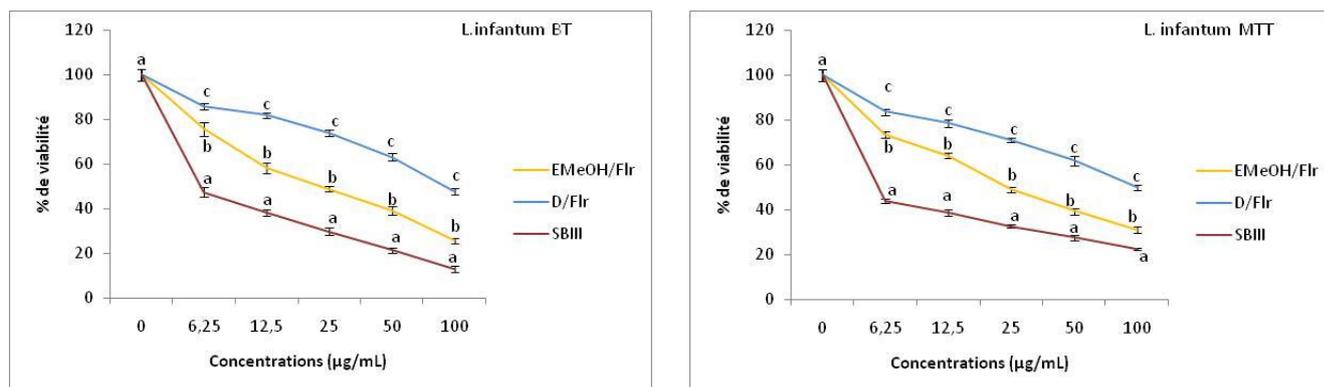


Figure 3.30. Activité leishmanicide des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* et SBIII sur la souche *L. infantum*

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et le SBIII ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

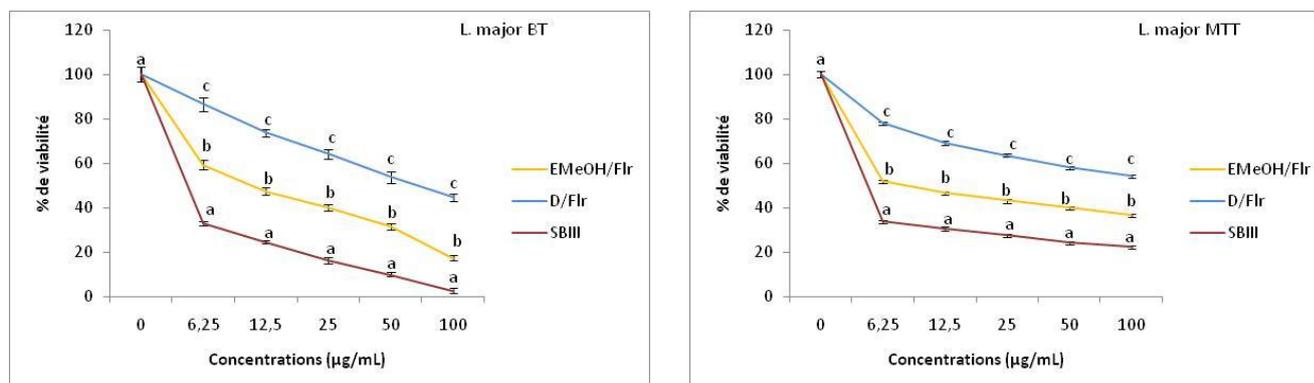


Figure 3.31. Activité leishmanicide des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* et SBIII sur la souche *L. major*

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et le SBIII ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

La méthode de révélation au bleu de Trypan (Tableau 3.12) nous a permis de constater que l'EMeOH/Flr possède une meilleure activité leishmanicide que le D/Flr ($p < 0,05$) avec des CI_{50} de $24,09 \pm 0,74$ $\mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et de $13,77 \pm 0,44$ $\mu\text{g/mL}$ pour *L. major*. Toutefois le D/Flr a présenté un effet inhibiteur avec des CI_{50} de $79,41 \pm 1,60$ $\mu\text{g/mL}$ sur *L. infantum* et de $55,36 \pm 2,21$ $\mu\text{g/mL}$ sur *L. major*.

La méthode de réduction des sels de tétrazolium (MTT) a révélé des résultats similaires à ceux du bleu de Trypan (Tableau 3.12), démontrant encore une fois que les CI_{50} les plus faibles ont été obtenues avec l'EMeOH/Flr en comparaison avec celles du D/Flr et ceci vis-à-vis des deux souches de leishmanies étudiées ($p < 0,05$).

Tableau 3.12. Valeurs des CI_{50} des extraits des fleurs d'*Inula viscosa* et du SBIII

Souches	Lots	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		Bleu de Trypan	MTT
<i>L. infantum</i>	EMeOH/Flr	24,09 \pm 0,74 ^b	26,78 \pm 1,67 ^c
	D/Flr	79,41 \pm 1,60 ^d	74,56 \pm 1,20 ^e
	SBIII	7,98 \pm 0,15 ^a	8,67 \pm 0,1 ^a
<i>L. major</i>	EMeOH/Flr	13,77 \pm 0,44 ^{ab}	16,18 \pm 0,30 ^b
	D/Flr	55,36 \pm 2,21 ^c	61,39 \pm 1,8 ^d
	SBIII	3,66 \pm 0,16 ^a	5,61 \pm 0,13 ^a

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits de fleurs et le SBIII sur les deux souches étudiées ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

La comparaison des différentes CI_{50} du SBIII, des extraits méthanoliques et des décoctés des deux organes de la plante nous a permis de les classer comme suit ($p < 0,05$):

$$\text{SBIII} > \text{EMeOH/F} \sim \text{EMeOH/Flr} > \text{D/F} > \text{D/Flr}$$

Cette comparaison a également établi que tous les extraits testés étaient plus actifs sur *L. major* que sur *L. infantum* ($p < 0,05$), alors que les CI_{50} obtenues avec le SBIII n'ont pas présenté de différence significative entre les deux souches ($p > 0,05$).

Selon Silva-Silva et *al.*, [430], des extraits ayant $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ sont considérés comme étant actif.

Les résultats obtenus indiquent un pouvoir leishmanicide de cette plante plus particulièrement des extraits EMeOH/F et l'EMeOH/Flr envers la souche dermatrope (*L. major*) et viscérotrope (*L. infantum*). A notre connaissance aucune étude antérieure n'a été réalisée avec les extraits méthanoliques de cette plante.

Une étude menée par Avolio et ses collaborateurs en 2014 [431], a prouvée l'effet leishmanicide des molécules Inuloxins A-D (sesquiterpénoïdes) et leurs dérivés isolés à partir d'*Inula viscosa* sur *L. Donovanii* (méthode Alamar Blue).

Cependant une récente étude réalisée en Palestine par Hamarsheh et *al.*, [432], portant sur l'activité antileishmanienne de certains extraits de plantes obtenus par macération dans de l'éthanol (30%) et le DMSO n'a pas révélé d'effet d'*Inula viscosa* sur *L. major* (méthode Alamar Blue). Les différences dans les procédures opératoires de ces études (nature et composition des extraits, solvants utilisés pour l'extraction, souches testées et méthodes d'évaluation de l'activité) peuvent justifier l'obtention de résultats divergents.

L'activité antileishmanienne des extraits d'*Inula viscosa* pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques. Plusieurs études ont en effet indiqué que les polyphénols inhibent potentiellement les deux formes amastigote et promastigote de différentes espèces de *Leishmania* [424] [433] [434] [435].

Des flavonoïdes ont été cités comme ayant une activité antileishmanienne [180] [436], parmi eux la quercétine et la quercétine glucoside [181] [437] [438] [439] [440] [441], le Kaempférol [439] [442], l'isorhamnétine, la myricétine et la diosmétine [439].

D'autres études ont démontré l'activité leishmanicide de certains acides phénoliques [439] [441] [443]. L'acide chlorogénique (ester de l'acide cafféique et l'acide quinique) a été rapporté comme inactif sur *L. donovani* [444]. Cependant dans l'étude de Kirmizibekmez et *al.*, [445], l'acide chlorogénique a montré une activité contre la forme amastigote de *L. donovani*. Montrieux et ses collaborateurs [441], ont également rapporté l'activité antileishmanienne de l'acide chlorogénique sur la forme promastigote et amastigote de *L. amazonensis*. Lucarini et *al.*, [446], ont également indiqué que l'acide 3,5-DCQ possède une activité leishmanicide sur la forme promastigote de *L. amazonensis*

L'identification de ces molécules dans les extraits méthanoliques (EMeOH/F et/ou EMeOH/Flr) d'*Inula viscosa* pourrait expliquer leur activité leishmanicide observée vis-à-vis de la forme promastigote de *L. major* et *L. infantum*.

3.5.1.2.3.2 Résultats de l'activité cytotoxique

Les résultats ainsi obtenus nous ont poussés à évaluer la cytotoxicité des différents extraits testés dans le but d'estimer l'Index de sélectivité (IS) vis-à-vis des leishemanyes.

La vérification de l'effet du DMSO à 0,3% sur la croissance des cellules de la lignée THP-1 (Tableau 3.13) n'a pas révélé de différence significative avec celle du témoin négatif ($p > 0,05$) et ceci par les deux méthodes de révélation de la viabilité cellulaire (Bleu de Trypan et MTT).

Tableau 3.13. Effet du DMSO à 0,3% sur les cellules THP-1

Lots	% de viabilité	
	Bleu de Trypan	MTT
THP-1	100±2,94	100±1,15
THP-1+DMSO à 0,3%	95,51±2,63	96,76±2,11

Le comptage visuel des cellules viables (blanches) par la méthode de coloration au bleu de Trypan (Figures 3.32 et 3.33) nous a permis de noter qu'aucune différence significative n'a été observée entre les cellules du groupe témoin et celles des groupes traités par tous les extraits aux différentes concentrations ; avec des pourcentages de viabilité de 90,45% (EMeOH/F), 92,13% (D/F), 89,95% (EMeOH/Flr) et 91,71% (D/Flr) à la dose la plus élevée à savoir 100 µg/mL ($p > 0,05$).

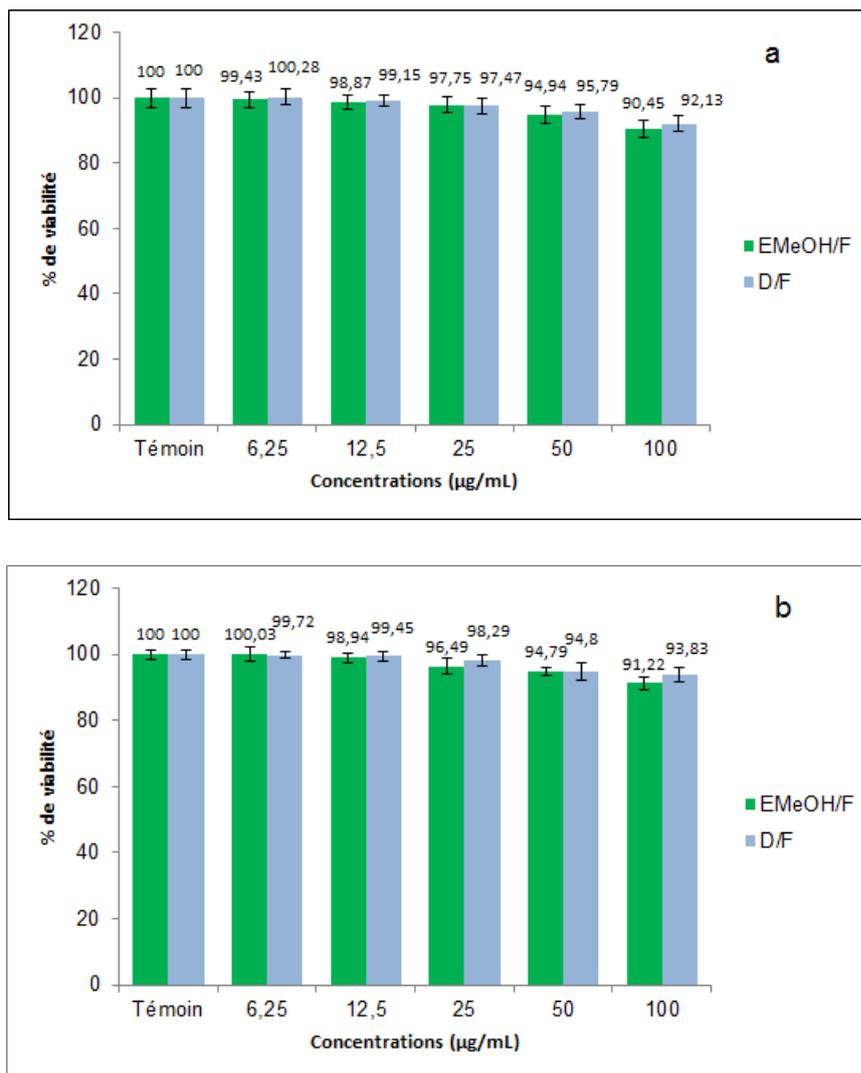


Figure 3.32. Effet cytotoxique des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* sur la viabilité des cellules THP-1 (a) Bleu de Trypan ; (b) MTT

La comparaison des résultats obtenus avec la méthode du MTT (Figures 5 et 6) a également montré qu'aucune différence significative n'a été observée entre le pourcentage de viabilité des macrophages du groupe témoin et ceux des groupes traités par les différents extraits ($p > 0,05$).

Aucune différence significative n'a également été constatée entre les différentes doses du même extrait ($p > 0,05$) et ceux-ci par les deux méthodes.

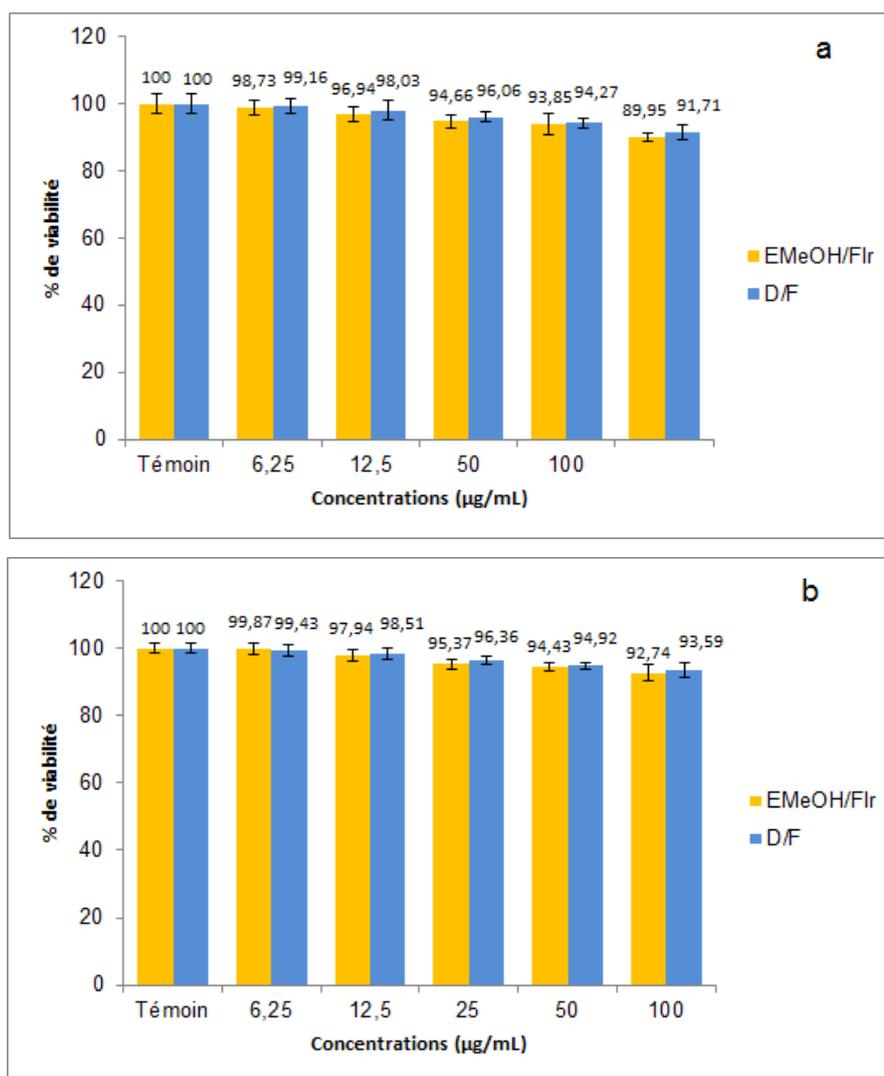


Figure 3.33. Effet cytotoxique des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* sur la viabilité des cellules THP-1 (a) Bleu de Trypan ; (b) MTT

De ce fait nous n'avons pas pu déterminer la CC_{50} (Tableau 3.14 et 3.15) des différents extraits étant donné que la dose la plus élevée testée n'a pas eu d'effet significatif sur la viabilité et la croissance des THP-1. Nous estimons alors que les CC_{50} des extraits méthanoliques et décoctés devraient être supérieures à 100 µg/mL.

Tableau 3.14. Index de sélectivité (IS) des extraits des feuilles vis-à-vis des souches de leishmanies

Souches	Extraits	CC ₅₀		IS	
		Bleu de Trypan	MTT	Bleu de Trypan	MTT
<i>L. infantum</i>	EMeOH/F	>100	>100	>5,31	>4,88
	D/F	>100	>100	>1,52	>1,44
<i>L. major</i>	EMeOH/F	>100	>100	>8,93	>11,53
	D/F	>100	>100	>2,37	>2,18

Tableau 3.15. Index de sélectivité (IS) des extraits des feuilles vis-à-vis des souches de leishmanies

Souches	Extraits	CC ₅₀		IS	
		Bleu de Trypan	MTT	Bleu de Trypan	MTT
<i>L. infantum</i>	EMeOH/Flr	>100	>100	>4,15	>3,73
	D/Flr	>100	>100	>1,26	>1,34
<i>L. major</i>	EMeOH/Flr	>100	>100	>7,26	>6,18
	D/Flr	>100	>100	>1,80	>1,63

L'index de sélectivité (IS) qui correspond au rapport des valeurs des CC₅₀ de l'activité cytotoxique sur les THP-1/ CI₅₀ de l'activité leishmanicide (Tableau 3.14.et 3.15) indique des valeurs variables en fonction des souches de leishmanies testées.

Les valeurs de l'IS sont : >1,52 pour le D/F, >5,31 pour l'EMeOH/F, > 1,26 pour le D/Flr et > 4,15 pour l'EMeOH/Flr pour *L. infantum* par la méthode du bleu de Trypan, avec un IS maximum observé avec l'EMeOH/F (>8,93) vis-à-vis de *L. major*.

Les IS déterminés par la méthode du MTT sont similaires à ceux obtenus par le bleu de Trypan.

Les valeurs des index de sélectivité ainsi estimées peuvent nous renseigner sur l'effet leishmanicide sélectif des extraits méthanoliques et des décoctés sur les deux souches de leishmanies étudiées.

En effet un produit ayant un $IS > 1$ est considéré comme étant plus sélectif envers le parasite et en revanche un $IS < 1$ est considéré plus sélectif envers les cellules THP-1 [308] [447] [448] [449].

Inula viscosa a fait l'objet de nombreuses études de cytotoxicité qui montrent des résultats variables selon le protocole réalisé à savoir : la composition chimique des extraits, les concentrations testées ainsi que la lignée cellulaire étudiée [450] [451] [452] [453] [454] [455] [456] [457] [458].

Les molécules précédemment décrites comme ayant une activité leishmanicide : la Quercétine et la quercétine glucoside, le Kaempférole, l'Isorhamnétine, la myrécétine, la diosmétin et l'acide chlorogénique ont toutes montré une sélectivité envers les souches de leishmanies testées (CC_{50} sur la lignée cellulaire testées était supérieure à celle de CI_{50} vis-à-vis des leishmanies), leur IS était supérieur à 1 [437] [438] [439] [440] [441] [442] [445] [446].

3.5.1.2.3.3 Résultats du test des comètes

Le test des comètes en conditions alcalines (électrophorèse sur gel) est la méthode la plus largement utilisée pour mesurer les lésions de l'ADN dans les cellules eucaryotes [459]. Ce qui a rendu le test de la comète populaire est probablement son faible coût, sa polyvalence et sa fiabilité dans la génération de résultats [460]. Son utilité et sa facilité de réalisation conduisent à son application rapide dans plusieurs domaines, comme les études de génotoxicité [310] [461] [462] [463] [464].

L'évaluation de la sensibilité des souches parasitaires aux différents extraits ainsi que l'estimation des IS, nous ont encouragés à approfondir l'étude de l'activité leishmanicide des extraits qui ont présenté le plus d'activité (CI_{50} la plus faible) à savoir L'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr dans le but d'observer d'éventuels

endommagements de l'ADN des souches *L. major* et *L. infantum* suite à leur traitement par ces deux extraits.

La réalisation du test des comètes sur la souche *L. major* n'a pas été concluante. Nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables après la réalisation de la technique. Par conséquent, nous n'avons pu reproduire ce protocole que sur *L. infantum*.

IL existe deux types d'interprétation des résultats, les deux dépendent de la microscopie à fluorescence après coloration par un colorant de liaison approprié à l'ADN. Dans le comptage visuel, les comètes sont répertoriées dans l'une des cinq classes (de 0 à 4) selon la présence et l'intensité de leur queue. La méthode alternative est basée sur l'analyse d'image directement sur ordinateur, ce qui donne une valeur du % ADN dans la queue pour chaque comète. En termes d'objectivité, une analyse d'image automatisée devrait être meilleure que la classification visuelle. Cependant, dans certains cas elle peut rencontrer des problèmes d'interprétation, surtout en cas de chevauchement des comètes ce qui se produit quand il y a beaucoup de fragments d'ADN qui se détachent du noyau [465].

Dans notre étude nous avons effectué une classification visuelle des comètes en nous basant sur l'intensité de la formation d'une queue (tail) inhérentes à la fragmentation de l'ADN de la forme promastigote des *L. infantum*.

La figure 3.34, montre la distribution des différentes classes de comètes obtenues pour les cultures parasitaires (*L. infantum*) du groupe témoin négatif (non traité) et ceux traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Fir à la dose de 25 µg/mL.

La figure 3.35, montre des images des différentes classes de comètes (5 classes) utilisées pour le calcul du score de l'endommagement de l'ADN de *L. infantum*.

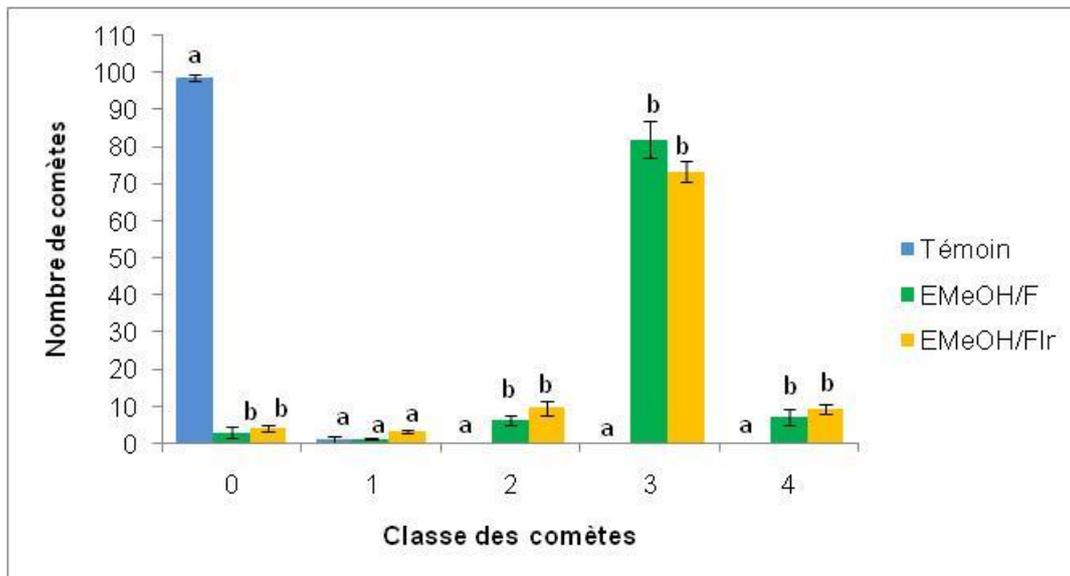


Figure 3.34. Histogramme de la distribution des comètes de *L. infantum* des groupes traités par les extraits méthanoliques et du groupe témoin négatif

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative entre les extraits et le témoin dans la même classe ($p < 0,05$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Tukey

D'après la figure 3.34, nous remarquons que la classe '0' (noyau intact) est prédominante dans le groupe témoin négatif (98,33%) en comparaison avec les groupes traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr ($p < 0,05$), ce qui indique que l'ADN des parasites de ce groupe n'a pas été détruit. Dans le groupe témoin nous avons également observé un faible pourcentage (1,67%) de comètes de classe '1' (faiblement endommagé). Aucune comète de classes 2, 3 et 4 n'a été retrouvée dans le groupe témoin.

Concernant les groupes traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr nous avons pu distinguer la formation d'une ébauche caudale (Figure 3.35 '2'), indiquant un endommagement de l'ADN des parasites qui libère des fragments qui migrent vers l'anode suite à leur exposition à un bain d'électrophorèse. Une grande majorité de comètes de la classe '3' a été retrouvée dans les groupes traités par l'EMeOH/F (82%) et l'EMeOH/Flr (73,33%), ce qui indique un fort endommagement de l'ADN des *L. infantum* traitées par ces deux extraits (figure 3.35 '3'). Ceci est bien visible par la formation d'une queue plus allongée et plus distante du noyau indiquant une plus forte fragmentation de l'ADN. Nous avons également pu observer quelques comètes de la classe 4 dans les groupes traités par l'EMeOH/F (7,33%) et

l'EMeOH/Fir (9,33%) ce qui traduit un endommagement complet de l'ADN des parasites dont les noyaux ne peuvent plus être clairement distingués des queues (figure 3.35 '4') [466].

Aucune différence significative n'a été observée entre la distribution des classes de comètes dans les groupes traités par l'EMeOH/F et ceux traités par l'EMeOH/Fir ($p > 0,05$).

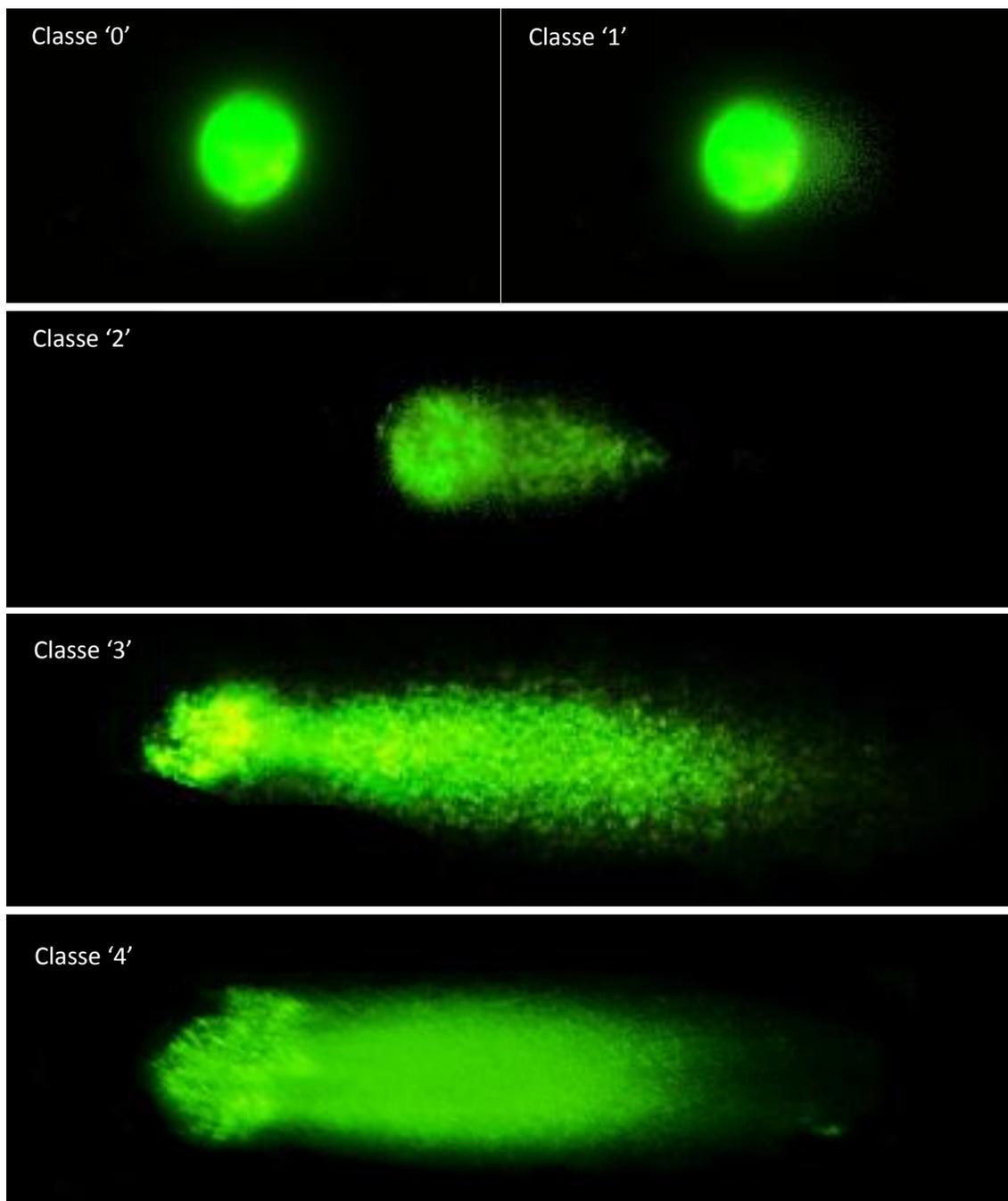


Figure 3.35. Images des différentes classes de comètes (5 classes) (Originale, 2017)

La visualisation intensive de comètes de classe 3 dans les groupes traités en comparaison avec le groupe témoin négatif ($p < 0,05$) indique l'effet génotoxique exercé par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr sur l'ADN de ce parasite [466].

Nous avons constaté une différence significative (Tableau 3.16) dans le score relatif à l'endommagement de l'ADN entre le groupe témoin ($0,017 \pm 0,01$) et les groupes traités par l'EMeOH/F ($2,88 \pm 0,08$) et l'EMeOH/Flr ($2,77 \pm 0,06$) avec $p < 0,001$. Les extraits méthanoliques des deux organes de la plante semblent avoir eu le même effet sur l'ADN de la souche *L. infantum*.

Tableau 3.16. Score de l'endommagement de l'ADN de la souche *L. Infantum* traitée par les extraits méthanoliques et ceux du groupe témoin négatif

Lots	Classes (%)					Score
	0	1	2	3	4	
Témoin négatif	98,33	1,67	0	0	0	$0,017 \pm 0,01$
MeOH/F	3	1,33	6,33	82	7,33	$2,88 \pm 0,08^{***}$
MeOH/Flr	4,33	3,33	9,67	73,33	9,33	$2,77 \pm 0,06^{***}$

*** $p < 0,001$ indique une différence significative en comparaison avec le groupe du témoin négatif ($n=3$) en utilisant le test ANOVA One-way suivi par le test de Dunnett

A notre connaissance l'évaluation de l'endommagement de l'ADN de *L. infantum* provoqué par les extraits d'*Inula viscosa* n'a fait l'objet d'aucune étude antérieure. Ces résultats sont prometteurs, toutes fois il serait intéressant d'évaluer l'activité contre la forme amastigote dans les milieux axéniques (*in vitro*) pour confirmer l'effet leishmanicide des extraits d'*Inula viscosa*.

3.5.2 In vivo

3.5.2.1 Résultats de l'évaluation de la toxicité

Bien que les plantes médicinales aient de nombreuses activités biologiques, on connaît très peu le potentiel toxique de ses substances bioactives [220].

L'évaluation de la toxicité des extraits par voie orale est indispensable avant d'étudier leurs propriétés pharmacologiques.

3.5.2.1.1 Toxicité aiguë

Nous avons constaté que l'administration orale des extraits EMeOH/F, D/F, EMeOH/FI_r et D/FI_r d'*Inula viscosa* L. n'a pas entraîné de mortalité chez les souris dans l'ensemble des lots traités. Les observations n'ont révélé aucun signe d'asthénie, de somnolence, d'anorexie, de diarrhée, de troubles du comportement ou de réduction de la mobilité durant la période expérimentale de 14 jours. La dose létale 50 (DL₅₀) est donc supposée être supérieure aux doses testées (Appendice J)

Dans leur étude sur la toxicité aiguë, Side larbi et *al.*, [467], ont rapporté que l'administration orale de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Inula viscosa* obtenu par macération n'a entraîné aucune mortalité ni de changement du comportement des rats traités avec des doses allant de 300 à 2500 mg/Kg de poids corporel. Ce qui concorde avec les résultats obtenus dans notre étude.

Hmamouchi [468], dans son ouvrage sur les Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc a classé *Inula viscosa* comme étant une plante médicinale non toxique.

3.5.2.1.2 Toxicité subaiguë des extraits méthanoliques

Étant donné qu'aucun effet toxique n'a été observé au cours de l'étude de la toxicité aiguë, une étude supplémentaire a été menée pour évaluer la toxicité subaiguë des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L. durant une expérimentation de 28 jours chez le rat.

Comme pour l'étude de la toxicité aiguë, nous n'avons constaté ni mortalité ni changement de comportement des rats traités en comparaison avec ceux du lot témoin.

a. Evolution du poids des rats

Comme le montre la figure 3.36, le poids corporel des rats qui ont reçu les extraits EMeOH/F et EMeOH/FI_r aux différentes doses par voie orale pendant 28 jours a continué à augmenter chaque semaine jusqu'au 28^{ème} jour du traitement.

Aucune différence significative n'a été observée en comparaison au poids corporel des rats témoins.

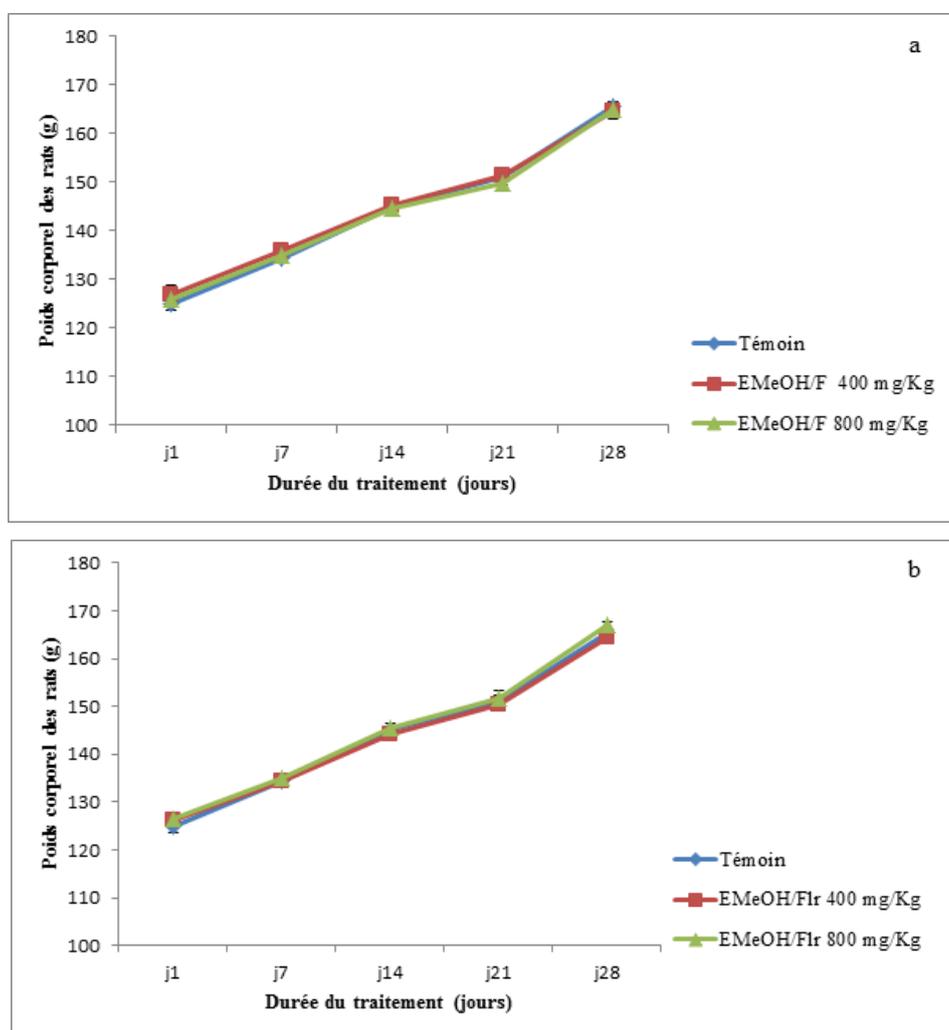


Figure 3.36. Évolution du poids corporel des rats en fonction du temps
(a) Rats traités avec l'EMeOH/ F, (b) Rats traités avec l'EMeOH/ Flr

Les modifications du poids corporel ont été utilisées comme indicateur des effets indésirables des médicaments, des produits chimiques et des substances bioactives [469], [470],

Étant donné qu'aucun changement significatif du poids corporel n'a été observé chez les rats des groupes traités par rapport au témoin après un traitement quotidien durant 28 jours, on suggère que l'administration orale et sub-chronique des extraits n'a pas d'effet sur la croissance normale des rats. Une perte d'appétit entraîne souvent une perte de poids due à des perturbations dans le métabolisme des glucides, des protéines et/ou des graisses [471] [472] [473] [474].

b. Poids des organes

Après 4 semaines de gavage, l'examen macroscopique des différents organes n'a montré aucun changement morphologique des organes des rats traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr d'*Inula viscosa* aux doses 400mg/kg et 800mg/kg en comparaison avec les organes des rats non traités que ce soit pour la couleur ou la texture. Aucune différence significative n'a été observée entre le poids des différents organes des rats traités et celui des organes des rats témoins (Tableau 3.17).

Tableau 3.17. Poids des organes des rats témoins et traités par les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L.

Poids des organes (g)					
Organes	Témoin	EMeOH/F		EMeOH/Flr	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
Foie	5,55 ± 0,07	5,24 ±0,37	5,26 ±0,17	5,5 ±0,14	5,5±0,06
Rein	0,47 ± 0,01	0,45 ±0,03	0,45 ±0,04	0,47 ±0,008	0,46±0,007
Cœur	0,53 ± 0,02	0,48 ±0,01	0,51±0,02	0,61 ±0,07	0,47±0,02
Poumon	1,19 ± 0,20	1,05 ±0,10	1,17±0,02	1,11 ±0,06	1,08 ±0,01
Rate	0,64 ± 0,09	0,53 ±0,05	0,64 ±0,03	0,58 ±0,03	0,49 ±0,08

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM ; n = 6 pour chaque groupe. p>0,05 par rapport au groupe témoin.

De même, aucun changement significatif n'a été observé dans le poids des organes : le cœur, le foie, la rate, les reins et les poumons, suggérant que l'administration des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L. n'a eu aucun effet sur leur croissance normale. Le poids relatif des organes est considéré comme étant un indicateur relativement sensible dans les études de toxicité [475].

c. Analyses biochimiques et hématologiques

L'analyse de la fonction du foie et du rein est importante dans l'évaluation de la toxicité des médicaments et des extraits végétaux car ils sont nécessaires à la survie d'un organisme [476]. Ainsi des analyses hématologiques et biochimiques ont

été effectuées pour évaluer les éventuelles altérations des fonctions hépatiques et rénales provoquées par l'ingestion des extraits [477] [478] [479] [480] [481].

Les extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr n'ont entraîné aucun changement significatif dans le taux de la glycémie, des triglycérides, du cholestérol, et de l'albumine dans les lots traités aux doses 400mg/Kg et 800mg/Kg en comparaison avec le lot témoin (Tableau 3.18).

Concernant le bilan hépatique (ASAT, ALAT, PA, GT), aucune différence significative n'a été observée à l'exception de l'enzyme ASAT qui a diminué significativement ($p < 0,01$) dans le groupe de rats qui a reçu l'extrait MeOH/F à la dose 800mg/Kg en comparaison avec le lot témoin.

Les hépatocytes ont pour rôle la neutralisation des toxines, qu'elles proviennent de l'intérieur ou de l'extérieur de l'organisme (détoxification), alors que le rein a pour rôle l'épuration du sang et l'élimination des déchets [482]. L'augmentation des niveaux d'ASAT et d'ALAT dans le sang est due à leur libération suite à l'endommagement des cellules hépatiques [477] [478] [479] [480] [481].

L'administration orale de l'EMeOH/F à la dose 800 mg/Kg a entraîné une diminution significative des niveaux de l'enzyme ASAT chez les rats traités (Tableau 3.18). Ces observations peuvent suggérer que L'EMeOH/F d'*Inula viscosa* aurait des effets hépatoprotecteurs surtout qu'aucun changement n'a été observé dans l'étude histo-pathologique. Selon Atsamo et *al.*, [314] ; Gome et *al.*, [483]; Luka et *al.*, [484]; Da Silva et *al.*, [485]; Adewale et *al.* [486], une diminution des enzymes hépatiques ASAT et/ou ALAT et/ou PA pourrait indiquer un effet hépatoprotecteur de la plante, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

Une augmentation significative a été observée pour l'urée ($p < 0,01$) des rats du groupe qui a reçu l'extrait EMeOH/Flr à la dose 800mg/Kg. Cependant aucun changement significatif n'a été observé pour le taux de protéines sériques, de la créatinine et de l'acide urique dans tous les groupes traités par les deux extraits aux différentes doses en comparaison avec le lot témoin (Tableau 3.18).

Un dysfonctionnement rénal peut être évalué par des mesures simultanées de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique [470] [487] [488] [489]. Dans la présente

étude, les changements dans les niveaux plasmatiques de l'urée des rats traités par l'EMeOH/Fir à la dose 800mg/Kg ne peuvent à eux seuls indiquer une altération de la fonction rénale étant donné qu'aucune différence significative n'a été retrouvée entre les taux de créatinine et d'acide urique des rats traités et ceux des rats témoins. D'autant plus que l'étude histologique n'a montré aucune altération de la structure rénale.

Tableau 3.18. Paramètres biochimiques des rats témoins et des rats traités par les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L.

Paramètres biochimiques					
Paramètres	Témoin	EMeOH/F		EMeOH/Fir	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
Gly (g/L)	1,08±0,06	1,14±0,02	1,19±0,10	1,12±0,06	1,14±0,05
ASAT (UI/L)	131,17±3,14	127,83±2,53	116,17±1,27**	137,5±2,23	138,5±1,51
ALAT (UI/L)	52,83±2,53	53,67±1,94	52,5±2,73	53,83±2,31	54,17±2,13
PA (UI/L)	119±4,08	120,5±1,98	114,83±4,15	118,67±2,72	109,83±1,22
GT (UI/L)	1,83±0,48	1,5±0,34	2,83±0,48	2,33±0,42	3,00±0,37
Bil T (mg/L)	1,67±0,33	1,68±0,22	2±0,26	1,83±0,40	2,16±0,17
TG (g/L)	0,60±0,05	0,57±0,05	0,56±0,04	0,51±0,03	0,55±0,04
Chol (g/L)	0,57±0,06	0,45±0,01	0,49±0,03	0,46±0,02	0,47±0,03
Urée (g/L)	0,36±0,02	0,37±0,01	0,33±0,02	0,36±0,03	0,50±0,05**
Créat (mg/L)	5,83±0,31	4,83±0,31	4,83±0,31	5±0,26	6,33±0,42
AU (mg/L)	20,83±0,75	21,5±2,09	22,33±1,20	21,33±1,40	22,67±0,49
Pro (g/L)	74,33±1,67	72,67±1,02	73,83±1,49	72,5±1,48	74±1,46
Albu (g/L)	32,83±1,08	33,33±1,05	32,67±2,29	32,67±1,66	32,33±2,29

Les valeurs représentent : la moyenne ± SEM ; n = 6 pour chaque groupe.

** p<0,01 par rapport au groupe témoin.

D'après Gregg et Voigt [490]; Mukinda et al., [491], l'analyse des paramètres sanguins est pertinente car elle donne des informations sur la fonction hématopoïétique, sur l'apparition d'allergies et sur les effets intravasculaires comme l'hémolyse. Le bilan hématologique n'a montré aucune différence significative entre les rats traités et les rats témoins.

L'administration orale des extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr quotidiennement pendant 28 jours n'a pas entraîné de changement significatif dans le bilan hématologique (GB, HGB, GR, HCT, PLT, MCV, MCH, MCHC et LYM) dans les groupes de rats traités aux différentes doses par rapport aux rats témoins (Tableau 3.19).

Tableau 3.19. Paramètres hématologiques des rats témoins et des rats traités par les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa*

Paramètres hématologiques					
Paramètres	Témoin	EMeOH/F		EMeOH/Flr	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
GB $\times 10^3/\mu\text{L}$	7,91 \pm 0,55	7,7 \pm 0,23	9,05 \pm 0,39	7,78 \pm 0,48	8,14 \pm 0,34
HGB (g/dL)	13,58 \pm 0,38	13,35 \pm 0,35	13,13 \pm 0,48	13,2 \pm 0,41	13,73 \pm 0,40
GR $\times 10^6/\mu\text{L}$	7,52 \pm 0,29	7,45 \pm 0,2	7,98 \pm 0,26	7,28 \pm 0,19	8,22 \pm 0,30
HCT %	47,95 \pm 2,68	53,53 \pm 3,64	50,95 \pm 1,02	48,93 \pm 2,93	51,71 \pm 1,39
PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$	713,33 \pm 70,18	727,66 \pm 39,68	700,33 \pm 37,28	716 \pm 24,41	681,66 \pm 36,62
MCV (fL)	58,68 \pm 1,77	58,7 \pm 1,39	60,26 \pm 0,86	58,71 \pm 0,91	59,41 \pm 0,90
MCH (pg)	16,63 \pm 0,41	16,63 \pm 0,47	16,78 \pm 0,22	16,76 \pm 0,20	16,63 \pm 0,24
MCHC (g/dL)	28,28 \pm 0,59	28,25 \pm 0,47	29 \pm 0,15	28,03 \pm 0,33	28,21 \pm 0,54
LYM %	81,38 \pm 4,83	81,71 \pm 4,08	85,68 \pm 3,11	78,83 \pm 3,5	82,33 \pm 3,19

Les valeurs représentent : la moyenne \pm SEM ; n = 6 pour chaque groupe ; p>0,05 par rapport au groupe témoin.

d. Examen histopathologique des organes

La comparaison des organes : foie et rein des rats traités aux doses 800 mg/Kg avec ceux du témoin sain montre une architecture hépatique et rénale conservée, sans signe de cytolysse inhérente à une éventuelle toxicité des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs, il n'a pas été constaté de lésion organique ni de fibrose au niveau rénal ou hépatique. Des signes de congestions probablement dus au sacrifice ont été observés à la fois dans les lots traités et le lot témoin (Figures 2 et 3.).

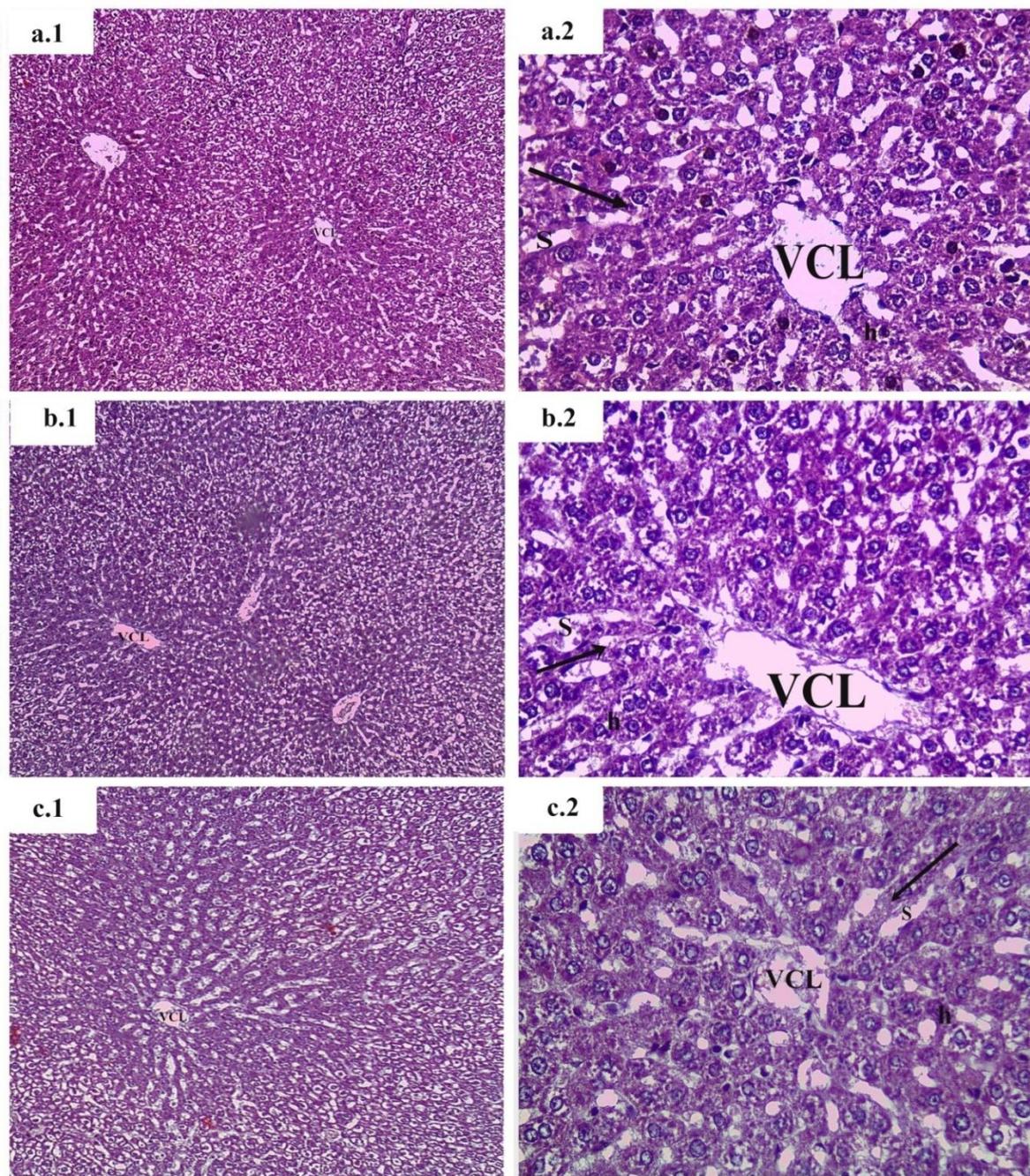


Figure 3.37. Histologie du foie des rats témoins (a.1 : GX10 ; a.2 : GX40), des rats traités par l'EMeOH/ F à la dose 800mg/Kg (b.1 : GX10 ; b.2 : GX40), des rats traités par l'EMeOH/ Flr à la dose 800mg/Kg (c.1 : GX10 ; c.2 : GX40).

VCL : Veine Centrolobulaire ; Lames d'hépatocytes en disposition radiaire autour de la veine centrolobulaire (flèche) ; h : hépatocyte ; S : Sinusoïde (a.2 ; b.2 ; c.2) ; Coloration H&E.

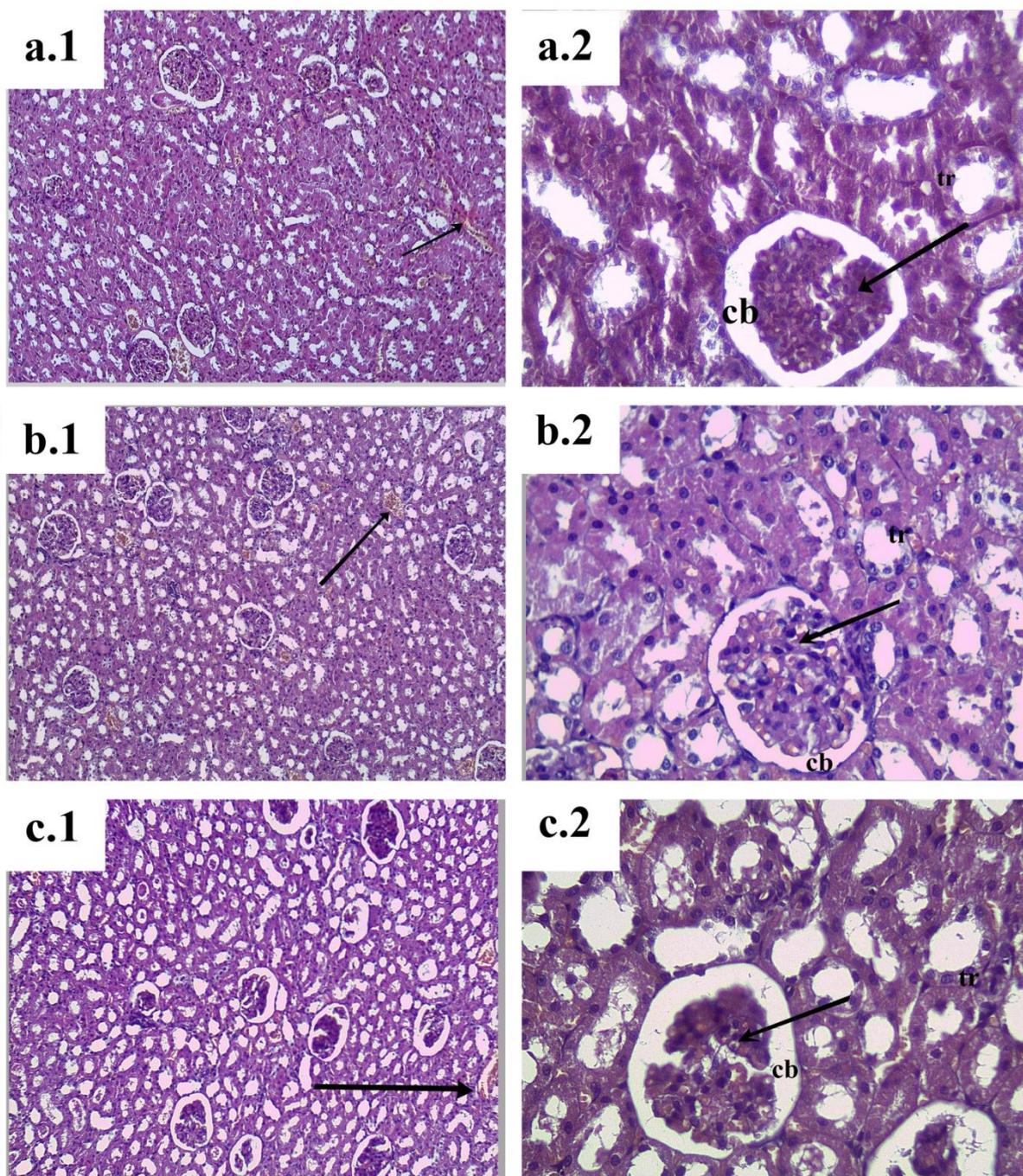


Figure 3.38. Histologie du rein des rats témoins (a.1 : GX10 ; a.2 : GX40), des rats traités par l'EMeOH/ F à la dose 800mg/Kg (b.1 : GX10 ; b.2 : GX40), des rats traités par l'EMeOH/ Fir à la dose 800mg/Kg (c.1 : GX10; c.2 : GX40).

Congestion (flèche : a.1 ; b.1 ; c.1) ; Parenchyme rénal : glomérule (flèche : a.2 ; b.2 ; c.2) ; tr : tube rénal (a.2 ; b.2 ; c.2) ; cb : chambre ou espace de bowman; Coloration H&E

3.5.2.2 Résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

De nombreux auteurs ont rapporté l'utilisation d'*Inula viscosa* comme anti-inflammatoire en médecine traditionnelle. Selon Baba Aissa [41], les feuilles de cette plante sont appliquées sous forme de cataplasme pour réduire l'inflammation et les œdèmes.

A partir de ces données ainsi que celles recueillies dans l'enquête ethnobotanique, nous avons choisi deux méthodes expérimentales se basant sur l'induction d'une inflammation aiguë sur un modèle animal pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa*.

3.5.2.2.1 Induction de l'œdème avec de la carragénine

L'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* évaluée par la méthode de l'induction de l'œdème avec de la carragénine est représentée dans les tableaux 3.20 ; 3.21 et les figures 3.39 et 3.40.

L'induction de l'œdème de la patte avec de la carragénine est une méthode très utilisée comme modèle de l'inflammation aiguë dans la recherche de nouvelles molécules anti-inflammatoire [492]. La formation d'œdème se déroule en deux phases, la libération d'histamine de et de sérotonine survient dans la première phase et la seconde phase est associée à la production de bradykinine, de protéase et de prostaglandines [493] [494] [495] [496] [497].

Suite à l'injection de la solution de carragénine (Tableaux 3.20 et 3.21), nous avons remarqué que l'œdème des pattes gauches des souris du lot témoin a continué d'augmenter jusqu'à la quatrième heure. Cependant l'œdème des souris traitées par le produit de référence (Diclofénac) a commencé à se résorber dès la première heure ($p < 0,05$).

- Effet anti-inflammatoire des extraits de feuilles

L'œdème des souris traitées avec l'extrait méthanolique des feuilles aux doses de 600 et 800 mg/kg a commencé à diminuer à partir de la première heure ($p < 0,001$) alors qu'à la dose de 400 mg/Kg la réduction de l'œdème n'a débuté qu'à partir de la deuxième heure ($p < 0,01$) en comparaison avec le lot témoin négatif. Les résultats obtenus montrent que 4h après l'injection de l'agent œdémotogène, l'administration orale de L'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg a entraîné une diminution significative de l'œdème des pattes des souris traitées avec un pourcentage d'inhibition de 49,06 ; 73,58 et 90,57% respectivement (Figure 3.39).

Concernant l'activité du décocté des feuilles nous avons remarqué une diminution plus tardive de l'œdème à partir de la deuxième heure ($p < 0,05$; $0,001$). A la quatrième heure, le D/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg a entraîné une réduction de l'œdème des pattes avec des pourcentages d'inhibition de 32,08 ; 43,40 et 69,81% respectivement (Figure 3.39).

Tableau 3.20. Evolution du changement de l'épaisseur des pattes des souris traitées par les extraits de feuilles

Lots	Changement de l'épaisseur des pattes des souris (mm)				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h (% d'inhibition)
Témoin	0,34±0,04	0,36±0,03	0,4±0,03	0,44±0,04	0,53±0,05
Diclofénac (50mg/Kg)	0,31±0,04	0,27±0,02*	0,22±0,03***	0,16±0,03***	0,11±0,03*** (79,25)
EMeOH/F (400 mg/kg)	0,29±0,009	0,31±0,01	0,3±0,01**	0,25±0,009***	0,27±0,01*** (49,06)
EMeOH/F (600 mg/kg)	0,27±0,01	0,23±0,008***	0,18±0,008***	0,17±0,09***	0,14±0,009*** (73,58)
EMeOH/F (800 mg/kg)	0,28±0,02	0,2±0,02***	0,12±0,009***	0,09±0,006***	0,05±0,02*** (90,57)
D/F (400 mg/kg)	0,3±0,01	0,35±0,01	0,32±0,02*	0,32±0,01**	0,36±0,01*** (32,08)
D/F (600 mg/kg)	0,32±0,04	0,34±0,005	0,31±0,02*	0,28±0,02***	0,3±0,02*** (43,40)
D/F (800 mg/kg)	0,32±0,04	0,28±0,03*	0,21±0,02***	0,19±0,02***	0,16±0,01*** (69,81)

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

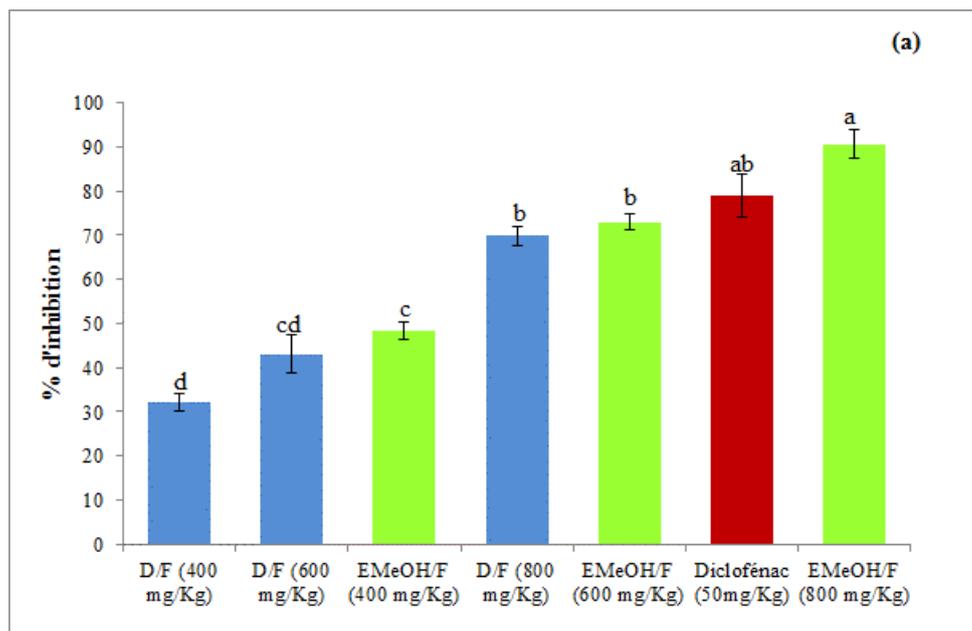


Figure 3.39. Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris traitées par les extraits des feuilles

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

- Effet anti-inflammatoire des extraits de fleurs

L'extrait méthanolique des fleurs a entraîné une diminution de l'œdème des pattes à partir de la première heure aux dose de 600 et 800 mg/kg ($p < 0,05$; $p < 0,01$) et à partir de la troisième heure à la dose de 400 mg/Kg ($p < 0,01$) en comparaison avec le lot témoin négatif (Tableau 3.21). D'après la figure 3.40, à la quatrième heure l'EMeOH/flr a provoqué une diminution significative de l'œdème des pattes des souris traitées avec les doses de 400, 600 et 800mg/Kg avec des pourcentages d'inhibition de 41,51 ; 60,38 et 77,36% respectivement en comparaison avec le témoin négatif qui a reçu de l'eau physiologique.

Pour le décocté des fleurs seule la dose 800 mg/Kg a donné de résultats à partir de la deuxième heure ($p < 0,05$). Au bout de quatre heure le D/flr aux doses 400, 600 et 800mg/Kg a induit une diminution de l'œdème des pattes des de 28,30 ; 35,85 et 58,49 (Tableau 3.21 ; Figure 3.40).

Nous avons constaté (Figure 3.39 et 3.40) que les pourcentages d'inhibition de l'œdème des souris traitées avec l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr à la dose de 800 mg/Kg sont similaires à celui du produit de référence Diclofénac (79,25%).

Tableau 3.21. Evolution du changement de l'épaisseur des pattes des souris traitées par les extraits de fleurs

Lots	Changement de l'épaisseur des pattes des souris (mm)				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h (% d'inhibition)
Témoin	0,34±0,04	0,36±0,03	0,4±0,03	0,44±0,04	0,53±0,05
Diclofénac (50mg/Kg)	0,31±0,004	0,27±0,02*	0,22±0,03***	0,16±0,03***	0,11±0,03*** (79,25)
EMeOH/Flr (400 mg/kg)	0,27±0,02	0,34±0,03	0,37±0,05	0,29±0,02**	0,31±0,02*** (41,51)
EMeOH/Flr (600 mg/kg)	0,33±0,05	0,27±0,02*	0,25±0,03**	0,24±0,03***	0,21±0,02*** (60,38)
EMeOH/Flr (800 mg/kg)	0,29±0,005	0,24±0,03**	0,19±0,02***	0,16±0,02***	0,12±0,009*** (77,36)
D/Flr (400 mg/kg)	0,30±0,01	0,36±0,02	0,4±0,05	0,39±0,04	0,38±0,02** (28,30)
D/Flr (600 mg/kg)	0,32±0,04	0,36±0,02	0,35±0,04	0,32±0,01*	0,34±0,03*** (35,85)
D/Flr (800 mg/kg)	0,28±0,01	0,33±0,04	0,28±0,01*	0,25±0,04***	0,22±0,03*** (58,49)

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à *p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001 en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

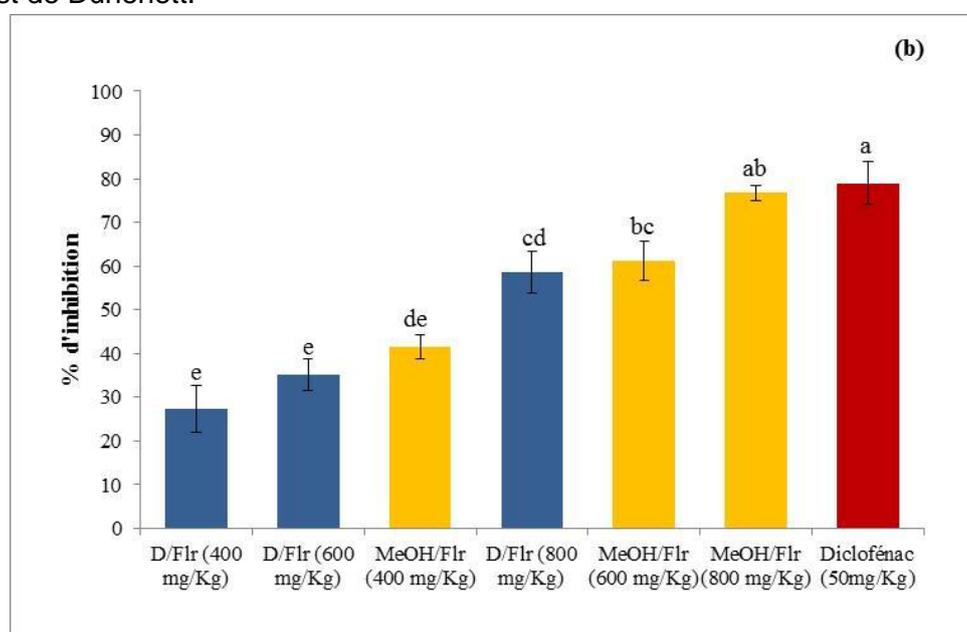


Figure 3.40. Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris traitées par les extraits des fleurs

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative (p<0,05) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Le développement d'une réponse inflammatoire est un processus complexe mais bien régulé [498]. L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé libéré de la membrane phospholipidique de la cellule via l'hydrolyse par les enzymes phospholipase A2 [499]. L'acide arachidonique est par la suite métabolisé par deux voies enzymatiques distinctes : la cyclooxygénase en prostaglandine PGS et la lipoxygénase en leucotrinènes. Les prostaglandines sont les principaux médiateurs de l'inflammation impliqués dans la plupart des pathologies inflammatoires [500]. Par conséquent, le test de l'induction de l'œdème de la patte avec de la carragénine est efficacement contrôlé par les inhibiteurs de la cyclooxygénase (COX) en raison de son mécanisme COX-dépendant [501], ainsi, d'après les résultats observés, les extraits d'*Inula viscosa* L. pourraient avoir des propriétés inhibitrice de la COX et par conséquent l'inhibition de la synthèse des prostaglandines.

De nombreuses études ont mis en évidence l'intérêt des acides phénoliques composés bio-actifs comme source de nouveaux anti-inflammatoires [502].

Selon Yonathan et *al.*, [503], l'acide chlorogénique isolé à partir de *Cheilanthes farinosa* possède une plus forte activité anti-inflammatoire dans la réduction de l'œdème plantaire induit avec de la carragénine que l'acide acétylsalicylique. En effet Dos Santos et *al.*, [504], ont également rapporté que l'acide chlorogénique entraîne une diminution de l'œdème plantaire des rats induit par la carragénine. D'après Hwang et *al.*, [505], L'acide chlorogénique inhibe la production de NO (oxyde nitrique) et l'expression de la cyclooxygénase (COX-2) et d'iNOS (Oxyde nitrique synthase) dans les macrophages stimulés par les lipopolysaccharides (LPS) et diminue également les cytokines pro-inflammatoires.

Abdel Motaal et *al.*, [506], ont rapporté que le prétraitement des rats avec les acides 3,4-DCQ ; 3,5 DCQ et 4,5-DCQ isolés à partir *Solidago virgaurea* entraîne une diminution significative de l'œdème des pattes des rats induit avec de la carragénine en comparaison avec le groupe témoin négatif ainsi qu'une diminution de certaines cytokines (IL1 et TNF- α). D'après Ferreria et *al.*, [507], certains dérivés de l'acide caféoylquinique (3,5- et 4,5-DCQ) inhibent la libération d'histamine dans des modèles d'inflammation réalisés *in vitro*.

Certaines études ont également démontré l'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes. Selon Rotelli et *al.*, [508] et Wang et *al.*, [509], la quercétine et la myricétine (isolée à partir des feuilles de *Myrica rubra*) possèdent un important pouvoir de réduction de l'œdème de la patte induite par le carragénine. Morikawa et *al.*, [510] ; De Pascual- Teresa et *al.*, [511], ont rapporté que la quercétine entraîne une diminution des PGE2, cyclo-oxygénase 2 et certaines cytokines (TNF- α). Parveen et *al.*, [512], ont aussi indiqué que le kaempférol isolé à partir de *Thesium chinense* a une forte activité anti-inflammatoire (test à la Carragénine). Selon Yang et *al.*, [513], L'isorhamnétine isolée à partir de *Oenanthe javanica* a inhibé nettement l'œdème des pattes arrière des rats (carragénine méthode), De plus, l'isorhamnétine réduirait l'infiltration cellulaire inflammatoire. L'isorhamnétine a inhibé l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la libération de NO dans les cellules stimulées par le LPS.

L'effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* pourrait être dû à la présence de ces acides phénoliques et flavonoïdes.

3.5.2.2.2 Induction de l'œdème de l'oreille avec du xylène

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* sont représentés dans les tableaux 3.22 ; 3.23 et figures 3.41 et 3.42.

L'induction de l'œdème auriculaire par le xylène est utilisée depuis longtemps comme modèle de l'inflammation aiguë pour la recherche des effets anti-inflammatoires de nombreuses molécules [324]. Cette méthode provoque l'accumulation des liquides et un œdème caractéristique d'une réponse inflammatoire aiguë (augmentation de la vasodilatation). Ce test provoque la libération des médiateurs pro-inflammatoires à partir des neurones sensoriels qui agissent sur les cellules périphériques cibles produisant une inflammation neurogène caractérisée par : de la chaleur, de la rougeur et un œdème [514] [515] [516] [517].

- Effet anti-inflammatoire des extraits de feuilles

D'après le tableau 3.22, nous remarquons que le prétraitement des souris par l'extrait méthanolique des feuilles aux doses 400, 600 et 800mg/Kg a entraîné une réduction significative de l'œdème des oreilles des souris causé par l'application du xylène avec un pourcentage d'inhibition de 60,54, 73, 41 et 80,86% respectivement en comparaison avec le lot témoin qui a reçu de l'eau physiologique ($p < 0,001$). L'administration orale du décocté des feuilles a également provoqué une diminution significative de l'œdème des souris ($p < 0,001$) avec un maximum d'inhibition de 66,42% obtenu avec la dose de 800 mg/Kg (Figure 3.41). L'effet anti-inflammatoire obtenu avec de l'EMeOH/F (600 et 800 mg/Kg) et D/F (800 mg/Kg) était comparable à celui du diclofénac (75%) $p > 0,05$.

Tableau 3.22. Différence du poids des oreilles des souris traitées par les extraits de feuilles

Lots	Différence du poids des oreilles (mg)	% d'inhibition
Témoin	10,72±0,92	-
Diclofénac (50mg/Kg)	2,68±0,30 ^{***}	75
EMeOH/F (400 mg/kg)	4,23±0,41 ^{***}	60,54
EMeOH/F (600 mg/kg)	2,85±0,25 ^{***}	73,41
EMeOH/F (800 mg/kg)	2,05±0,17 ^{***}	80,88
D/F (400 mg/kg)	6,27±0,27 ^{***}	41,51
D/F (600 mg/kg)	4,87±0,35 ^{***}	54,57
D/F (800 mg/kg)	3,6±0,32 ^{***}	66,42

Les valeurs sont exprimés en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; signifient à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

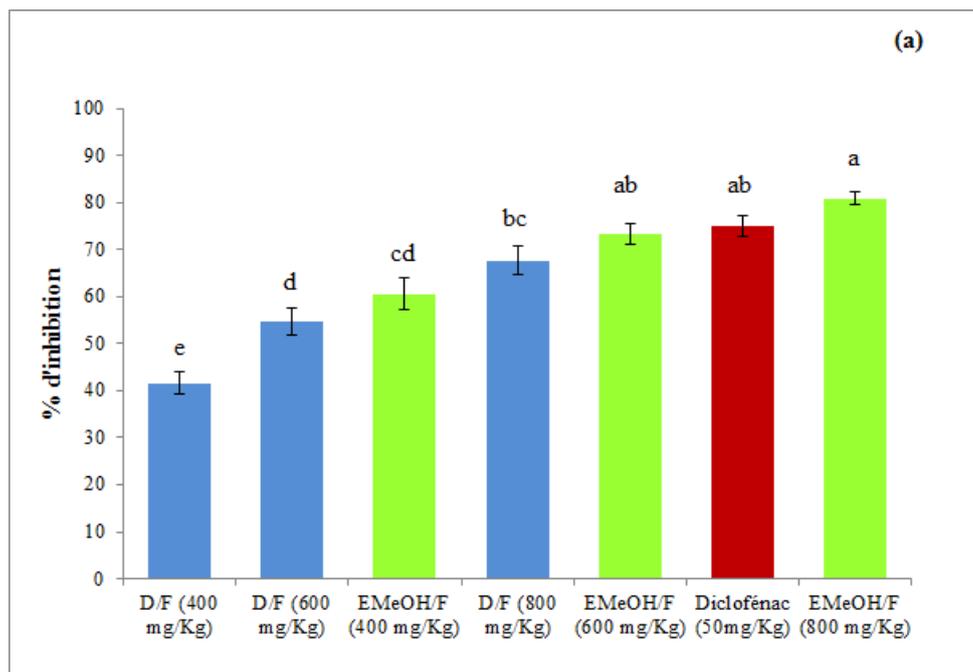


Figure 3.41. Pourcentage d'inhibition de l'œdème des oreilles des souris traitées par les extraits des feuilles

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

- Effet anti-inflammatoire des extraits de fleurs

Concernant l'extrait méthanolique et décocté des fleurs d'*Inula viscosa* (Tableau 3.23), ils ont tous les deux montré une diminution significative de l'œdème des oreilles des souris en comparaison avec le groupe témoin. L'extrait méthanolique des fleurs a montré un pourcentage d'inhibition de 54,76, 67,54 % et de 70,62% aux doses de 400 et 600 et 800 mg/Kg respectivement (Figure 3.42). L'effet obtenu avec l'EMeOH/Fir (600 et 800 mg/Kg) et le D/Fir (800 mg/Kg) était comparable à celui du Diclofénac (75%).

Tableau 3.23. Différence du poids des oreilles des souris traitées par les extraits de fleurs

Lots	Différence du poids des oreilles (mg)	% d'inhibition
Témoin	10,72±0,92	-
Diclofénac (50mg/Kg)	2,68±0,30 ^{***}	75
EMeOH/Flr (400 mg/kg)	4,85±0,25 ^{***}	54,76
EMeOH/Flr (600 mg/kg)	3,48±0,32 ^{***}	67,54
EMeOH/Flr (800 mg/kg)	3,15±0,17 ^{***}	70,62
D/Flr (400 mg/kg)	6,58±0,54 ^{***}	38,62
D/Flr (600 mg/kg)	5,45±0,19 ^{***}	49,16
D/Flr (800 mg/kg)	3,9±0,26 ^{***}	63,62

Les valeurs sont exprimés en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à * p < 0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

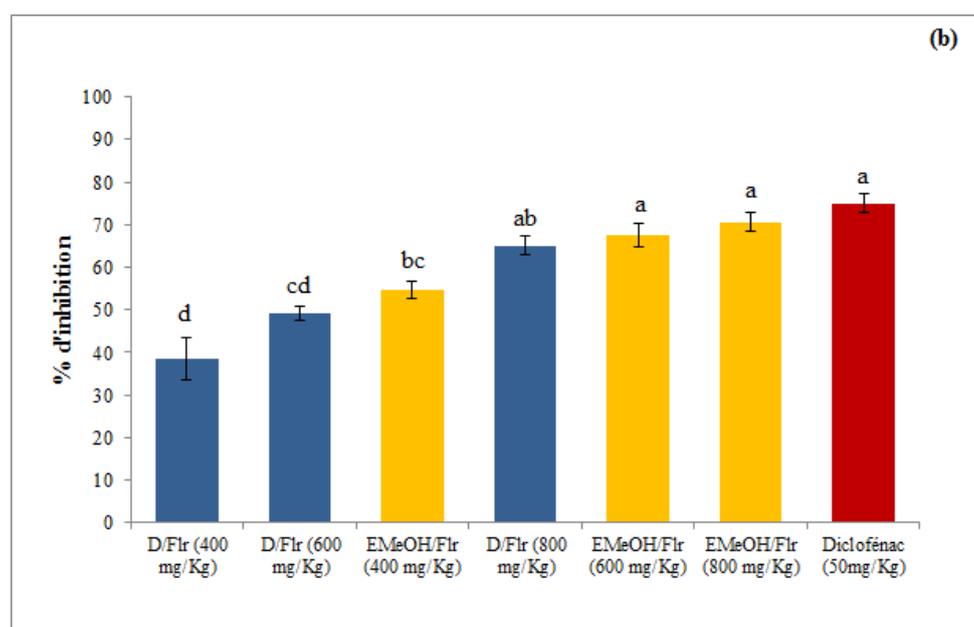


Figure 3.42. Pourcentage d'inhibition de l'œdème des oreilles des souris traitées par les extraits des fleurs

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Des études réalisées par Manez et al., [110] [518] ; Hernandez et al., [39], [100] [519], ont montré que les sesquiterpènes (acide illicic, acide hydroxycostique,

Inuviscolide) et les composés phénoliques tels que les flavonoïdes (sakurantine, le 7-O-Methylaromadendrin), présents dans *Inula viscosa* ont inhibé le gonflement induit par le TPA (12-O-tétracyanoylphorbol-13-acétate) dans les modèles d'inflammation cutanée.

Différentes recherches scientifiques ont prouvé que les constituants chimiques tels que les composés phénoliques possèdent une activité anti-inflammatoire [520] [521].

D'après Parveen et *al.*, [512] ; et Wang et *al.*, [509], certains flavonoïdes tels que le kaempférol et la myricétine, possèdent un important pouvoir de réduction de l'œdème auriculaire induit par le xylène. Ces composés ont été identifiés dans les extraits méthanoliques des feuilles et/ou des fleurs d'*Inula viscosa*, ce qui pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire obtenu dans cette étude confirmant ainsi son utilisation traditionnelle.

3.5.2.3 Résultats de l'évaluation de l'activité antalgique

L'activité antalgique des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* est représentée dans les tableaux 3.24 ; 3.25 et les figures 3.43 et 3.44

Le test de l'induction de spasmes avec de l'acide acétique a été utilisé pour évaluer l'action analgésique périphérique des extraits d'*Inula viscosa* L. Cette méthode a été expérimentée par différents groupes de recherche pour déterminer l'effet antalgique de composés naturels [325] [522] [523]. Les manifestations des crampes abdominales chez la souris se traduisent par une cambrure du dos, une extension des membres postérieurs et une contraction de la musculature abdominale [524].

- Effet antalgique des feuilles

L'administration orale de l'EMeOH/F et du D/F a montré une inhibition significative du nombre de crampes ($p < 0,001$) induites par l'injection de l'acide acétique en comparaison avec le groupe du témoin négatif (Tableau 3.24).

Le prétraitement des souris par l'EMeOH/F aux doses de 400, 600 et 800 mg/Kg a réduit le nombre de spasmes avec un pourcentage de réduction de: 85,67% ; 89,80% et 93,39% respectivement. Le D/F aux mêmes doses a également diminué les crampes abdominales de 70,79% ; 78,51% et 85,4% respectivement (Tableau 3.24 et Figure 3.43). Nous avons remarqué que l'EMeOH/F aux trois doses testées et le D/F à la dose de 800 mg/Kg ont un effet analgésique similaire au produit de référence (88,15%) ($p > 0,05$).

Tableau 3.24. Nombre de crampes des souris traitées par les extraits des feuilles

Lots	Nombre de crampes	% de réduction
Témoin	60,5±3,05	
Diclofénac (50mg/Kg)	7,17±1,28 ^{***}	88,15
EMeOH/F (400 mg/kg)	8,67±1,17 ^{***}	85,67
EMeOH/F (600 mg/kg)	6,17±1,14 ^{***}	89,80
EMeOH/F (800 mg/kg)	4±0,78 ^{***}	93,39
D/F (400 mg/kg)	17,67±1,54 ^{***}	70,79
D/F (600 mg/kg)	13±1,03 ^{***}	78,51
D/F (800 mg/kg)	8,83±0,96 ^{***}	85,4

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

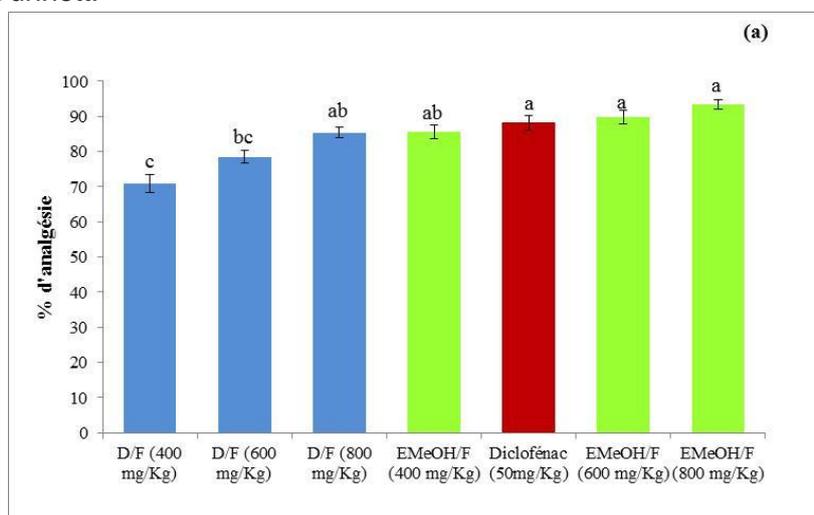


Figure 3.43. Pourcentage de réduction des crampes des souris traitées par les extraits des feuilles

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey

- Effet antalgique des fleurs

Les EMeOH/Flr et DFlr ont montré une diminution significative des spasmes des souris traitées par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$) (Tableau 3.25). L'effet observé avec l'EMeOH/Flr aux doses de 400, 600 et 800 mg / kg est de 81,54%, 86,78% et 89, 53% respectivement. Quant au D/Flr, il a présenté des pourcentages d'inhibition de 64,19%, 69,97% et 79, 34% aux mêmes doses (Tableau 3.25 et Figure 3.44).

D'après la figure 3.44, nous avons également constaté que l'EMeOH/Flr aux trois doses testées et le D/Flr à la dose de 800 mg/Kg ont un effet analgésique semblable à celui du Diclofénac (88,15%) ($p > 0,05$).

Tableau 3.25. Nombre de crampes des souris traitées par les extraits des fleurs

Lots	Nombre de crampes	% de réduction
Témoin	60,5±3,05	
Diclofénac (50mg/Kg)	7,17±1,28 ^{***}	88,15
EMeOH/Flr (400 mg/kg)	11,17±1,3 ^{***}	81,54
EMeOH/Flr (600 mg/kg)	8±0,84 ^{***}	86,78
EMeOH/Flr (800 mg/kg)	6,33±1,12 ^{***}	89,53
D/Flr (400 mg/kg)	21,67±1,59 ^{***}	64,19
D/Flr (600 mg/kg)	18,17±1,28 ^{***}	69,97
D/Flr (800 mg/kg)	12,5±1,07 ^{***}	79,34

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; signifient à $p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$ en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

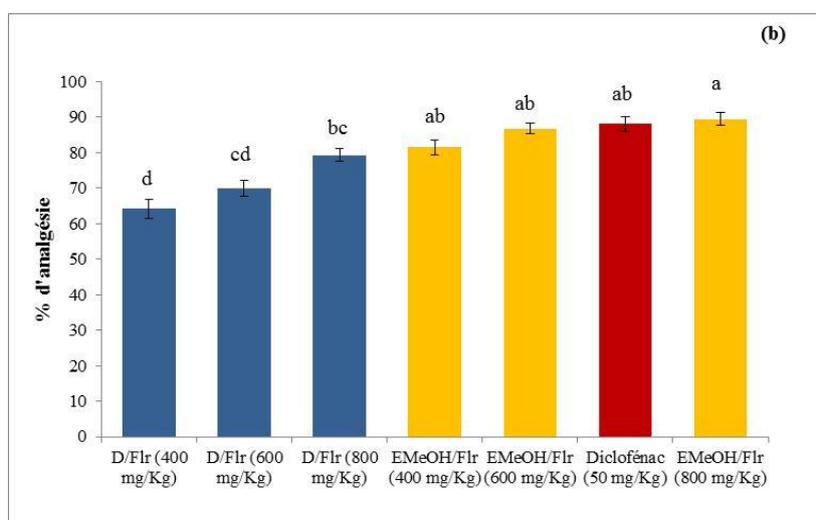


Figure 3.44. Pourcentage de réduction des crampes des souris traitées par les extraits des fleurs

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Ce test provoque une algie par la libération de diverses substances endogènes qui excitent les nocicepteurs périphériques [525]. Certains médiateurs (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandines) et cytokines produites dans le liquide péritonéal provoquent une élévation de la perméabilité vasculaire et induisent la stimulation des terminaisons nerveuses des fibres nociceptives [523] [526] [527].

Dans leurs études, certains auteurs ont démontré l'effet antalgique des acides phénoliques. Selon Gorzalczany et *al.*, [528], l'acide chlorogénique (isolée à partir de *Urtica circularis*) réduit de façon importante le nombre de crampes induites par l'injection de l'acide acétique. Dos Santos et *al.*, [529], ont également rapporté l'effet analgésique des acides 3,5- et 4,5-DQC (isolée à partir de *Lychnophora ericoides*) évalué avec le test de Koster. Cet effet pourrait être lié à l'inhibition de l'histamine. Selon Ferreira et *al.*, [507] et Guzzo et *al.*, [530], les acides caféoylquiniques réduiraient la libération d'histamine dans des tests *in vitro*.

Selon la littérature, les flavonoïdes possèdent également un effet analgésique. Tong et *al.*, [531], ont démontré que la myricétine (isolée à partir des de *Myrica rubraa*) présente une activité antalgique périphérique (test à l'acide acétique) qui pourrait être due à son action inhibitrice de la COX1 et PGE2. Filho et ses collaborateurs [532], ont relié l'activité antalgique de la quercétine à l'inhibition de certains médiateurs tels que la sérotonine.

L'effet antalgique des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* constaté dans notre étude pourrait s'expliquer par la présence de ces molécules bio-actives.

Une récente étude réalisée en 2016 par Side larbi et ses collaborateurs, [467], a démontré l'action analgésique centrale de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Inula viscosa* obtenu par macération dans du méthanol (80%) évaluée par le test d'immersion des queues des rats dans de l'eau chaude (55°C).

3.5.2.4 Résultats de l'évaluation de l'activité antipyrétique

Les résultats de l'activité antipyrétique des extraits d'*Inula viscosa* sont illustrés dans les figures 3.45 ; 3.46 et les tableaux 3.26 et 3.27

L'injection sous-cutanée de levure de bière est considérée comme une méthode pratique pour étudier le potentiel antipyrétique des plantes car elle provoque une élévation de la température en induisant l'augmentation de la synthèse des prostaglandines [533].

L'injection sous-cutanée de la suspension de levure de bière a entraîné une élévation de la température rectale des rats au bout 18 h. Les rats du groupe témoin ont présenté une augmentation significative de la température rectale tout au long de la période expérimentale. Les rats traités avec l'ibuprofène (100 mg / kg) ont montré une diminution significative de la température rectale au cours de la période expérimentale dès la première heure.

- Effet antipyrétique des feuilles

L'administration de l'EMeOH/F a induit une réduction significative de la fièvre aux doses 600 et 800 mg /Kg de la 1^{ère} heure ($p < 0,01$, $p < 0,001$) jusqu'à la 4^{ème} heure. Alors que pour l'EMeOH/F à la dose de 400 mg/Kg, la température rectale des rats n'a commencé à diminuer qu'à partir de la deuxième heure ($p < 0,01$). La diminution maximale de la fièvre a été observée avec l'EMeOH/F à la dose de 800 mg /Kg (89,51%) au bout de 4 heures. Le D/F a présenté une activité antipyrétique significative à la dose de 800 mg / Kg pendant toute la durée de l'expérimentation (1-4 heures) avec un pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie de 77,62% (Tableau 3.26 et Figure 3.45).

Les résultats obtenus suite à l'administration orale de l'EMeOH/F aux doses de 600 et 800 mg/Kg, le D/F à la dose de 800 mg/Kg étaient comparables à ceux de l'ibuprofène (91,61%) $p > 0,05$ (Figure 3.45).

Tableau 3.26. Activité antipyrétique des extraits de feuilles

Extraits	Température (°C)					
	T initiale	0 h#	1 h	2 h	3 h	4 h (% de réduction)
Témoin	37,17±0,18	38,35±0,27	38,48±0,25	38,43±0,24	38,57±0,23	38,6±0,18
Ibuprofène (100mg/Kg)	37,15±0,13	38,18±0,15	37,67±0,14 **	37,25±0,16 ***	37,17±0,17 ***	37,27±0,17 *** (91,61)
EMeOH/F (400 mg/Kg)	37,12±0,13	38,42±0,19	38,07±0,16	37,65±0,11 **	37,42±0,12 ***	37,57±0,17 *** (68,53)
EMeOH/F (600 mg/Kg)	37,12±0,15	38,32±0,17	37,65±0,13 **	37,48±0,16 ***	37,42±0,18 ***	37,4±0,14 *** (80,42)
EMeOH/F (800 mg/Kg)	37,1±0,16	38,38±0,16	37,58±0,16 **	37,4±0,18 ***	37,32±0,19 ***	37,25±0,18 *** (89,51)
D/F (400 mg/Kg)	37,3±0,16	38,48±0,13	38,45±0,14	38,12±0,14	37,98±0,17 *	37,93±0,13 * (55,94)
D/F (600 mg/Kg)	37,12±0,14	38,25±0,16	38,08±0,12	37,77±0,17 *	37,62±0,14 **	37,65±0,15 ** (62,94)
D/F (800 mg/Kg)	37,2±0,16	38,3±0,17	37,68±0,13 **	37,58±0,12 **	37,55±0,12 ***	37,52±0,14 *** (77,62)

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à * p < 0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

0h : correspond à la température rectale des rats 18 h après injection de la levure de bière et au moment de l'administration des différents produits

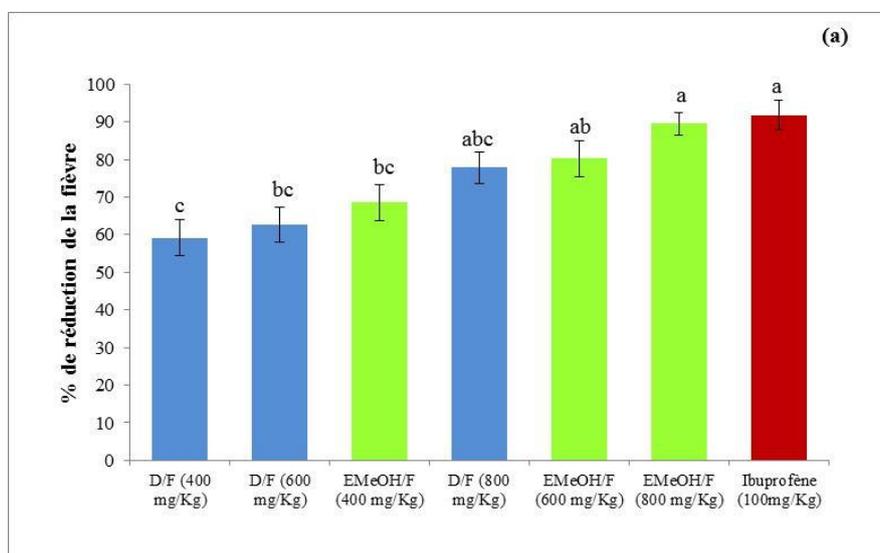


Figure 3.45. Pourcentage de réduction la fièvre des rats traités par les extraits des feuilles

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative (p<0,05) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

- Effet antipyrétique des fleurs

L'EMeOH/Flr aux doses de 600 et 800 mg/Kg a entraîné une diminution significative de la température rectale des rats ($p < 0,05$, $p < 0,01$) une heure après leur traitement. Tandis qu'à la dose de 400 mg / kg, la température rectale des rats n'a commencé à baisser que 3 heures après le traitement ($p < 0,01$). L'atténuation maximale de la fièvre a été observée avec l'EMeOH/Flr (87,41%) à la dose de 800 mg/Kg. Nous avons constaté que le D/Flr a entraîné une réduction de la fièvre des rats traités avec la dose de 800 mg/Kg une heure après son administration avec un pourcentage de 69,23% atteint à la 4ème heure (Tableau 3.27 et Figure 3.46).

Nous avons remarqué que l'effet antipyrétique obtenu avec l'EMeOH/Flr à la dose de 800 mg/Kg était comparable à celui de l'ibuprofène (91,61%) $p > 0,05$ (Figure 3.46).

Tableau 3.27. Activité antipyrétique des extraits de fleurs

Extraits	Température (°C)					
	T initiale	0h #	1 h	2 h	3 h	4 h (% de réduction)
Témoin	37,17±0,18	38,35±0,27	38,48±0,25	38,43±0,24	38,57±0,23	38,6±0,18
Ibuprofène (100mg/Kg)	37,15±0,13	38,18±0,15	37,67±0,14**	37,25±0,16***	37,17±0,17***	37,27±0,17*** (91,61)
EMeOH/Flr (400 mg/kg)	37,1±0,15	38,42±0,13	38,4±0,12	38,2±0,12	37,85±0,16**	37,7±0,12*** (58,04)
EMeOH/Flr (600 mg/kg)	37,25±0,13	38,37±0,14	37,92±0,11*	37,65±0,12**	37,6±0,15***	37,62±0,15*** (74,13)
EMeOH/Flr (800 mg/kg)	37,2±0,13	38,35±0,11	37,77±0,13**	37,53±0,11***	37,42±0,09***	37,38±0,11*** (87,41)
D/Flr (400 mg/kg)	37,2±0,17	38,35±0,17	38,47±0,13	38,4±0,12	38,28±0,13	38,1±0,1* (37,06)
D/Flr (600 mg/kg)	37,05±0,13	38,17±0,13	38,31±0,10	38,03±0,11	37,87±0,11*	37,73±0,10** (52,44)
D/Flr (800 mg/kg)	37,18±0,12	38,25±0,15	37,82±0,12*	37,65±0,14**	37,62±0,15***	37,62±0,16*** (69,23)

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=6/ groupe; significatif à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparaison avec le groupe témoin en utilisant le test ANOVA one-way suivi par le test de Dunnett.

0h : correspond à la température rectale des rats 18 h après injection de la levure de bière et au moment de l'administration des différents produits

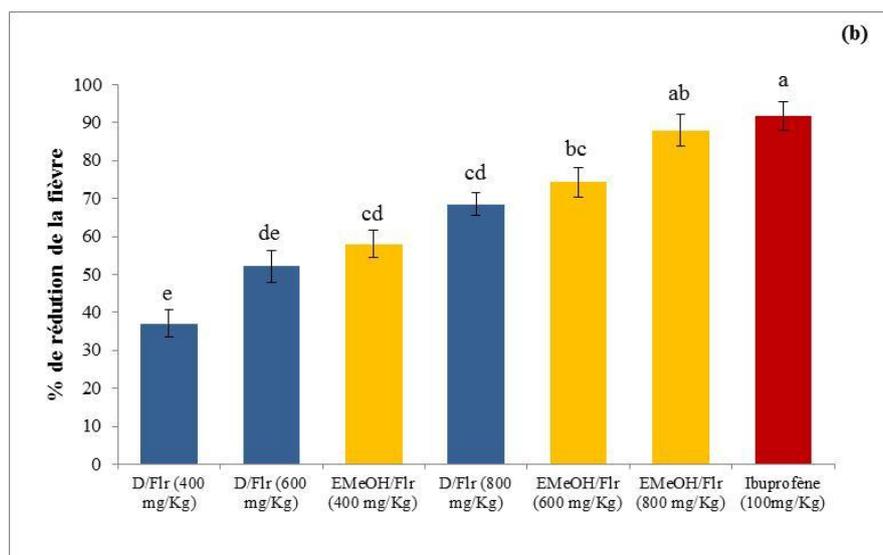


Figure 3.46. Pourcentage de réduction de la fièvre des rats traités par les extraits des fleurs

Différentes lettres alphabétiques indiquent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

La réponse fébrile est régulée par le système nerveux central grâce à des mécanismes complexes. C'est le premier signe d'un processus inflammatoire qui se traduit par une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines. Ces dernières entraînent une élévation de la température corporelle en activant la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2) au niveau de l'hypothalamus préoptique [534] [535].

Les médicaments antipyrétiques notamment les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont la capacité d'inhiber la production de prostaglandines dans l'hypothalamus [536] [537].

Dans cette étude, les extraits méthanoliques et les décoctés des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* L. ont entraîné une diminution de la température corporelle des rats. Par conséquent, il pourrait être suggéré que l'action antipyrétique des extraits d'*Inula viscosa* L. serait liée à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dans l'hypothalamus.

Différentes recherches scientifiques ont relié l'effet antipyrétique à l'effet anti-inflammatoire notamment celui de certains flavonoïdes qui possèdent une action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines [538] [539]. En effet selon Siva et al.,

[540], les plantes présentant une activité analgésique et anti-inflammatoire possèderaient également une activité antipyrétique. Dans notre étude l'effet antipyrétique des extraits d'*Inula viscosa* pourrait donc être attribué à leur activité anti-inflammatoire et analgésique.

Les extraits d'*Inula viscosa* contiennent de nombreux composés tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Il est donc difficile de savoir lequel d'entre eux est responsable de l'activité antipyrétique d'autant plus que certaines molécules n'ont pas pu être identifiées dans les extraits méthanoliques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire des Biotechnologies, Environnement et Santé (Université Saad DAHLAB, Blida), dont l'un des objectifs est la valorisation de la flore méditerranéenne algérienne et plus particulièrement de rechercher de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique à partir de plantes médicinales spontanées.

Ce travail est donc une contribution à la connaissance d'une plante médicinale *Inula viscosa* de la flore algérienne qui est connue pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques. A l'issue de cette expérimentation nous avons abouti à un certains nombres de constatations :

L'enquête ethnobotanique nous a permis de collecter des informations sur *Inula viscosa* et son utilisation en médecine traditionnelle. A l'issue de cette enquête préliminaire nous avons constaté que malgré sa large répartition géographique elle est peu connue par la plupart des individus questionnés.

Les coupes histologiques nous ont permis de connaître l'organisation des différents tissus et de mettre en évidence les sites sécréteurs des feuilles et des tiges.

Le screening phytochimique réalisé a révélé que la partie aérienne de cette plante contient de nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les tanins galliques, les terpènes, les saponosides, les coumarines et l'absence d'alcaloïdes.

Le dosage spectrophotométrique des polyphénols et des flavonoïdes des différents extraits des feuilles et des fleurs a montré que ces extraits sont riches en polyphénols.

L'analyse des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs par HPLC-DAD a mis en évidence la présence essentiellement d'acides phénoliques (des dérivés de

l'acide cafféoylquinique) et de flavonoïdes de type flavonols (quercétine, myricétine et leurs dérivés, le kaempférol, l'isorhamnétine), un flavone (la diosmétine).

L'étude *In Vitro* de l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles et des fleurs évaluée par le test du DPPH et FRAP a dévoilé un important pouvoir antioxydant des décoctés qui se rapproche à celui du standard « acide ascorbique », suivi par les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'*Inula viscosa* a révélé que les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs possèdent un important pouvoir antibactérien sur les bactéries à Gram positif et principalement sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline (SARM) et sont moins actifs vis-à-vis des souches à Gram négatif à l'exception d'*Acinetobacter baumannii*. Toutes les souches de *Candida* ont été peu sensibles aux différents extraits testés.

Les résultats de l'évaluation *in-vitro* de l'effet leishmanicide des extraits des feuilles et des fleurs nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'une activité antileishmanienne de l'extrait méthanolique des deux organes sur la forme promastigotes de *Leishmania major* et *Leishmania infantum*. Nous avons également pu optimiser le protocole du test des comètes afin d'évaluer l'effet génotoxique (endommagement de l'ADN) des extraits méthanoliques sur la souche *L. infantum*. L'étude complémentaire de la cytotoxicité des extraits n'a pas révélé d'effet délétère sur les macrophages (monocytes de la lignée Thp1 différenciées) aux concentrations testées. Ces résultats indiquent l'effet sélectif des extraits vis-à-vis des souches de leishmanies.

Globalement, il apparaît que l'activité antimicrobienne d'*Inula viscosa* reste diversifiée et variable en fonction des souches testées et les extraits utilisés.

L'évaluation *In Vivo* de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de l'induction de l'œdème de la patte des souris avec de la carragénine et la méthode de l'induction de l'œdème auriculaire avec du xylène a montré que l'administration orale des extraits méthanoliques et des décoctés des feuilles et des fleurs a entraîné une inhibition significative de l'œdème ($p < 0,001$) en comparaison avec le lot témoin.

Les résultats de l'étude de l'activité antalgique par la méthode de l'induction de crampes avec de l'acide acétique ont révélé que l'administration orale préventive des différents extraits a réduit significativement le nombre de crampes indiquant ainsi leur important effet antalgique.

L'évaluation de l'activité antipyrétique par la méthode de l'induction d'une hyperthermie à des rats avec de la levure de bière a permis de mettre en évidence un effet antipyrétique intéressant des extraits méthanoliques des deux organes de la plante.

Les résultats obtenus dans l'étude de la toxicité aiguë des différents extraits n'ont montré aucun signe de toxicité aux doses utilisées. L'étude de la toxicité subaiguë des extraits méthanoliques n'a révélé que peu de changements significatifs dans le bilan biochimique et aucun changement significatif dans le bilan hématologique. L'étude histopathologique des foies et des reins des rats traités a montré que l'architecture structurale de ces organes a été conservée. De ce fait l'étude de la toxicité des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* n'a pas montré de signes de toxicité aiguë ou subaiguë aux doses étudiées.

Comme perspectives, il serait nécessaire d'étudier la composition phytochimique des extraits n-hexane (GC/MS) et des décoctés (HPLC) à fin d'identifier les molécules responsables de leurs effets pharmacologiques.

Il serait intéressant d'approfondir l'étude antibactérienne des extraits d'*Inula viscosa* et particulièrement sur le *Staphylococcus aureus* responsable d'infections cutanées nosocomiales et ceci en induisant une infection cutanée (abcès) *in vivo* par *Staphylococcus aureus* chez un modèle animal et de le traiter avec des crèmes formulées à base d'extraits de cette plante afin de mettre en évidence leur éventuel effet antiseptique et cicatrisant (étude histologique).

Concernant l'activité antileishmanienne, il serait judicieux d'isoler les métabolites secondaires d'*Inula viscosa* et de tester leurs activités leishmanicide *in vitro* sur la forme promastigote et surtout sur la forme amastigote

(intramacrophagique). Par la suite tester ce ou ces principes actifs *in vivo* sur un modèle animal de la leishmaniose cutanée.

L'effet antioxydant de la plante devrait être étayé par une étude *In vivo* des principes actifs d'*Inula viscosa* après leur administration à un modèle animal.

Une étude de la toxicité subaiguë et chronique des décoctés de la partie aérienne d'*Inula viscosa* serait intéressante étant donné leur utilisation traditionnelle dans le traitement de maladies chroniques telles que le diabète et l'hypertension artérielle.

A l'avenir il serait souhaitable que la richesse de la flore algérienne en plantes médicinales soit préservée et valorisée pour le développement de nouveaux principes actifs à intérêt thérapeutique.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide Ascorbique
Abs	Absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdiens
ALAT	Alanine Aminotransférase
Albu	Albumine
ASAT	Aspartate Aminotransférase
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Acide Urique
Bil T	Bilirubine Totale
BT	Bleu de Trypan
CC50	Concentration Cytotoxique 50
Chol	Cholestérol total
CI50	Concentration Inhibitrice 50
cm	Centimètre
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COX	Cyclo-oxygénase
CQ	Cafféoylquinique
Créa	Créatinine
D/F	Décocté des feuilles
D/Flr	Décocté des fleurs
DAD	Détecteur UV à barrettes de diodes
DCQ	Dicafféoylquinique
DIC	dissociation induite par collision
dL	Décilitre
DL50	Dose Létale médiane
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité Optique
DPPH	1.1.-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DZI	Diamètre de zone d'inhibition

EAG	Equivalent acide Gallique
EC50	Efficient Concentration 50
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique
EMeOH/F	Extrait Méthanolique des feuilles
EMeOH/Flr	Extrait Méthanolique des fleurs
EQ	Equivalent Quercétine
ERO	Espèce Réactive De L'oxygène
ESI	Source D'ionisation Electrospray
FL	Femtolitre
GB	Globules Blanc Leucocytes
gly	glycémie
GR	Globules Rouges Erythrocytes
GT	Gamma-GT
H&E	Hématoxyline et Éosine
HCT	Hématocrite
HGB	Hémoglobine
HPLC	Chromatographe en phase Liquide à Haute Performance
IL1	Interleukine 1
IS	Indice De Sélectivité
kg	Kilogramme
Kv	Kilovolt
L	Litre
LMP	Low Melting Point= Bas point de fusion
LYM	Lymphocytes
<i>m/z</i>	Masse/charge électrique
mA	Milliampère
MCH	Concentration Moyenne en Hémoglobine
MCHC	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
MCV	Volume Corpusculaire Moyenne
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
MS	Spectromètre De Masse

MTT	Bromure De 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium)
NA	Normal Agarose
nm	Nanomètre
NNN	Novy-Mc Neal-Nicolle
ODS	Octa Decyl Silane=revêtement de la colonne
ONAB	Office National des Aliments du Bétail
PA	Phosphatase Alcaline
Pat	Souches Isolees A Partir De Prelevements Hospitaliers
PBS	Tampon Phosphate Salin= Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramme
PGE2	Prostaglandine E2
PGS	Prostaglandine
pH	Potentiel Hydrogène
PLT	Nombre de Plaquettes
PMA	Phorbol Myrisate Acétate
Pro	Protides (protéines totales)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
rpm	Rotation par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBIII	Antimoine
SDS	Dodécylsulfate De Sodium
SEM	Erreur Standard Moyenne
SOD	Superoxyde Dismutase
spp	Sous espèce
SVF	Serum de Veau foetal
TB	Bilirubine Totale
TG	Triglycérides
TNF-a	Tumor necrosis factor alpha
tr	Temps de rétention
UFC	Unité Formant Colonies
UI	Unité Internationale
UV	Ultra-Violet
V	Volt

λ	Longueur d'onde
%	Pourcentage
[M-H] ⁻	Molécule déprotégée
°C	Degré Celsius
μg	Microgramme
μm	Micromètre

GLOSSAIRE

Alzheimer : La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative qui engendre un déclin progressif des facultés cognitives et de la mémoire.

Dynode : Ce sont des composants essentiels (Électrode d'un tube électronique ou d'un photomultiplicateur) du Photomultiplicateur, dont le rôle essentiel est de fournir une émission secondaire.

Extravasation : Epanchement d'un liquide organique hors de son contenant naturel

Feuilles Sessiles : Se dit d'une feuille ayant une implantation fixe à la tige dépourvue de pétiole.

Frutescent: Qualifie une plante présentant les caractères d'un arbuste

Insecte diptère : insectes à deux ailes.

Parkinson : Est une **maladie neuro-dégénérative** caractérisée par la destruction d'une population spécifique de neurones : les **neurones à dopamine** de la substance noire du cerveau.

Phlébotome : Insecte diptère qui peut être vecteur de pathogènes de la santé humaine.

Purgatif : Désigne un remède qui a la propriété de purger, de nettoyer, de faciliter les évacuations intestinales.

Quadrupôle : un quadripôle (ou quadrupôle) est la modélisation d'un composant ou d'un circuit à deux entrées et deux sorties, permettant le transfert de signaux électriques ou d'énergie entre deux dipôles.

Racine pivotante : Se dit d'une racine issue d'une graine, très grosse par rapport aux racelles et s'enfonce verticalement dans le sol.

Xénobiotique : Se dit d'une molécule étrangère à un organisme vivant (additif alimentaire, par exemple) et considérée comme toxique.

Zymodème : On définit par "zymodème" l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique.

Milieu axénique : une culture *axénique* qualifie une culture d'un organisme eucaryotique dans un milieu dépourvu de bactéries (stérile).

Zoonose : Maladie infectieuse dont l'agent se transmet des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa.

Sève brute : Est la sève provenant des racines, qui contient uniquement de l'eau et des sels minéraux

Sève élaborée : Est la sève contenant de l'eau et les sucres synthétisés par les parties aériennes de la plante lors de la photosynthèse .

Souche dermatrope : Microorganisme qui se fixe électivement sur la peau et les muqueuses.

Souche viscérotrope : Microorganisme ayant une affinité pour les viscères

Génotoxicité : Aptitude d'un agent (d'origine physique ou chimiques) provoquant l'apparition de lésions dans l'ADN, qui peuvent éventuellement conduire à des mutations.

Fibrose : Augmentation anormale de la quantité de tissu conjonctif fibreux dans un tissu ou un organe.

REFERENCES

- [1]. Petrovska, B.B., «Historical review of medicinal plants' usage», *Pharmacognosy Reviews*, Vol 6, n°11, (2012), 1-5.
- [2]. Elgorashi, E.E., Taylor, J.L.S., Maes, A., de Kimpe, N., van Staden, J. et Verschaeve, L., «The use of plants in traditional medicine: potential genotoxic risks», *South African Journal of Botany*, Vol 68, n° 3, (2002), 408-410.
- [3]. Fabricant, D.S. et Farnsworth, N.R., «The value of plants used in traditional medicine for drug discovery», *Environmental Health Perspectives*, Vol 109, n°1, (2001), 69–75.
- [4]. Katiyar, C., Gupta, A., Kanjilal, S. et Katiyar, S., «Drug discovery from plant sources: An integrated approach», *Ayu: An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*, Vol 33, n°1, (2012), 10-19.
- [5]. Rungsung, W., Kumar Ratha, K., Dutta, S., Kumar Dixit, A. et Hazra, J., «Secondary metabolites of plants in drugs discovery», *World Journal of Pharmaceutical Research*, Vol 4, n° 7, (2015), 604-613.
- [6]. Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M.Z., Amjad, M.S., Mehreen Sadaf, H., Riaz, I., Sabir, S., Ahmad N. et Sabaoon, «Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life», *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Vol 6, n°2, (2017), 205-214.
- [7]. González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., Hadjichambis, A., Houmanie, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M. et ElJohrig, S., «Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 116, n°2, (2008), 341-357.
- [8]. Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A. et Kent, J., «Biodiversity hotspots for conservation priorities», *Nature*, Vol 403, n°6772, (2000), 853-858.

- [9]. Quezel, P. et Santa, S., «Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales», Editions du Centre National de la recherche scientifique, Tome 2, (1963), 1170p.
- [10]. Baba Aissa, F., «Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb»; substances végétales d'Afrique, Edition moderne Rouiba, Algérie, (1999), 368p.
- [14]. Brullo, S. et De Marco, G., «Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae), Portugaliae Acta Biology», Vol 19, (2000), 341-354.
- [15]. Qaiser, M. et Abid, R., «Chemotaxonomic study of *Inula* L.(s.str.) and its allied genera (Inuleae- Compositae) from Pakistan and Kashmir», Pakistan Journal of Botany, V 35, n°2, (2003), 127-140.
- [16]. Blaschek, W., Hansel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H. et Schneider, G., «Hagers Handbuch der -Pharmazeutisch en Praxis», Folgeband 2:Drogen A-K. 5^{ème} Edition Springer- Verlag Berlin Heidelebergpp,(1998), 1195p.
- [17]. Jiangsu, « Dictionary of Traditional Chinese Materia Medica», Shanghai Technology Press: Shanghai , Vol 2, (1979), 2216-2219.
- [18]. Kaul, M.K., « Medicinal Plants of Kashmir and Ladakh: Temperate and Cold Arid Himalaya », Indus Publishing Company, FS- 5, Tagore Garden, New Delhi, (1997),173p.
- [19]. Seca, A.M., Pinto, D.C. et Silva, A.M., «Metabolomic Profile of the Genus *Inula*», Chemistry & Biodiversity, Vol 12, n°6, (2015), 859-906.
- [20]. Fauron, R., Moatti, R. et Donadieu, Y., «La phytothérapie ,thérapeutique différentes», Edtion Moline, (1983), 245p.
- [21]. Fournier, P., «Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France», Edition le chevalier Tome 1, (1947), 176-178 pp.
- [22]. Abu Zarga, M.H., Hamed, E.M., Sabri, S.S.,Voelter,W. et Zeller, K.P., «New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa*», Journal of Natural Products, Vol 61, (1998), 798-800.
- [23]. Aik Bekkara, F., Benhammou, N., Kadifkova Panvoska, T., «Biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *Inula viscosa* from the Tlemcen region of Algeria», Advences in Food Sciences, Vol 30, n°3 (2008), 132-139.

- [24]. Bonnier, G., «La grande flore », Edition Belin, Tome 1, (1990), 400p.
- [25]. Ali-Shtayeh, .M.S., Yaghmout, R.M.R., Faidi, Y.R., Salem, K. et Al-Nuri, M.A., «Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in The Palestinian area», Journal of Ethnopharmacology, Vol 60, (1998), 265-271.
- [26]. Wang, W., Ben-Daniel, B.H. et Cohen, Y., «Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*, Disease control and pest management», Phytopharmacology Vol 94, n°10, (2004), 1042-1047.
- [27]. Zeggwagh, N.A., Ouahidi, M.L., Lemhadri, A. et Eddouks, M., «Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L aqueous extract in normal and diabetic rats», Journal of ethno-pharmacology, Vol 108, (2006), 223-227.
- [28]. Dupont, F. et Guignard, J.L., «Botanique» systématique moléculaire», 14^{ème} édition révisée, Masson, (2007), 286 p.
- [29]. Mohand Ait youcef, S. « Les plantes médicinales de Kabylie », Edition Ibiss press, (2006), 349p.
- [30]. Stavrianakou, S., Liakopoulos, G et Karabourniotis, G., «Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) », Environmental and Experimental Botany, Vol 56, (2006), 293-300.
- [31]. Markert, B. et Frise, K., «Trace elements- their distribution and effects in the environment», Edition Elsevier, UK, (2000), 582p.
- [32]. Sell. P. et Murrell, G., « Flora of Great of Great Britain and Irland. Campanulaceae – Asteraceae». 1st Edition Cambridge University Press, Vol 4, (2006), 652 p.
- [33]. Zeguerrou, R., Guesmia, H. et Lahmadi, S., « Recueil des plantes médicinales dans la région des Ziban », Edition Dar El Houda, Algérie, (2013), 104p.
- [34]. Bayer, F., Buttler, K.P., Flinkezeller, X. et Graw, J., «Guide de la flore méditerranéenne», Edition Delachaux et nisestle, Paris, (1990), 206p.

- [35]. Parolin, P., Scotta, M.I. et Bresch, C., « Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant», *International Journal of Experimental Botany*, (2013), 22p.
- [36]. Paquet, M.J., « L'Inule visqueuse (*Inula viscosa*) », *Bulletin de la Société Botanique de France*, Vol 70, n°1, (1923), 139-141.
- [37]. Benchohra, H.A. et Hamel, L., «Etude anatomique et morphologique d'*Inula viscosa*», *ScienceLib Editions Mersenne*, Vol 3, n°110701, (2011), 1-8p.
- [38]. Wacquant, J.P., «Biogeographical and physiological aspects of the invasion by *Dittrichia* (ex-*Inula*) *viscosa* W. Greuter, a ruderal species in the Mediterranean Basin». F. di Castri. A. 1. Hansen and M. Debussche (eds.). *Biological Invasions in Europe and the Mediterranean Basin*, (1990), 353-364.
- [39]. Hernández, V., Del Carmen Recio, M., Máñez, S., Prieto, J.M., Giner, R.M. et Ríos, J.L., «A mechanistic approach to the *in vivo* anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*», *Planta Medica* Vol 67, (2001), 726-731.
- [40]. Benayache, S., Banayache, F., Dendoughi, H. et Jay, M., « Les Flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. », *Plantes médicinales et phytothérapie*, Vol 25, n°4, (1991), 170-176.
- [41]. Baba Aissa, F., «Les plantes médicinales d'Algérie», *Ibn Sina*, (1990), 181p.
- [42]. Barbetti, P., Chiappini, I., Fardella, G. et Menghini, A., «A new eudesmane acid from *Dittrichia* (*Inula*) *viscosa*», *Planta Medica*, Vol 51, (1985). 471.
- [43]. Lauro, L. et Rolih, C., «Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait», *Boll Soc Ital BiolSper* 66, (1990), 829-834.
- [44]. Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J. et Palevitch, D., «Plants used for the treatment of diabetes in Israel», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 19, (1987), 145-51.
- [45]. Bellakhdar, J., « La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoir populaires », *Edition Ibis Press*, (1997), 764p.

- [46]. Hmamouchi, M., « Les plantes médicinales et aromatiques marocaines, 2ème édition », (2001), 389 pp.
- [47]. Fresquet, J.L., Aguirre, C., Baguena, M.J., Lopez, M.L. et Tronchoni, J.A., « Plantes médicinales d'usage populaire dans la région de la Ribera Alta (Valencia, Espagne) », Médicaments et Aliments : L'approche Ethnopharmacologique, Edition Paris, (1993), 207-214.
- [48]. Tahri, N., El Basti, A., Zidane, L., Rochdi, A. et Douira, A., «Etude Ethnobotanique Des Plantes Medicinales Dans La Province De Settat (Maroc)», Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty, Vol 12, n°2, (2012), 192-208.
- [49]. Meddour, R. et Meddour-Sahar, O., «Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Tizi Ouzou, Algeria) », Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants, Vol 1, n°2 (2015), 137-151.
- [50]. Eddouks, M., Maghrani, M. et Lemhadri, A., «Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the southeast region of Morocco (Tafilalet) », Journal of Ethnopharmacology, Vol 82, (2002), 97-103.
- [51]. Macheix, J.J., Anne, F. et Christan, J.A., « Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique ». Collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, (2005), 192p.
- [52]. Judd W.S., Bouharmont D., Compbell C.S., Evard C.M., Kellogg F.A. et Stevens P., « Botanique systématique : une perspective phylogénique », Edition De Boeck université, (2002), 398p.
- [53]. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. et Jian, Y., «Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae», Food Chemistry, Vol 102, (2007), 771-776.

- [54]. Bravo, L., Abia, R. et Saura-Calixto, F., «Polyphenols dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 42, (1994), 1481-1487.
- [55]. Hennebelle, T., Sahpaz, S. et Bailleul, F., « Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif », *Phytothérapie*, Vol 2, (2004), 3-6.
- [56]. Bruneton, J., « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales » 4^{ème} Edition TEC& DOC, Lavoisier, Paris, (2009), 1292 p.
- [57]. Urquiaga, I. et Leighton, F., «Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress», *Biological Research.*, Vol 33, n°2, (2000), 55-64.
- [58]. Herbert, R.B., «The Biosynthesis of secondary metabolites», 2^{ème} Edition Chapman and Halle, London, (1989), 232 p.
- [59]. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Et Sapirstein, H.D., “Phenolic content and antioxidant Activity of Pearled wheat and Roller-Milled Fractions”, *Cereal Chemistry*, Vol 82, n°4, (2005), 390- 393.
- [60]. Psotova, J., Lasovsky, F. et Vicar, J., «Metal-chelating properties. Electrochemical Behavior. Scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics», *Biomed papers*, Vol 147, n°2, (2003), 147-153.
- [61]. Penso, J, Cordeiro, K.C.F.A., daCunh, C.R.M., da Silva Castro, P.F., Martins, D.R., Lião, L.M., Rocha, M.L et Oliveira, V., «Vasorelaxant activity of 7- β -O-glycosides biosynthesized from flavonoids», *European Journal of Pharmacology*, Vol 733, (2014), 75–80.
- [62]. Guignard, J.L., «Abrégé de Biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie», Masson. Paris, (1974), 214p.
- [63]. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., « Les polyphénols en agroalimentaire», *Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, (2006), 398p.
- [64]. Bruneton J., «Pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales», 3^{ème} Edition TEC& DOC Lavoisier, Paris, (1999), 1120p.

- [65].Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. et Palazón, J., «Phenolic Acids» In : Ramawat, K., Mérillon, J.M., (ed.), *Natural Products*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2013), 1951-1973.
- [66].Merghem, R., «Eléments de biochimie végétale», 1^{ère} Edition Bahaeddine, Algérie (2009). 172p.
- [67].Bruneton, J., «Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales», 5^{ème} Édition Tec& Doc, Lavoisier, Paris. (2015), 1504p.
- [68].De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. et Brinkman, U.A.T., «Analytical separation and detection methods for flavonoids», *Journal of Chromatography A*, Vol 1112, (2006), 31-63.
- [69].Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomàs-Barberà, F.A., Datta, N., Singanusong R. et Chen, S.S., «Flavonoids in Food and Their Health Benefits Plant Foods for Human Nutrition» Vol 59, (2004), 113–122.
- [70].Tapas, A.R., Sakarkar, D.M. et Kakde, R.B., «Flavonoids as Nutraceuticals: A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*», Vol 7, n°3, (2008), 1089-1099.
- [71].Ramawat, K.G., Dass, S., Mathur, M., «Chapter 2: The Chemical Diversity of Bioactive Molecule and Therapeutic Potential of Medicinal Plants». In: Ramawat KG (ed.), *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2009), 7-32.
- [72]. Heller, W. et Forkmann, G., «The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. *Secondary Plant Products*», *Encyclopedia of plant physiology*. Edition Chapman & Hall, London, (1993), 399-425.
- [73]. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., «Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential», *Indian Journal of Pharmacology*, Vol 33, (2001), 2-16.
- [74]. Scott Obach, R. et Kalgutkar, A.S., «Reactive Electrophiles and Metabolic Activation» *Comprehensive Toxicology* (2nd Edition), Vol 1, (2010), 309–347.

- [75].Eyong, K.O., Kuete, V. et Efferth, T., «10. Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa», pp 152-191 in Medicinal Plant Research in Africa, Pharmacology and Chemistry Edition Elsevier, (2013), 916p.
- [76].Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., «Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins», Applied Microbiology and Biotechnology , Vol 78, (2008), 189–199.
- [77]. Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., «Tannins and human health: a review», Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol 38, n°6, (1998), 421-464.
- [78]. Collet, E. « Progrès en dermato-allergologie », Edition John Libbey Eurotext, (2002), 271p.
- [79]. Moussard, C., « Biochimie structurale et métabolique », 3eme Edition De Boeck, (2006), 351p.
- [80]. Meyer,S., Reeb, C. et Bosdeveix, R ., «Botanique: Biologie et physiologie végétales. » 2^{ème} Edition Maloine, (2008), 490p.
- [81]. Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak., K. et Georgiev M.I., «Chapter 11: Terpenoids», in PART II: Plant Metabolites: Their Chemistry, Pharmacognosy, (2017), 2033-266.
- [82].Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M., «Biological effects of essential oils – A review», Food and Chemical Toxicology, Vol 46, (2008) 446-475.
- [83].Hopkins, W. G., «Physiologie végétale», Edition De Boek, Bruxelles, (2003), 514 p.
- [84].Wallace, R.J., «Antimicrobial properties of plant secondary metabolites», Proceedings of the Nutrition Society, Vol 63, (2004), 621-629.
- [85]. Catier, O. et Roux, D., « Botanique pharmacognosie phytothérapie ». 3^{ème} Edition Cahiers du préparateur en pharmacie, (2007), 141p.
- [86]. Small, E. et Catling, P.M., « Les cultures médicinales canadiennes ». NRC Research Press, (2000), 281p.

- [87]. Gazengel, J.M. et Orecchioni, A.M., « Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique », 2^{ème} Edition Lavoisier, Paris, (2013), 1761 p.
- [88]. Wink, M., «Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites», Medicines, Vol 2, (2015), 251-286.
- [89]. Danino, O., Gottlieb, H.E., Grossman, S. et Bergman, M., «Antioxidant activity of 1,3-dicafféoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*», Food research international, Vol 42, (2009), 1273-1280.
- [90]. Trimech, I., Weiss, E.K., Chedea, V.S., Marin, D., Detsi, A., Ioannou, E., Roussis, V. et Kefalas, P., «Evaluation of Antioxidant and Acetylcholinesterase Activity and Identification of Polyphenolics of the Invasive Weed *Dittrichia viscosa*», Phytochemical analysis, Vol 25, (2014), 421-428.
- [91]. Mahmoudi, H., Hosni, K., Zaouali, W., Amri, I., Zargouni, H., Ben Hamida, N., Kaddour, R., Hamrouni, L., Ben Nasri, M. et Ouerghi, Z., «Comprehensive photochemical analysis, antioxidant and antifungal activities of *Inula viscosa* Aiton leaves», Journal of Food Safety, Vol 36, (2016), 77-88.
- [92]. Rhimi, W., Ben Salem, I., Immediato, D., Saidi, M., Boulila, A. et Cafarchia, C., «Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of Crude *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter Leaf extracts», Molecules, Vol 22, n°7, (2017), 1-13.
- [93]. Öksüz, S., «Flavonoidal Compounds Of *Inula viscosa* Part II», Planta medica, Vol 31, (1977), 271-273.
- [94]. Abdalla, S., Abu Zarga, M., Afifi, F., AL-Khalil, S. et Sabri, S., «Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle», General Pharmacology, Vol 19, n°4, (1988), 559-563.
- [95]. Talib, W.H., Abu Zarga, M., Mahasneh, A.M., «Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effect of compounds isolated from *Inula viscosa*», Molecules, Vol 17, n°3, (2012), 3291-3303.
- [96]. Grande, M., Piera, F., Cuenca, A., Torres, P., Bellido, I.S., «Flavonoids from *Inula viscosa*», Planta Medica, Vol 51, n°5, (1985), 414-419.

- [97].Gökbulut, A., Özhan, O., Satılmış, B., Batçioğlu, K., Günal, S. et Şarer, E., «Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey», *Natural Product Communications*, Vol 8, n°4,(2013), 475-478.
- [98].Gökbulut, A., «Determination of hispidulin in the flowers of *Inula viscosa* (L.) Aiton using HPLC and HPTLC methods», *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 13, n°2, (2016), 159-166.
- [99].Zhang, W.Y., Lee, J.J., Kim, I.S., Kim, Y., Park, J.S. et Myung, C.S., «7-O-Methylaromadendrin stimulates glucose uptake and improves insulin resistance in vitro», *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol 33, n°9, (2010), 1494-1499.
- [100].Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M. et Ríos, J.L., «Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism», *Life Sciences*, Vol 81, n° 6, (2007), 480-488.
- [101].Pérez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Duru, M.E., Harmandar, M. et Vallejo, M.C.G., «Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Inula viscosa* (L.) Aiton», *Flavour and Fragrance Journal*, Vol 11, (1996), 349–351.
- [102].Camacho, A., Fernandez, A., Fernandez, C., Altarejos, J. et Laurent, R., «Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter», *Rivista Italiana EPPOS*, 29, (2000), 3-8.
- [103].De Laurentis, N., Losacco, V., Milillo, M. A. et Lai, O., «Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, Southern Italy», *Delpinoa n.s.*, Vol 44, (2002), 115-119.
- [104].Blanc, MC., Bradesi, P., Gonçalves, MJ., Salgueiro, L. et Casanova, J., «Essential oil of *Dittrichia viscosa* spp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity», *Flavour and Fragrance Journal*, Vol 21, n°2, (2006), 324-332.
- [105].Haoui, I.E., Derriche, R., Madani, L. et Oukali, Z., «Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton», *Arabian Journal of Chemistry*, Vol 8, (2015), 587-590.

- [106].Nasser, M., Housheh, S., Kourini, A., and Maala, N., «Chemical composition of essential oil from leaves and flowers of *Inula viscosa* (L.) in Al-Qadmous region, Syria», *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol 5, n°12, (2014), 5177-5182.
- [107].Madani, L., Derriche R., et Haoui, I.E., «Essential oil of Algerian *Inula viscosa* leaves», *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, Vol 17, n°1, (2014), 164-168.
- [108].Ulubelen, A., Öksüz, S. et Gören, N., «Sesquiterpene acids from *Inula Viscosa*», *Phytochemistry*, Vol 26, n°4, (1987), 1223–1224.
- [109].Fontana, G., La Rocca, S., Passannanti, S. et Paternostro, M.P., «Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*», *Natural Product Research*, Vol 21, N°9, (2007), 824-827.
- [110].Mañez, S., Recio, M.C., Gil, I., Gomez, C., Giner, R.M., Waterman, P.G. et Rios, J.L., «A glycosyl analogue of diacylglycerol and other anti-inflammatory constituents from *Inula viscosa*», *Journal of Natural Products*, Vol 62, n°1, (1999), 601-604.
- [111].Cohen, Y., Wang, W., Ben-Daniel, B.H. et Ben-Daniel, Y., «Extracts of *Inula viscosa* Control Downy Mildew of Grapes Caused by *Plasmopara viticola*», *Phytopathology*, Vol 96, n° 4, (2006), 417-424.
- [112].Mamoci, E., Cavaski, I., Simeone, V., Mondelli, D., Al-Bitar, L. et Caboni, P., «Chemical composition and in vitro activity of plant extracts from *Ferula commmunis* and *Dittrichia viscosa* against postharvest Fungi», *Molecules*, Vol 16, (2011), 2609-2625.
- [113].Öksüz, S., « Ψ -Taraxasterol Acetate from *Inula viscosa*», *Planta medica*, Vol 29, (1976), 343-345.
- [114].Grande, M., Torres, P., Piera F., et Bellido, I., «Triterpenoids from *Dittrichia Viscosa*», *Phytochemistry*, Vol 31, n° 5, (1992), 1826-1828.
- [115].Dhalla, N.S., Temsah, R.M. et Netticadan, T., «Role of oxidative stress in cardiovascular diseases», *Journal of Hypertension*, Vol 18, n°6, (2000), 655-673.

[116].Giacco, F., et Brownlee, M., «Oxidative stress and diabetic complications», *Circulation Research*, Vol 107, n°9, (2010), 1058–1070.

[117].Quiñonez-Flores, C.M., González-Chávez, S.A., Del Río Nájera D. et Pacheco-Tena, C., «Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review», *BioMed Research International*, Vol 2016, (2016), 1-14.

[118].Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. et LLeonart, M.E., «Oxidative stress and cancer: an overview», *Ageing Research Reviews*, Vol 12, n°1, (2013), 376-390.

[119].Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., and Mahajan, R.T., «Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options», *Current Neuropharmacology*, Vol 7, n°1, (2009), 65–74.

[120]. Halliwell, B., «Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis», *British Journal Experimental Pathology*, Vol 70, (1989), 737 - 757.

[121].Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., « Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques », Edition Tec & Doc éditions médicales internationales Paris, (2005), 548p.

[122].Babusikova, E., Jurecekova, J., Evinova, A., Jesenak M., and Dobrota D., «Oxidative Damage and Bronchial Asthma», *Respiratory Diseases*, Dr. Mostafa Ghanei (Ed.), (2012), 152-176.

[123].Noori, S., «An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System 1:413», *Open Access Scientific Reports*, Vol 1, n°8, (2012), 1-9.

[124].Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. et Kalayci, O., «Oxidative Stress and Antioxidant Defense», *WAO World Allergy Organization Journal*, Vol 5, n°1, (2012), 9-19.

[125].Favier, A., « Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ». *L'actualité Chimique*, (2003), 108-115p.

- [126].Barrouki, R., « Stress oxydant et vieillissement », Médecine Sciences, Vol 22, n°3, (2006), 266-272.
- [127].Dickinson, D.A. et Forman, H.J., «Cellular glutathione and thiols metabolism», Biochemical Pharmacology, Vol 64, n°6, (2002), 1019-1026.
- [128].Favier, A., « Stress oxydant et pathologies humaines », Annales Pharmaceutiques Françaises, Vol 64, (2006), 390-396.
- [129].Cano, N., Bernoud, D., Schneider, S., Vasson, M.P., Hasselmann, M. et Lerverve, X., « Traité de nutrition artificielle de l'adulte », Edition Springer-Verlag, Paris, (2007), 1191p.
- [130].Dacosta, Y., « Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques », Editions Yves Dacosta, Paris, (2003), 317p.
- [131].Frankel, E.N., «The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and beta-carotene in relation to processing of edible oils», Bibliotheca Nutritio et Dieta, Vol 43, (1989), 297-312.
- [132].Sies, H. et Stahl, W., «Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants»,The American Journal of Clinical Nutrition, Vol 62, n°6, (1995), 1315S-1321S.
- [133].Matkowski, A., «Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review», Biotechnology Advances, Vol 26, n° 6, (2008), 548–560.
- [134].Carle, S., «La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! » Pharmactuel, Vol 42, (2009), 6–21.
- [135].Dahiya, P. et Purkayastha, S., «Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates», Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 74, n°5, (2012), 443-450.
- [136].Coates, A.R., Halls, G. et Hu, Y., «Novel classes of antibiotics or more of the same?», British Journal of Pharmacology, Vol 163, n°1, (2011), 184-194.

- [137].Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M.C. et Ayachi, A., «Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle», *Phytothérapie*, Vol 9, (2011), 209-218.
- [138].Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D. et Doumbia, I., «Coulibaly A Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae)», *Journal of Applied Biosciences*, Vol 58, (2012), 4234-4242.
- [139].Masoumian, M. et Zandi, M., «Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria», *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, Vol 19, n°11, (2017), 1-8.
- [140].Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Alvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., Rivas, C.L., Requena, T., Rodríguez, J.M. et Bartolomé, B., «Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria», *Research in Microbiology*, Vol 161, n°5, (2010), 372-82.
- [141].Alves, M.J., Ferreira, I.C., Froufe, H.J., Abreu, R.M., Martins, A., Pintado, M., «Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies», *Journal of Applied Microbiology*, Vol 115, n°2, (2013), 346-357.
- [142].Compean, K.L. et Ynalvez, R.A., «Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review», *Research Journal of Medicinal Plants*, Vol 8, n°5, (2014), 204-213.
- [143].Wu, Y., Bai, J., Zhong, K., Huang, Y., Qi, H., Jiang, Y. et Gao, H., «Antibacterial Activity and Membrane Disruptive Mechanism of 3-p-trans-Coumaroyl-2 hydroxyquinic Acid, a Novel Phenolic Compound from Pine Needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus*», *Molecules*, Vol 21, n°8, (2016), 1-14.
- [144].Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, M.S., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G. et Silva, F.R., «Flavonoids: prospective drug candidates», *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol 8, n°13, (2008), 1429-1440.
- [145].Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. et Shimada, J., «The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action», *FEMS Microbiology Letters*, Vol 237, n°2, (2004), 325-331.

- [146]. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. et Vojnov, A.A., «Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition», *Free Radical Research*, Vol 40, n°2, (2006), 223-231.
- [147]. Eggimann, P., Garbino, J., et Pittet, D., « Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients», *The Lancet Infectious Diseases*, Vol 3, (2003), 685-702.
- [149]. Patterson, T.F., «Advances and challenges in management of invasive mycoses», *Lancet*, Vol 366, n°94900, (2005), 1013-1025.
- [149]. Morgan, J., «Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005», *Current Infectious Diseases Report*, Vol 6, n°7, (2005), 429-439.
- [150]. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., et Stalpers, J.A., « Dictionary of the Fungi», 10th edition CABI, The Netherlands, (2008), 789p.
- [151]. Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E. et Butler, G., « A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis», *BMC Evolutionary Biology*, Vol 6 n°99, (2006), 1-15.
- [152]. Wong, S.S.W., Samaranayake, L.P. et Seneviratne, C.J., «In pursuit of the ideal antifungal agent for *Candida* infections: high-throughput screening of small molecules», *Drug Discovery Today*, Vol 19, n°11, (2014), 1721-1730.
- [153]. Sanguinetti, M., Posteraro, B. et Lass-Flörl, C., «Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact», *Mycoses*, Vol 58, n°2, (2015), 2-13.
- [154]. Teodoro, G.R., Ellepola, K., Seneviratne, C.J. et Koga-Ito, C.Y., «Potential Use of Phenolic Acids as Anti *Candida* Agents: A Review», *Frontiers in Microbiology*, Vol 6, n°1420, (2015), 1-11.

- [155]. Seleem, D., Pardi, V. et Murata, R.M., «Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro», *Archives of Oral Biology*, Vol 76, (2017), 76-83.
- [156]. Zore, G.B., Thakre, A.D., Jadhav, S. et Karuppayil, S.M., «Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle», *Phytomedicine*, Vol 18, n° 13, (2011), 1181-1190.
- [157]. Maoz, M. et Neeman, I., «Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 71, n°3, (2000), 479-482.
- [158]. Chabasse D., Danis M., Guiguen C. et Richard-Lenoble D., «Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales », Association française des enseignants de parasitologie, Anofel, Edition Elsevier Masson, (2007), 321p.
- [159]. Dedet, J.P., «Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique ».EMC, Maladies infectieuses, Vol 8, (2009), 506-510.
- [160]. Dedet, J.P., «Current status of epidemiology of leishmaniasis» in «Leishmania». Farrell J.P. Edition Springer US, Word class parasites, Vol 4, (2002), 193p.
- [161]. Baker, J.R., Muller, R. et Rollinson, D., «Advances in Parasitology», Edition Elsevier, Vol 64, (2007), 476p.
- [162]. Guillaume, V., «Parasitologie sanguine ». Edition De Boeck, (2009), 200p.
- [163]. Bessis D., Francès C., Guillot B. et Guilhou J.J., «Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques », *Dermatologie et Médecine*, Edition Springer, Paris, Vol 2, (2008), 400p.
- [164]. Kumar A., «Leishmania and Leishmaniasis», *Biomedicine: Immunology*, 1st Edition Springer, (2013), 83p.
- [165]. Carré, N., Collot, M., Guillard, P., Horellou, M. et Gangneux, J.P., «La leishmaniose viscérale Epidemiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie», *Journal de Pharmacie Clinique*, Vol 29, n°3, (2010), 121-148.

- [166]. Handman, E., «Leishmaniasis: Current status of vaccine development», *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 14, n°2, (2001), 229-243.
- [167]. Kevric, I., Cappel, M.A. et Keeling, J.H., «New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review», *Dermatologic Clinics*, Vol 33, n°3, (2015), 579-593.
- [168]. Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, J.P., «*Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria», *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol 90, n°6, (1996), 625-629.
- [169]. Fendri, A.H., Beldjoudi, W., Ahraou, S. et Djaballah, M., «Les leishmanioses diagnostiquées au CHU Benbadis de Constantine (Algérie) : Bilan de cinq années (2006-2010) », *Bulletin de la société de pathologie exotique* Vol 105, (2012), 46-48.
- [170]. Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J.A. et Dedet, J.P., «Geographical distribution and epidemiological features of Old World Leishmaniasis foci based on the isozymes analysis of 1048 strains», *Tropical Medicine and International Health*, Vol 140, n°4, (2009), 423-434.
- [171]. Harrat, Z., Boubidi, S.C., Pratlong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J.P., Ravel, C. et Belkaid, M., «Description of *Leishmania* close to *L.killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria», *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol 103, (2009), 716-720.
- [172]. Adel, A., Boughoufalah A., Saegerman C., De Deken R., Bouchene Z., Soukehal A., Berkvens D. et Boelaert M., «Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update», *Pols one*, Vol 20, n°6, (2014), e99207.
- [173]. Kedzierski, L., «Leishmaniasis Vaccine: Where are we today? », *Journal of Global Infectious Diseases*, Vol 2, n°2, (2010), 177-185.
- [174]. Singh, O.P., Singh, B., Chakravarty, J. et Sundar, S., «Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective», *Infectious Diseases of Poverty*, Vol 5, n° 19, (2016), 1-15.

[175].Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Oury, B., Moulti-Mati, F., Harrat, Z. et Sereno, D., «*Leishmania* antimony resistance/ susceptibility in Algeria foci», Open Journal of Tropical Medecine, Vol 1, n° 1, (2017), 024-032.

[176].Mokoka, T.A., Peter, X.K., Fouche, G., Moodley, N., Adams, M., Hamburger, M., Kaiser, M., Brun, R., Maharaj, V. et Koorbanally, N., «Antileishmanial activity of 12-methoxycarnosic acid from *Salvia repens* Burch. ex Benth. (Lamiaceae) », South African Journal of Botany, Vol 90, (2014), 93-95.

[177]. Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. et Foo, L.Y.,. «Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages in vitro», Planta Medica, Vol 67, n°9, (2001), 825-832.

[178]. Da Silva Filho, A.A., Resende, D.O., Fukui, M.J., Santos, F.F., Pauletti, P.M., Cunha, W.R., Silva, M.L.A., Gregório, L.E., Bastos, J.K., Nanayakkara, N.P.D., «*In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) », Fitoterapia, Vol 80, (2009), 478-482.

[179].Grecco, S.S., Reimão, J.Q., Tempone, A.G., Sartorelli, P., Romoff, P., Ferreira, M.J., Fávero, O.A. et Lago, J.H., «Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae)», Parasitology Research, Vol 106, n°5, (2010), 1245-1248.

[180].Patil, M.S., Patil, R.S., Kshirsagar, S.S., Chaudhari, P.S., Bayas, J.P., Oswal, R.J., «Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: A Review», World Journal Public Health Sciences, Vol 1, n°1, (2012), 7-22.

[181].Da Silva, E.R. ,Do Carmo Maquiaveli, C. et Magalhães, P.P., «The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase», Experimental Parasitology, Vol 130, n°3, (2012),183-188.

[182].Glaser, J., Schultheis, M., Hazra, S., Hazra, B., Moll, H., Schurig, U. et Holzgrabe, U.,. «Antileishmanial lead structures from nature: analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic Acid bornyl ester», Molecules, Vol 19, n° 2, (2014), 1394-410.

- [183]. Derache R. 1986. « Toxicologie et sécurité des aliments », Edition Lavoisier, (1986), 594p.
- [184]. Reichel, J., Benecke, N., Eckert, K.G., Erber, B., Golly, I.C., Kreppel, H., Liebel, B., Mukte, H., Szinicz, L. et Zilker, T., « Guide pratique de toxicologie ». Edition DeBoeck, (2004), 348p.
- [185]. Viala A. et Botta A., « Toxicologie », 2^{ème} Edition Lavoisier, (2007), 1096p.
- [186]. Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G. et Said, O., « Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-Based Complement». *Alternative Medicine*, Vol 3, n°4, (2006), 433-439.
- [187]. Lapointe, G., « Notions de Toxicologie. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec », 2^{ème} Edition revue et augmentée, Québec, (2004), 67 p.
- [188]. Wallace Hayes, A., « Principal and methods of toxicology». Edition Tayer & Francis, New York, (2008), 1134p.
- [189]. Lechat, P., Calvo, F., De Crémoux, P., Giroud, J.P., Lagier, G., Lechat, P.H., Rouveix, B. et Weber L., « Pharmacologie médicale» Edition Masson, (1990), 717p.
- [190]. Wepierre, J., « Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire », Edition Masson, Paris, (1981), 203p.
- [191]. OCDE., « Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme ». In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, OCDE, Paris, Vol 1, n°4, (1979), 1-15.
- [192]. Kojima, K., «Biological evaluation and regulation of medical devices» in Japan in *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, (2012), 404-448.
- [193]. Ramade, F., « Ecotoxicologie», Edition Masson, Paris, (1979), 228p.
- [194]. Baynes, R.E. et Hodgson, E., «Absorption and distribution of toxicants», *Textbook of modern toxicology*, Vol 4, (2010), 79-114.

- [195]. Mellah, A., «Application pratique de l'anatomie humaine : viscère, tronc», Tome I Edition Publibook Vol 1, (2010), 255 p.
- [196]. Flamment, M. et Foufelle, F., «Importance of phospholipids in ER stress and fatty liver disease», médecine/sciences (Paris), Vol 28, n°1, (2012), 13-15.
- [197]. Scoazec, J.Y., «La mort des cellules hépatiques», Hépto-Gastro & Oncologie Digestive, (2000), Vol, 4, n°1, 45-57.
- [198]. Frank, C. L., « Toxicologie, données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque », Edition Masson, (1992), 360p.
- [199]. Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A. et Heath, J.W., «Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater», 2eme Edition DeBoeck, (2008), 437p.
- [200]. Sherwood, L., «Physiologie humaine», 3^{ème} Édition De Boeck, Bruxelles, (2015), 750p.
- [201]. Fogo, A.B., Lusco, M.A., Najafian, B. et Alpers, C.E., «AJKD Atlas of Renal Pathology: Cortical Necrosis», American Journal of Kidney Diseases, Vol 67, n°5, (2016), e27-e28.
- [202]. Richet, G., «Néphrologie», Edition Ellipses Marketing, (1988), 399p.
- [203]. Martin, E.C., McGuigan, M.A., MacGregor Whyte, I., Dawson, A.H., Seifert, S.A., Schonwald, S., Yip, L., Keyes, D.C., Hurlbut, K.M., Erdman, A.R. et Dart, R.C., «Medical Toxicology», 3rd Edition Lippincott Williams & Wilkins, (2004), 1914p.
- [204]. Bouhassira, D. et Calvino, B., «Douleur, Physiologie, physiopathologie et pharmacologie», Edition De Boeck, (2009), 384p.
- [205]. Holdcroft, A. et Jaggar, S., «Core topics in pain», Cambridge University Press, 2005, 359p.
- [206]. Regnault, J.P., « Immunologie générale », 5^{ème} Edition Décarie, (1992), 470p.
- [207]. Stevens, A., Lowe, J.S. et Young, B., «Anatomie pathologique », Atlas de Wheater, 4^{ème} Edition De Boeck, Bruxelles, (2004), 295p.

- [208]. Newton, K. et Dixit, V.M., «Signaling in innate immunity and inflammation», Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Vol 4, (2102), 1-19.
- [209].Russo-Marie, F., Peltier, A. et Polla, B.S., « L'inflammation », Edition John Libbey Eurotext, Paris, (1998), 565 p.
- [210].Weill, B. et Batteux , F., «Immunopathologie et réactions inflammatoires», Edition De Boeck, Bruxelles, (2003), 310 p.
- [211].Pieri, F. et Kirkiacharian, S., «Pharmacologie et Thérapeutique», 2eme Edition ellipse Marketing, Paris, (1992), 443p.
- [212].Barnes, P.J., «Anti-inflammatory actions of Glucocorticoids : molecular mechanisms», Clinical Science, Vol 94, n°2, (1998), 557-572.
- [213].Ricciotti, E., et Fitzgerald, G.A., «Prostaglandins and inflammation», Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology, Vol 31, n° 15, (2011), 986-1000.
- [214].Blandizzi, C., Tuccori, M., Colucci, R., Fornai, M., Antonioli, L., Ghisu, N. et Del Tacca, M., «Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy», Pharmacological Research, Vol 59, n° 2, (2009), 90-100.
- [215].Gambaro, G. et Perazella, M.A., «Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors», Journal of Internal Medicine, Vol 253, n°6, (2003), 643–652.
- [216].Khalil, N.M., Sperotto, J.S. et Manfron, M.P., «Antiinflammatory activity and acute toxicity of *Dodonaea viscosa*», Fitoterapia, Vol 77, (2006), 478-480.
- [217].Ghasemian, M., Owlia, S. et Bagher Owlia, M., «Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines», Advances in Pharmacological Sciences, Vol 2016, (2016), 1-11.
- [218].Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V. et Kohli, K., «Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review», Inflammation & Allergy Drug Targets, Vol 8, n°3, (2009), 229-235.
- [219].Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L.A. et Hameed, S., «Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids», Advances in Pharmacological Sciences, Vol 2015, (2015), 1-10.

[220].Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P., and Basilio Heredia, J., «Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review», Cogent Food & Agriculture, Vol 2, (2016), 1-14.

[221].Guichet, J.L., «Douleur animale, douleur humaine Données scientifiques, perspectives anthropologiques, questions éthiques», Editions Quæ, Versailles, France, (2010), 216p.

[222].Loriot, Y. et Mordant, P., «Cancérologie», Edition Elsevier /Masson, (2011), 551p.

[223].Sholtis Brunner, L., Smeltzer, S., Bare, B. et Smith Suddarth, D., «soins infirmier en médecine et en chirurgie, Généralités», 5^{ème} Edition De Boeck, Vol 1, (2011), 700p.

[224].Basbaum, Al. et Jessell, T. «The Perception of Pain», In: Kandel, ER.; Schwartz, J.; Jessell, T., Editors Principles of Neuroscience. New York: Appleton and Lange; (2000) 472-491pp.

[225].Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. et Julius, D., «Cellular and Molecular Mechanisms of Pain», National Institute of Health Publish Access, Vol 139, n°2, (2009), 267-284.

[226]. Besson, J. M., « The neurobiology of pain», Lancet, Vol 353, n°9164, (1999), 1610-1615.

[227].Vibes, J., «Guide de la douleur: le syndrome douloureux chronique», Edition Estem, Paris, (2001), 526 p.

[228].Dubin, A.E. et Patapoutian, A., «Nociceptors: the sensors of the pain pathway. Review series», Journal of Clinical Investigation, Vol 120, n°11, (2010), 3760-3772.

[229]. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A.S. et White, L., «Neuroscience», 5th edition Sinauer Associates, Incorporated, (2012), 858 p.

[230]. OMS. World Health Organization., «Cancer Pain Relief: with a guide to opioid availability», 2nd Edition Geneva: World Health Organization, (1996).

[231]. Girot, R., Bégué, P. et Galacteros, F., «La drépanocytose», Edition John Libbey, Paris (2003), 336p.

[232]. Stora, N., «Pharmacologie et thérapeutique», 2^{ème} édition Lamarre, Wolters Kluwar, France (2013), 240p.

[233]. Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P. et Ardenghi, P., «Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats», International Scholarly Research Network Pharmacology, Vol 2011, (2011), 1-6.

[234]. Han, T., Li, H.L., Zhang, Q.Z., Han, P., Zheng, H.C., Rahman, K. et Qin, L.P., «Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L. » Phytomedicine, Vo 14, n° 12, (2007), 825-829.

[235]. Yao, H.M., Wang, G., Liu, Y.P., Rong, M.Q., Shen, C.B., Yan, X.W., Luo, X.D. et Lai, R., «Phenolic acids isolated from the fungus *Schizophyllum commune* exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels», Chinese Journal of Natural Medicines, Vol 14, n°9, (2016), 661-670.

[236]. Verri, W.A., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, R.D.R., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Fonseca, M.J.V. et Casagrande, R., «Chapter 9 - Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms», Studies in Natural Products Chemistry, Vol 36, (2012), 297-330.

[237]. Xiao, X., Wang, X., Gui, X., Chen, L., Huang, B., «Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review», Chemistry & Biodiversity, Vol 13, n°11, (2016), 1427-1440.

[238]. O'Grady, N.P., Barie, P.S., Bartlett, J.G., Bleck, T., Carroll, K., Khalil, A.C., Linden, P., Maki, D.G., Nierman, D., Pasculle, W., et Masur, H., «Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients»: 2008 update from the American College of Critical Care Medicine and the Infectious Diseases Society of America. Critical Care Medicine, Vol 36, n°4, (2008), 1330-1349.

[239]. Karakitsos, D. et Karabinis, A., «Hypothermia therapy after traumatic brain injury in children», The New England Journal of Medicine, Vol 359, n°11, (2008), 1179-1180.

[240]. Parry, E., Godfrey, R., Mabey, D. et Gill, G., «Principles of medicine in Africa», 3rd edition Cambridge University Press, (2004), 1442 p.

[241]. Mandell, G.L., Bennett, J.E. et Dolin, R., «Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious disease», 6th edition Elsevier Churchill Livingstone, Vol 1, (2005), 3661p.

[242]. Tortora, G.J. et Derrickson, B., «Manuel d'anatomie et de physiologie humaine», 2^{ème} Edition De boeck, (2017), 824p.

[243]. Martin, C., Riou, B. et Vallet B., «Physiologie humaine appliquée», 2^{ème} édition Arnette, John Libbey Eurotext, Paris, (2017), 900p.

[244]. Haslett, C., Chilves, E.R., Boon, N.A. et Colledge, N.R., «Davidson's principle and practise of medicine», 19th edition Churchill Livingstone Elsevier, (2002), 1274p.

[245]. Walter, F.B., «Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach», Edition Elsevier/ Saunders, (2003), 1319 p.

[246]. Turrin, N.P. et Rivest, S., «Unravelling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems», Experimental Biology and Medicine, Vol 229, n° 10, (2004), 996-1006.

[247]. Walter, E.J., Hanna-Jumma, S., Carraretto, M. et Forni, L., «The pathophysiological basis and consequences of fever, Review», Critical Care, Vol 20, n°1, (2016), 1-10.

[248]. Plaisance, K.I. et Mackowiak, P.A., « Antipyretic therapy, physiologic rationale, diagnostic implications and clinical consequences», Archives of Internal Medicine, Vol 160, n°4, (2000), 449-456.

[249]. Kirkiacharian, S., « Guide de chimie médicinale et médicaments conception », structure, synthèse pharmacochimie, mode d'action et activité des médicaments. Edition Tec& Doc ,Lavoisier, Paris (2010), 868p.

[250]. Sultana, S., Asif, H.M., Akhtar, N. et Ahmad, K., «Medicinal plants with potential antipyretic activity: A review», Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Vol 5, n°1, (2015), 202-208.

[251].Shanmugam, S., Murugaiyan, I., dos Santos Lima, B., Russo Serafini, M., Antunes de Souza Araújo, A., Narain, N., Quintans-Júnior, L.J. et Thangaraj, P., «HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties», Arabian Journal of Chemistry (2016) xxx, xxx–xxx <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.008>

[252].Gupta, M., Shaw, B.P. et Mukherjee, A., «A new glycosidic flavonoid from Jwarhar mahakashay (antipyretic) Ayurvedic preparation», International Journal of Ayurveda Research, Vol 1, n°2, (2010),106-111.

[253].Gupta, M., Banerjee, D. et Mukherjee, A., «Evaluation of analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of methanol extract of traditional herbal medicine using rodents», Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, Vol 5, n°6, (2013), 106-113.

[254].Prat, R., « Expérimentation en biologie et physiologie végétale : 300 manipulations », Edition. Herman QUAÉ, Paris, (2007), 296p.

[255]. Pharmacopée Caribéenne., «Pharmacopée Européenne», 1er Edition, France, (1999), 493p.

[256]. William, B.J., « The original of soxhlet extractor», Journal of Chemical Education., Vol 84, n°6, (2007), 1913-1915.

[257]. Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Taip, F., Ganjloo, A., Salleh, Selamat, J., Hamid, A. et Zaidu, I., «Comparaison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata*) L. leaves», Food and Bioproducts processing, Vol 89, n°1, (2011), 67-72.

[258]. Davis, H., « Bentley's text book of pharmaceuticals », 6th Edition, (1956), 1078p.

[259]. Büyükbalci, A., et Neihir, E.L.S., «Determination of In vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas». Plant Foods Human. Nutr, Vol 63, n°1, (2008, 27-33.

[260]. Carrée, P., « Précis de technologie et de chimie industrielle », Edition Balliere, Paris, (1953), 475p.

- [261]. Alilou, H., Bencharki, B., Hassani, L.M. I., Barka, N., «Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus*», Afrique SCIENCE, Vol 10, n°3, (2014), 316-328.
- [262]. Sofowora, A., «Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Edition Karthala», Paris, 384p.
- [263]. Paris, R. R. et Moyse, H., « Matière médicale. Collection de précis de pharmacie », 2^{ème} Edition Masson, Tome II, Paris, (1969). 518p.
- [264]. Houghton, P., J. et Raman, A., « Laboratory handbook for fractionation of natural extracts». Edition Springer, 1998, 199p.
- [265]. Diallo, A., « Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd », Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, Mali, (2005), 99 p.
- [266]. Pharmacopée URSS, Tome II, 11^{ème} édition, Moscou, (1991), 250 p.
- [267]. Trease, E. et Evans, W.C., «Pharmacognosy», 13th Edition Bailliere Tindall London, (1989), 832p.
- [268]. Judith, M.D., «Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad», Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, Mali, (2005), 135p.
- [269]. Togola, A., «Etude de la phytochimie et de l'activité anti-paludique de *Alchornea cordifolia* Schmach», Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, Mali, (2002), 100 p.
- [270]. Dohou, N., Yamini, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A. et Gmira, N., «Screening Phytochimique D'une Endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea Lythroides*», Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux , Vol 142, (2003), 61-78.
- [271]. Singleton, V.L. et Rossi, J.A., «Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents», American Journal of Enology Viticulture, Vol 16, (1965), 144-158.

[272]. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, G., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., et Pinkas, M., «Oxygen species scavenging activity of Phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations». *Arzneimittelforschung Drug Research*, Vol 46, n°11, (1996), 1086-1089.

[273]. Martin, P. P., Gagnard, J., Gautier, P. et Drouineau, G., «L'analyse végétale dans le contrôle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales » Edition Tec&Doc, Lavoisier, Paris, (1984), 810p.

[274]. Salgorolo, P., «Pratique des manipulations de chimie à l'usage des biologistes », Edition Tec&Doc, Lavoisier, Paris, (2003), 363p.

[275]. Ducauze, M., «Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie, Concept, Démarche et méthodes», Edition Tec&Doc, Lavoisier, Paris, (2014), 366p.

[276].Corradini, D., Eksteen, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. et Miller, N., «Handbook of HPLC, Chromatographic science», 2nd Edition CRC Press, New York, Vol 78,(1998), 1008p.

[277].Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., Law, L.K., Lit, L.C.W., Ng, K.F., Suen, M.W.M. et Tai, H.L., «Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications», *The Clinical Biochemist Reviews*, Vol 24, n°1, (2003), 3-12.

[278].Banerjee, S. et Mazumdar, S., «Electrospray IonizationMass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond theMolecularWeight of the Analyte», *International Journal of Analytical Chemistry*, Vol 2012, (2012), 1-40.

[279].Bolbach, G., «La detection des ions en spectrometrie de masse», XXIemes Rencontres Club Jeune de Spectrométrie de Masse, Ecole de Printemps de la Société Française de Spectrométrie de Masse 21-25 Mars 2016, Moustiers-Ste Marie, (2016), 72p.

[280].Molyneux, P., «The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl DPPH for estimating antioxidant activity», *Songklanakarin Journal of Sciences Technology*, Vol 26, (2004), 211-219.

- [281].Al-Reza, S. M., Ahman, A., Lee, J., et ChulKang, S., «Potentiel roles of essential oil and organic extracts of *Zizyfus jujuba*», Food Chemistry, Vol 119, (2010), 981-986.
- [282].Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. et Saura-Calixto F., «A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols», Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol 76, (1998), 270-276.
- [283].Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S. et Leitão, S.G., «Screening of Brazilian plant extracts for antioydan activity by the use of DPPH free radical method», Phytotherapy Research, Vol 15, n°2, (2001), 127-130.
- [284].Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A., et Pegg, R., «Rree radical scavenging capacity: antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*) », Food Chemistry, Vol 121, (2010), 705-711.
- [285].Oyaizu, M., «Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine», Japanese Journal of Nutrition, Vol 44, (1986), 307-315.
- [286].Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C. et Abdelly, C., «Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents», Food Chemical Toxicology, Vol 47, (2009), 2083- 2091.
- [287].Hayes, A. et Markovic, B., «Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* Part 1antimicrobial activity and invitro cytotoxicity», Food and Chemical Toxicology, Vol 40, n° 4, (2002), 949-964.
- [288].Bauer, S.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. et Thurck, M., « Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method», American Journal of Pathology, Vol 45, (1966), 493-496.
- [289].Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumou C. et Bougoudogo F. « Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au mali», Mali Médical, T XXI n° 1, (2006),18-23.

- [290].Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. et Bollet., « Précis de bactériologie clinique », Edition ESKA, Paris, (2002), 565p.
- [291].Kumar, M., Agarwala, R., Deyb, K., Raib, V. et Johnsonc, B., «Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* Retz. On Gram positive and Gram negative Microorganisms», International Journal of Current Pharmaceutical Research, Vol 1, n°1, (2009), 56-60.
- [292].Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C. et Rouba, S.I., «Antimicrobial activity of essential oil of the native microflora of organic Swiss chard», Food Science and Technology, 36, (2003), 679-684.
- [293].Carović-Stanko, K., Orlić, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z., «Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa», Food Chemistry, Vol 119, (2010), 196–201.
- [294].Andrews, J.M., «Determination of minimum inhibitory concentrations», Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol 48, (2001), 5-16.
- [295].Kouadio, N.J., Guessennd, N.K, Kone, M.W., Moussa, B., Koffi, Y.M., Guede, K.B., Yao, K., Bakayoko, A., Tra Bi, H.F. et Dosso, M., « Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel). Mull-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique », International Journal of Biological and Chemical Sciences, Vol 9, n°3, (2015), 1252-1262.
- [296].Fauchère, J.L. et Avril, J.L., « Bactériologie générale et médicale », Edition Ellipses marketing, Tome I, Paris, (2002), 365 p.
- [297].Oussou, K.R., « Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne », European Journal of Scientific Research, Vol 24, n°1, (2008), 94-103.
- [298]. Ponte-Sucre, A., Diaz, E., Padrón-Nieves, M., 2012. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms. Edition Springer-Verlag Wien. 462p.
- [299]. Strober, W. «Trypan blue exclusion test of cell viability», Current Protocols in Immunology, (2001); appendix 3: appendix B.

[300].Sereno D. et Lemesre J.L., «Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis in vitro*», Parasitology Research, Vol 88, n°4, (1997), 401-403.

[301].Ribeiro, T.G., Nascimento, A.M., Henriques, B.O., Chávez-Fumagalli, M.A., Franca, J.R., Duarte, M.C., Lage, P.S., Andrade, P.H., Lage, D.P., Rodrigues, L.B., Costa, L.E., Martins, V.T., Faraco, A.A., Coelho, E.A. et Castilho, R.O., «Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds», Journal of Ethnopharmacology, (2015), Vol 165, 238-242.

[302].Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. L. et Cloos, J., «Cell sensitivity assays: the MTT assay», Methods in Molecular Biology, Vol 731, (2011), 237-245.

[303].Kauffmann, C., Ethur, E.M., Buhl, B., Scheibel, T., Machado, G.M. C., et Cavalheiro, M.M.C., Potential Antileishmanial Activity of Essential Oils of Native Species from Southern Brazil, Environment and Natural Resources Research, Vol 6, N°4, (2016), 18-25.

[304].Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., «Cell viability assays» In: Sittampalam GS G-EN, Arkin M, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD), USA: Eli Lilly & Co and National Centre for Advancing Translational Sciences, (2016), 1-35.

[305].Gebre-Hiwot, A., Tadesse, G., Croft, S.L. et Frommel, D., «An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1», Acta Tropica, Vol 51, (1992), 237-245.

[306].Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A. et Shah, A., «In-Vitro Cytotoxicity Activity Of *Solanum Nigrum* Extract Against Hela Cell Line And Vero Cell Line», International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 1, (2009), 38-46.

[307].Ogeto, T.K., Odhiambo, R.A., Shivairo, R.S., Muleke, C.I., Osero, B.O., Anjili, C., Ingonga, J.M., Osuga, I.M., «Antileishmanial activity of *Aloe Secundiflora* plant extracts against *Leishmania Major*», Advances in Life Science and Technology, Vol.13, (2013), 9-17.

- [308].Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Garcia Cortez, D.A. et Nakamura, C.V., «Studies on the Effectiveness of *Tanacetum parthenium* Against *Leishmania amazonensis*», *Acta Protozoologica*, Vol 44, n° 3, (2005), 245-251.
- [309].Speit, G. et Hartmann, A., «The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*», Vol 314, (2006), 275-286.
- [310].Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. et Sasaki, Y.F., «Single cell gel/Cornet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing *Environmental and Molecular Mutagenesis*», Vol 35, (2000), 206-221.
- [311].Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. et Schneider, E.L., «A simple technique for quantification of low levels of DNA Damage in individual cells. *Experimental Cell Research*», Vol 175, (1988), 184-191.
- [312].Patel, S.B., Rao, J.N. et Hingorani, L.L., «Safety assessment of *Withania somnifera* extract standazdized for Withaferin A: Acute and sub-actue toxicity study», *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, Vol 7, n°1, (2016), 30-37.
- [313].Costa-Silva, J.H., Lima, C.R., Silva, E.J.R., Araujo, A.V., Fraga, M.C.C.A., Ribeiro, A., Arruda, A.C., Lafayette, S.S.L. et Wanderley, A.G., «Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliceae) seed oil», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 116, (2008), 495–500.
- [314].Atsamo, A.D., Nguenefack, T.B., Datté, J.Y. et Kamanyi, A., «Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 134, (2011), 697–702.
- [315].Silva, E.J.R., Gonçalves, E.S., Aguiar, F., Evencio, L.B., Lyra, M.M.A., Coelho, M.C.O.C., Fraga, M.C.C.A. et Wanderley, A.G., «Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. », *Phytotherapy Research*, Vol 21, (2007), 332–336.
- [316].Musa, A.H., Kumar Vata, P., Gebru, G., Mekonnen, Y., Debella, A. et Makonnen, E., «Biochemical and hematological study on butznol fraction of leaves of

Moringa Stenopetala in Experimental rats», *IOSR Journal Of Pharmacy*, Vol 6, n° 5, (2016), 2319-4219.

[317].Mcmanus, J.G.A. et Mowry, R.W., *Staining Methods: «Histological and Histochemical»*, Harper and Row: New York, NY, USA, (1984), 1009 p.

[318].Gabe, M., «Techniques histologiques», Edition Masson et Cie, Paris, (1968), 1113p.

[319].Maruyama, N., ishibashi, H., hu, W., morofuji, S., Inouye, S., yamaguchi, H. et Abe, S, «Suppression of Carrageenan and Collagen II-Induced Inflammation in Mice by Geranium Oil », *Mediators of Inflammation*, Vol 62537, n°3, (2006), 1-7.

[320].Winter, C.A., Risley, E.Q. et Nuss, G.W., «Carrageenan-induced edema in hind paws of rat as an assay for anti-inflammatory drugs», *Progress Society Biological Medecine*, Vol 11, (1962), 544-547.

[321].Cheng, J., Ma, T., Liu, W., Wang, H., Jiang, J., Wei, Y., Tian, H., Zou, N., Zhu, Y., Shi, H., Cheng, X. et Wang, C., «In vivo evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of compound Muniziqi granule in experimental animal models», *BMC Complementary and Alternetive Medecine*, Vol 16, n° 20, (2016), 1-10.

[322].Bagad, A.S., Joseph, J.A., Bhaskaran, N. et Agarwal, A., «Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of *Curcuma longa*», *Advances in Pharmacological Sciences*, Vol 2013, (2013), 1-7.

[323].Hosseinzadeh, H., Ramezani, M. et Salmani, G.A., «Antinociceptive , anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol73, (2000), 379-385.

[324].Dkhil, M., Abdel-Baki, A., Al-Quraishi, S., Al-Khalifa, S. et Parveen, Z., «Antiinflammatory activity of the venom from samsun ants *Pachycondyla sennarenis*», *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol 4, (2010), 115-118.

[325].Koster, R., Anderson, M. et De Beer, E.J., «Acetic acid for analgesic screening», Federation Proceedings, Vol 18, (1959), 412-417.

[326].Eidi, A., Oryan, S., Zarighalam, J. et Rad, M., «Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aerial parts of *Artemisia dracunculus* in mice», Pharmaceutical Journal of Biology, Vol 54, n°3, (2015), 549-554.

[327].Kolhe, A.M. et Kale, A., «Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activity of leukotriene receptor antagonist-montelukast: An experimental study, National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology, Vol 7, n°1, (2017), 32-37.

[328].Asongalem, E.A., Foyet, H.S., Ekobo, S., Dimo, T. et Kamtchouing, P., «Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson», Journal of Ethnopharmacology, Vol 95, (2004), 63 68.

[329].Sengar, N., Joshi, A., Prasad, S.K. et Hemalatha S., «Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*», Journal of Ethnopharmacology, Vol 160, (2015), 140-148.

[330].Karimulla, S., Kumar, D. et Bag, A.K., «Antipyretic activity of methanol extract of *Sorghum vulgare* L. leaves on brewer's yeast induced pyrexia in wistar rats», International Journal of Phytopharmacology, Vol 6, n°4, (2015), 178-180.

[331]. NIKOLAKAKI, A. et CHRISTODOULAKIS, N.S., «Leaf structure and cytochemical investigation of secretory tissues in *Inula viscosa*», Botanical Journal of the Linnean Society, Vol 144, (2004), 437–448.

[332]. Werker, E. et Fahn, A., « Secretory hairs of *Inula viscosa* – Development, Ultrastructure, and Secretion», Botanical Gazette, 142, (1981), 461-476.

[333].Chebouti-Meziou, N., «Contribution to study of the antimicrobial activity of *Inula viscosa* Harvested in Boumerdes (Algeria) », Journal of Advances Chemical Engineering and Biological Sciences, Vol 3, 2016, 159-162.

- [334].Orhan, N., Gökbulut, A. et Deliorman Orhan, D., «Antioxidant potential and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects of five *Inula* species and their major compounds», *South African Journal of Botany*, Vol 111, (2017), 86–92.
- [335].Laghrifi, K., El Idrissi, M., Makoudi, Y. et Alnamer, R., «*In Vitro* Antibacterial Activity of The Methanolic And Ethanolic Extract Of *Inula Viscosa* Used In Moroccan Traditional Medicine», *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 2, n°5, (2013), 3963-3976.
- [336].Salim, H., Rimawi, W.H. et Mjahed, A., «Analysis of extracts from Palestinian *Inula viscosa* for their phenolic, flavonoid and lipid contents, antioxidant and antibacterial activity», *Journal of Chemistry and Biochemistry*, Vol 5, n°1, (2017), 12-23.
- [337].Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. et Mussatto, S.I., «Selection of the Solvent and Extraction Conditions for Maximum Recovery of Antioxidant Phenolic Compounds from Coffee Silverskin», *Food and Bioprocess Technology*, Vol 7, n° 5, (2014), 1322–1332.
- [338].Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S. et Ju, Y.H., «Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*», *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol 22, n°3, (2014), 296-302.
- [339].Khalil, E.A., Afifi, F.U. et Al-Hussaini, M., «Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*)», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 109 (2007) 104-112.
- [340].Abuhamdah, S., Abuhamdah, R., Al-Olimat, S. et Chazot, P., «Phytochemical investigations and antibacterial activity of selected medicinal plants from Jordan» *European Journal of Medicinal Plants*, Vol 3, n°3, (2013), 394-404.
- [341].Kumar, S. et Pandey, A.K., «Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview», *The ScientificWorld Journal*, Vol 2013, (2013), 1-16.

[342].Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F. et Romani, A., «Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins», *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol 8, n°12, (2008), 1179-1187.

[343].Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L. et Opletal, L., «Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health», *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol 8, n°5, (2008), 436-447.

[344].Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L. et Uriarte, E., «Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity», *Current Medicinal Chemistry*, Vol 12, (2005), 887-916.

[345].Sparg, S.G., Light, M.E. et Van Staden, J., «Biological activities and distribution of plant saponins», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 94, (2004), 219-243.

[346].Silva, N.C.C. et Fernandes, J.A., «Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity», *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Vol 16, n° 3, (2010), 402-413.

[347].De las Heras, B. et Hortelano, S., «Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids», *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, Vol 8, n°1, (2009), 28-39.

[348].Abu-Qatouseh, L.F., Boutennoune, H., Boussof, L., Madani, K., Shihab, P. et Al-Qaoud, K., «In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to urease inhibitory effects of polyphenolic extracts of local herbs from Algeria», *The International Arabic Journal Of Antimicrobial Agents*, Vol 3, n° 4, (2013), 1-9.

[349].Chahmi, N., Anissi, J., Jennan, S., Farah, A., Sendide, K. et El Hassouni, M., «Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco», *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol 5, n°3, (2015), 228-233.

[350].Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. et Abdelly, C., «Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*», *Journal of Taibah University for Science*, Vol 8, (2014), 216–224.

[351].Ribereau-Gayon, P., «Les composés phénoliques des végétaux», Edition Dunaud, Paris, (1964), 254p.

[352].Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. et Lee, C.Y., «Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine», *Food Chemistry*, Vol 51, (2003), 7292-7295.

[353].Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C., «Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities», *Comptes Rendus Biologies*, Vol 331, (2008), 372–379.

[354].Clifford, M.N., Johnston, K. L., Knight, S. Et Kuhnert, N., «Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 51, n°10, (2003), 2900-2911.

[355].Clifford, M.N., Knight, S. et Kuhnert, N., «Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS⁽ⁿ⁾», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 53, n°10, (2005), 3821-3832.

[356]. Clifford, M. N., Wu, W., Kirkpatrick, J. et Kuhnert, N., «Profiling the Chlorogenic Acids and Other Caffeic Acid Derivatives of Herbal Chrysanthemum by LC-MSⁿ », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 55, n°3, (2007), 929-936.

[357]. Abu-Lafi, S., Akkawi, M., Abu-Remeleh, Q., Jaber, S., Qutob M., Lutgen, P., «Pure Isolates and Preparative HPLC Fractions or Crude Extract of *Inula viscosa*: Effect on β -hematin Inhibition *in vitro*», *Pharmacy and Pharmacology International Journal*, Vol 6, n°1, (2018), 00145, 1-5.

[358].Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B., Santos-Buelga, C. et Ferreira, I.C., «Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction», *Food Chemistry*, Vol 141, n°4, (2013),4152-4160.

[359].Khallouki, F., Sellam,K., Koyun, R., Ricarte, I., Alem, C., Elrhaffari, L. et Owen, R.W., «Phytoconstituents and *in vitro* Evaluation of Antioxidant Capacities of *Cotula Cinerea* (Morocco) Methanol Extracts», *Records of Natural Products*, Vol 9, n°4 (2015), 572-575.

- [360].Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. et Quetin-Leclercq, J., «Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry», *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, Vol 12, n°6, (2001), 707-715.
- [361].Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C. et Santos-Buelga, C., «Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal», *Food and Chemical Toxicology*, Vol 50, n°5, (2012), 1576-1582.
- [362].Simirgiotis, M.J., Benites, J., Areche, C. et Sepúlveda, B., «Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS», *Molecules*, Vol 20, n°6, (2015), 11490-11507.
- [363].Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. et Mérillon, J.M., «Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 57, n°5, (2009), 1768–1774.
- [364].Karadag, A., Ozcelik, A. et Saner, S., «Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities» *Food Analytical Methods*, Vol 2, (2009), 41–60.
- [365].Alam, N.Md., Nusrat Jahan Bristi,N.J. et Rafiquzzaman, Md. «Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity» *Saudi Pharmaceutical Journal* , Vol 21, (2013), 143–152.
- [366].Bondet, V., Brand-Williams, W.,et Berset, C., «Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method», *Lebensm-Wiss. U-Technol*, Vol 30, (1997), 609-615.
- [367].Koleva, K.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot A. et Evstatieva, L.N., «Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods», *Phytochemical Analysis*, Vol 13, (2002), 8-17.
- [368].Marx, J.L., «Oxygen free radicals linked to many diseases», *Journal of Science*, Vol 235, (1987), 529- 31.

- [369].Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. et Corke, H., «Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer», *Life sciences*, Vol 74, n° 17, (2004), 2157-2184.
- [370].Brewer, M.S., «Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications», *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol 10, n° 4, (2011), 221 - 247.
- [371].Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. et Paganga, G., «Antioxidant properties of phenolic compounds», *Trends in Plant Science*, Vol 2, (1997), 152-159.
- [372].Scherer, R. et Godoy, H.T., «Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl method», *Food chemistry*, Vol 112, n° 3, (2009), 654 - 658.
- [373].El Guide, R., Tahrouche, S., Amri, O., El Mehrach, K. et Hatimie, A., «Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the south of Morocco», *International Journal of New Technology and Research*, Vol 3, (2015), 7-11.
- [374].Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A. et Abdelly, C., «Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes», *Comptes Rendus Biologies*, Vol 331, (2008), 865-873.
- [375].Jun, N.J., Jang, K.C., Kim, S.C., Moon, D.Y., Seong, K.C., Kang, K.H., Tandang, L., Cho, S.K. et Park, K.H., «Radical Scavenging Activity and Content of Cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (*Cynara scolymus* L.)», *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol 50, n° 4, (2007), 244-248.
- [376].Ma, Z., Zheng, S., Han, H., Meng, J., Yang, X., Zeng, S., Zhou, H. et Jiang, H. «The bioactive components of *Coreopsis tinctoria* (Asteraceae) capitula: Antioxidant activity in vitro and profile in rat plasma», *Journal of Functional Foods*, Vol 20 (2016), 575–586.
- [377].Kim, J.Y., Cho, J.Y., Ma, Y.K., Park, K.Y., Lee, S.H., Ham, K.S., Lee, H.J., Park, K.H. et Moon, J.H., « Dicaffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides

from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity», *Food Chemistry*. Vol 125, (2011), 55–62.

[378].Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M. et Kido, R., «Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis», *Phytochemistry*, Vol 36, n°3, (1994), 579-583.

[379].Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., et Fujita, T. «In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 52, (2004), 4893–4898.

[380].Fraise, D., Felgines, C., Texier, O., Lamaison, J.L., «Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the *Asteraceae* Family», *Food and Nutrition Sciences*, Vol 2, n° 3, (2011), 181-192.

[381].Younes, M. et Siegers, C.P., «Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion», *Planta medica*, Vol 43, (1982), 240-244.

[382].Shahidi, F., Janitha, P.K. et Wanasundara, P.D., «Phenolic antioxidants», *Critical reviews in food science & nutrition*, Vol 32, n°1, (1992), 67-103.

[383].Bidie, A.P., N'Guessan, B.B., YAPO, A.F., N'Guessan, J.D., et Djaman, A.J., «Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne», *Sciences & Nature*, Vol 8, n°1,(2011), 1-11.

[384].Lacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L., «Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions», *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol 21, (2008), 589– 598.

[385].Wang,Z., Kang,K.A., Zhang,R., Piao, M.J., Jo, S.H., Kim, J.S., Kang, S.S., Lee, J.S., Park, D.H. et Hyun, J.W., «Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol 29, (2010), 12–18.

[386].Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., Barbria, R., Tebourbi, O. et Ksouri, R., «*Artemisia campestris* phenolic

compounds have antioxidant and antimicrobial activity», *Industrial Crops and Products*, Vol 63 (2014) , 104–113.

[387].Wu, L., «Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of *Flos Lonicerae* extracts», *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Vol 8, n°9, (2007), 673-679.

[388].Hong, S., Joo, T., et Jhoo, J.W., «Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Isolated from *Ligularia fischeri* Leaves», *Food Science and Biotechnology*, Vol 24, n°1, (2015), 257-263.

[389].Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G. et Saso, L., «Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power assay” and cyclic voltammetry», *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1721, (2005), 174– 184.

[390].Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D. et Mimica-Dukić, N., «Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives», *Journal of Functional Foods*, Vol 40, (2018), 68–75.

[391].Schinella G.R., Trounrier, H.A., Prieto, J.M., Mordujovich de Buschiazzo, P. et Rios, J.L., «Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts», *Life Sciences*, Vol 70, n°9, (2002), 1023-1033.

[392].Morel, I., Lescoat, G., Cogel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., and Cillard, J., «Antioxidant And Iron-Chelating Activities Of The Flavonoids Catechin, Quercetin And Diosmetin On Iron-Loaded Rat Hepatocyte Cultures», *Biochemical Pharmacology*, Vol 45, No 1, (1993), 13-19.

[393].Alexieva, I., Mihaylova, D. et Popova, A., «Evaluation of the antioxidant capacity of aqueous extracts of fresh samardala (*Allium bulgaricum* L.) leaves», *Journal of Food Sciences Engineering and Technology*, Vol LX, (2013), 826- 831.

[394].Laghrifi, K., Lemrhari, A., Zouhair, R., El Idrissi, M., Makoudi, Y. et Alnamer, R., «In Vitro Potential Antibacterial activity of the Dichloromethane and Hexane extract of *Inula viscosa* From Morocco», *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, Vol 2, n° 6, (2013), 166-178.

[395].Oskay, M. et Sarı, D., «Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants *Pharmaceutical Biology*», Vol 45, n°3, (2007), 176–181.

- [396].Side Larbi, K., Meddah, B., Tir Touil Meddah, A. et Sonnet, P. «The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs», *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, Vol 8, n°2, (2016), 244-255.
- [397].Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R. et Mata, R., «Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants» *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 35, (1992), 275-283.
- [398].Marjorie, M.C., «Plant products as antimicrobial agents», *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 12, n°4, (1999), 564-582.
- [399].Essawi, T. et Srour, M., «Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 70, (2000), 343-349.
- [400].Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F. et Aouni, M., «Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities», *Pharmaceutical Biology*, Vol 45, n°5, (2007),421–428.
- [401].Fortuna, A.M., Juárez, Z.N., Bach, H., Nematallah, A., Av-Gay, Y., Sánchez-Arreola, E., Catalán, C.A.N.,Turbay, S., Hernández, L.R., «Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*», *Phytochemistry*, Vol 72, (2011), 2413–2418.
- [402].Grevestuk, T., Gonc, S., Almeida, S., Coelho, N., Quintas, C., Gaspar, M.N. et Romano, A., «Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Properties of *in vitro* cultured *Drosera intermedia* Extracts», *Natural Product Communications*, Vol 4, (2009), 1-6.
- [403].Daglia, M., «Polyphenols as antimicrobial agents», *Current Opinion in Biotechnology*, Vol 23,(2012), 174–181.
- [404].Xie, Y., Yang, W.,Tang, F., Chen, X. et Ren, L., «Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism», *Current Medicinal Chemistry*, Vol 22, (2015), 132-149.

[405].Taguri, T., Tanaka, T. et Kouno, I., «Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease Biological and Pharmaceutical Bulletin», Vol 27, n° 12, (2004), 1965-1969.

[406].Cushnie, T.P.T. et Lamb, A.J. «Antimicrobial activity of flavonoids», International Journal of Antimicrobial Agents, Vol 26, (2005), 343–356.

[407].Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Marja Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. et Vuorela, P., «Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds», International Journal of Food Microbiology, Vol 56, (2000), 3–12.

[408].Vaquero, M.J.R., Alberto, M.R. et Manca de Nadra M.C., «Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines», Food Control, Vol 18, (2007), 93–101.

[409].Li, M., et Xu, Z., «Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity». Archives of Pharmacal Research, Vol 31, (2008), 640–644.

[410].Rajendran, N., Subramaniam, S., Christena, L.R., Muthuraman, M.S., Subramanian, N.S., Pemiah, B. et Sivasubramanian, A., «Antimicrobial flavonoids isolated from Indian medicinal plant *Scutellaria oblonga* inhibit biofilms formed by common food pathogens», Natural Product Research, Vol 30, n° 17, (2016), 2002–2006.

[411].Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., et Oksman-Caldentey, K.M., «Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries», Journal of Applied Microbiology, Vol 90, (2001), 494-507.

[412].Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolocouris, A., Daliani, I. et Mavromoustakos, T., «Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative». Journal of Heterocyclic Chemistry, Vol 38, (2001), 703–710.

[413].Xu, H.X. et Lee, S.F., «Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria», Phytotherapy Research, Vol 15, n°1, (2001), 39-43.

[414].Suree, N., Jung, M.E. et Clubb R.T., «Recent Advances Towards New Anti-Infective Agents that Inhibit Cell Surface Protein Anchoring in *Staphylococcus aureus*

and Other Gram- Positive Pathogens», Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Vol 7, n°10, (2007), 991-1000.

[415].Lin, R.D., Chin, Y.P., Hou, W.C. et Lee, M.H., «The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) », *Planta Medica*, Vol 74, n°8, (2008),840-846.

[416].Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., et Wang, Z., «Antibacterial Activity And Mechanism of Action of Chlorogenic Acid», *Journal of Food Science*, vol 76, no 6, (2011), M398–M403.

[417].Fiamegos, Y.C., Kastritis, P.L., Exarchou, V., Han, H., Bonvin, A.M.J.J., Vervoort, J., Lewis, K., Hamblin, M., R., Tegos, G.P., «Antimicrobial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Caffeoylquinic Acids from *Artemisia absinthium* against Gram-Positive Pathogenic Bacteria», *Plos One*, Vo 6, n° 4, e18127, (2011), 1-12.

[418].Fahmy, A., Srinivasan, A. et Webber, M.A., «Chapter 25, The Relationship Between Bacterial Multidrug Efflux Pumps and Biofilm Formation» in *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, Li, X.Z., Elkins, C.A., Zgurskaya H.I., (Editors), 651-663.

[419].Doléans-Jordheim, A., Michalet, S., Bergeron, E., Boisset, S., Souard, F., Dumontet, C., Dijoux Franca, M.G. et Freney, J., «Les phénomènes de résistance aux antibiotiques liés aux pompes à efflux : exemple de *Staphylococcus aureus*», *Annales De Biologie Clinique*, Vol 66, n°5, (2008), 499-508.

[420]. Budzyńska, A., Wieckowska-Szakiel, M., Kalemba, D., Sadowska, B. et Rózalska, B., «The optimization of methods utilized for testing the antibacterial activity of essential oils», *Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia*, Vol 61, n°3, (2009), 281-287.

[421]. Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V. et Puccini, V., «Ricerche sull'attività fungistatica di fiori e foglie di *Inula viscosa* (Asteraceae)», *Parassitologia*, Vol 41, (1999), 579-582.

[422]. Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V. et Puccini, V., «Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region», *Parassitologia*, Vol 44, (2002), 153-156.

- [423].El-Rhaffari, L., Hammani, K., Benlyas, M. et Zaid, A., «Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet», *Revue Biologie & Santé*, Vol 1, n°4, (2002), 45-54.
- [424].Et-Touys, A., Bouyahya, A., Fellah, H., Mniouil, M., El Boury, H., Dakka, N., Sadak, A. et Bakri, Y., «Antileishmanial activity of medicinal plants from Africa: A review», *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*, Vol 7, n°12, (2017), 826-840.
- [425].Mahmoudvand, H., Sharififar, F., Rahmat, M.S., Tavakoli, R., Dezaki, E.S., Jahanbakhsh, S. et Sharifi, I., «Evaluation of antileishmanial activity and cytotoxicity of the extracts of *Berberis vulgaris* and *Nigella sativa* against *Leishmania tropica*», *Journal of Vector Borne Diseases*, Vol 51, (2014), 294-299.
- [426].Mesa, L.E., Vasquez, D., Lutgen, P., Vélez, I.D., Restrepo, A.M., Ortiz, I. et Robledo, S.M., «*In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans», *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, Vol 50, n°1, (2017), 52-60.
- [427].Ezatpour, B., Dezaki, E.S., Mahmoudvand, H., Azadpour, M. et Ezzatkhah, F., «*In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*», *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol 2015 (2015), 1-6.
- [428].Gupta, N.S., «Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery», *The Indian journal of medical research*, Vol 133, n° 1, (2011), 27 - 39.
- [429].Albakhit, S., Khademvatan, S., Doudi, M. et Foroutan-Rad, M., «Antileishmanial Activity of Date (*Phoenix dactylifera* L.) Fruit and Pit Extracts *In Vitro*», *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Vol 21, n° 4,(2016), 1-5.
- [430].Silva-Silva, J. V., Monteiro, R. C. S., Brigido, H. P. C., Vale, V. V., Silvestre, J. V., Silva, N. C. S., Silveira, F. T., Marinho, A. M. R. and Dolabela, M. F., «Anti-promastigote Activity of the Amazon Plants», *Journal of Pharmacy and Pharmacology* , Vol 5 (2017), 654-660.
- [431].Avolio, F., Rimando, A.M., Cimmino, A., Andolfi, A., Jain, S., Tekwani B.L., Evidente, A., «Inuloxins A-D And Derivatives As Antileishmanial Agents:

Structure-Activity Relationship Study», *The Journal of Antibiotics*, Vol 67n°8, (2014), 597-601.

[432].Hamarsheh, O., Azmi, K., Amro, A., Schultheis, M., Abdeen, Z., Firdessa, R., Sawalha, K., Al-Rimawi, F., Yaghmour, R. et Moll, H., «Antileishmanial Potential of Crude Plant Extracts Derived from Medicinal Plants in Palestine», *Annals of Clinical Cytology and Pathology*, Vol 3, n°4, (2017), 1065.1-7.

[433].Hay, A.E., Merza, J., Landreau, A., Litaudon, M., Pagniez, F., Le Pape, P. et Richomme, P., «Antileishmanial Polyphenols From *Garcinia vieillardii*», *Fitoterapia*, Vol 79, n°1, (2008), 42-46.

[434].Sidana, J., Neeradi, D., Choudhary, A., Singh, S., Foley W.J. et Pal Singh, I., «Antileishmanial Polyphenols From *Corymbia maculate*», *Journal of Chemical Sciences* Vol. 125, No. 4, (2013), 765–775.

[435].Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C.M., Chammem, N., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., Lorenzo-Morales, J., Abderabba, M., Piñero, J.E., «Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of *Leishmania* species and their correlation with the antioxidant activity», *Experimental Parasitology*, Vol 141, (2014),106-111.

[436].Muzitano, M.F., Cruz, E.A., De Almeida, A.P., Da Silva, S.A.G., Keiser, C.R., Guette, C., Rossi-Bergmann, B. et Costa, S.S., «Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*», *Planta Medica*, Vol 72, n°1, (2006), 81-83.

[437].Del Rayo Camacho, M., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Marley, D., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., «Assessment of the antiprotozoal activity of *Galphimia glauca* and the isolation of new nor-secofriedelanes and nor-friedelanes», *Journal of Natural Products*, Vol 65, n° 10, (2002), 1457–1461.

[438].Sen, G., Mandal, S., Saha Roy, S., Mukhopadhyay, S. et Biswas, T., «Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis», *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 38, n°9, (2005), 1257-1264.

- [439].Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F. et Rüedi, P., «Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2006), Vol 50, n°4, 1352-1364.
- [440].Muzitano, M.F., Tinoco, L.W., Guette, C., Kaiser, C.R., Rossi-Bergmann, B. et Costa, S.S., «The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*», *Phytochemistry*, Vol 67, n°18, (2006), 2071-2077.
- [441].Montrieux, E., Perera, W.H., García, M., Maes, L., Cos, P. et Monzote, L., «*In vitro* and *In vivo* activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*», *Parasitology Research*, Vol 113, n°8, (2014), 2925-2932.
- [442].Attioua, B., Lagnika, L., Yeo, D., Antheaume, C., Kaiser, M., Weniger, B., Lobstein, A. et Vonthron-Sénécheau, C., «*In vitro* antiplasmodial and antileishmanial activities of flavonoids from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae)», *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* Vol 11, n°2, (2011),1-6.
- [443].Passero, L.F., Bonfim-Melo, A., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., Toyama, M.H., de Toyama, D.O., Romoff, P., Fávero, O.A., dos Grecco, S.S., Zalewsky, C.A., Lago, J.H., «Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae)», *Parasitology Research*, Vol 108, n°3, (2011),529-536.
- [444].Attioua, B., Yeo, D., Lagnika, L., Harisolo, R., Antheaume, C., Weniger, B., Kaiser, M., Lobstein, A., Vonthron-Sénécheau, C., «*In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of a new ventiloquinone and five known triterpenes from *Parinari excelsa*», *Pharmaceutical Biology*, Vol 50, n°7, (2012), 801-806.
- [445].Kirmizibekmez, H., Calis, I., Perozzo, R., Brun, R., Dönmez, A.A., Linden, A., Rüedi, P. et Tasdemir, D., «Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis», *Planta Medica*, Vol 70, n° 8, (2004), 711-717.

[446].Lucarini, R., Magalhães, L.G., Rodrigues, V., Souza, J.M., Tozatti, M.G., Pires, R.H., Cunha, W.R., Martins, C.H.G., «Antiprotozal and Antihelminthic Evaluation of the Hydroalcoholic Extract, Fractions and Compounds of *Gochnatia pulchra*», Latin American Journal of Pharmacy, Vol 35, n°4, (2016), 762-767.

[447].Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D.A., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W. et Nakamura, C.V., «Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*», Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol 49, n°1, (2005), 176-82.

[448].Monzote, L., García, M., Montalvo, A.M., Scull, R. et Miranda, M., «Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*», The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol 105, n°2, (2010),168-173.

[449].García, M., Monzote, L., Montalvo, A.M. et Scull, R., «Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*», Pharmaceutical Biology, Vol 48, n°9, (2010), 1053–1058.

[450].Kaileh, M., Vanden Berghe, W., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G., «Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity», Journal of Ethnopharmacology, (2007), Vol 113, n° 3, 510-516.

[451].Talib, W.H. et Mahasneh, A.M., «Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine», Molecules, Vol 15, n°3, (2010),1811-1824.

[452].Talib, W.H., Zarga, M.H. et Mahasneh, A.M., «Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*», Molecules, Vol 17, n°3, (2012), 3291-3303.

[453].Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H. et El-Mzibri, M., «Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines», Journal of medicinal plant research, Vol 3, n°12, (2009),1045-1050.

[454].Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., Fernández de Mattos, S., Amzazi, S. et Villalonga P., «Screening of North African Medicinal Plant

Extracts for Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines», *European Journal of Medicinal Plants*, Vol 3, n°3, (2013), 310-332.

[455].Benbacer, L., Merghoub, N., El Btaouri, H., Gmouh, S., Attaleb, M., Morjani, H., Amzazi, S. et El Mzibri, M., «Antiproliferative Effect and Induction of Apoptosis by *Inula viscosa* L. and *Retama monosperma* L. Extracts in Human Cervical Cancer Cells», *Topics on Cervical Cancer with an Advocacy for Prevention* Dr. R. Rajamanickam (Ed.), InTech, (2012), 268-284.

[456].Brahmi, N., Scognamiglio, M., Pacifico, S., Mekhoukhe, A., Madani, K., Fiorentino, A. et Monaco, P., «¹H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties», *Food Research International*, Vol 76, (2015),331-341.

[457].Messaoudi, M., Chahmi, N., El Mzibri, M., Gmouh, S., Amzazi, S., Benbacer, L. et El Hassouni, M., «Cytotoxic Effect and Chemical Composition of *Inula viscosa* from Three Different Regions of Morocco», *European Journal of Medicinal Plants*, Vol 16, n°4 (2016), 1-9.

[458].Tuğlu, M.İ., Aydemir, I., Sönmez, P. K., Buran, T. et Mete, M., «The Effects of Medicinal Plants on Cancer Cell Lines and Efficacy of Experimental Animal Model», *International Journal of Secondary Metabolite*, Vol 5, n°1, (2018), 49-59.

[459].Neri, M., Milazzo, D., Ugolini, D., Milic, M., Campolongo, A., Pasqualetti, P. et Bonassi, S., «Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study», *Mutagenesis*, (2015), Vol 30, n°1,155-163.

[460].Møller, P., «The comet assay: ready for 30 more years», *Mutagenesis*, (2018), Vol 33, n°1, 1-7.

[461].Speit, G. et Hartmann, A., «The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair», *Methods in Molecular Biology*, Vol 113, (1999), 203-212.

[462].Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. et Tice, R.R., «Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay», *Mutagenesis*, Vol 18, n°1, (2003), 45-51.

[463].Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. et Stetina, R., «The comet assay: topical issues», *Mutagenesis* Vol 23, n°3, , (2008), 143-151.

[464].Gaivão, I. et Sierra, L. M., «*Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives», *Frontiers in Genetics*, Vol 5, n°304, (2014), 1-8.

[465].Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K.B., Brunborg, G., Sallette, J., Soussaline, F. et Collins, A., «The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay», *Mutagenesis*, Vol 26, n°3, (2011), 393-399.

[466]. Santos, A.R., Miguel, A.S., Macovei, A., Maycock, C., Balestrazzi, A., Oliva, A. et Fevereiro, P., «CdSe/ZnS Quantum Dots trigger DNA repair and antioxidant enzyme systems in *Medicago sativa* cells in suspension culture», *BMC Biotechnology*, Vol 13, n°111, (2013), 1-11.

[467].Side Larbi K., Meddah, B., Tir Touil Meddah, A. et Sonnet, P., «Central Analgesic Property of Extracts and Essential Oils from *Inula viscosa* And *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) In Wistar Rats», *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, Vol 6, n°9, (2016), 72-77.

[468].Hmmouchi, M., «Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, medicinales et toxiques au Maroc», 89-108 pp. In: Heywood V.H. (ed.), Skoula M. (ed.). *Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region*. Chania: CIHEAM, (Cahiers Options Mediterraneennes; n. 23), (1997), 165p.

[469]. Theo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A. et Khetani V., «A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in sprague-Dawly rats», *Toxicology*, Vol 179, (2002), 183-196.

- [470]. Hilaly, J.E., Israili, Z.H., et Lyouss, B., «Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals», *Journal of Ethnopharmacology*, 91, (2004), 43–50.
- [471]. Klaassen, C. D., Casarett, L.J. et Doull, J., «Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons», McGraw-Hill Press, New York, NY, USA, (2001), 1236 p.
- [472]. Ezeonwumelu, J.O. C., Julius, A.K., Muhoho, C. N., Ajayi, A.M., Oyewale, A. A., Tanayen, J. K., Balogun, S.O., Ibrahim, A., Adzu, A., Adiukwu, C.P., Oloro, J., Kiplagat, D.M., Goji, A.D.T., Okoruwa, A.G., Onchweri, A.N. et Reddy, P.M. K., «Biochemical and histological studies of aqueous extract of *Bidens pilosa* leaves from Ugandan Rift Valley in Rats», *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, Vol 2, n°6, (2011), 302–309.
- [473]. Chokshi, D., «Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats», *Food and Chemical Toxicology*, Vol 45, n°1, (2007), 32–40.
- [474]. Tahraoui, A., Israili, Z.H., et Lyoussi, B., «Acute and sub-chronic toxicity of lyophilized aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 132, (2010), 48-55.
- [475]. Kluwe, W.M., «Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies», *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol 57, n°3, (1981), 414–424.
- [476]. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. et Schomaker, S., «The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity», *Toxicology*, Vol 245, (2008), 194–205.
- [477]. Wolf, P.L., Williams, D., Tsudaka, T. et Acosta, L., «Methods and Techniques in Clinical Chemistry». Edition John Wiley & Sons, USA, (1972), 516 p.
- [478]. Burger, C., Fischer, D.R., Cordenunzi, D.A., Batschauer, A.P.B., Filho, V.C. et Soares, A.R.S., «Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice», *Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, Vol 8, (2005), 370–373.

- [479]. Ramaiah, S.K., «Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury», *Clinics in Laboratory Medicine*, Vol 31, n°1, (2011), 161–172.
- [480]. Ahmada, M., Lima, C.P., Akowvuah, G.A., Ismaila, N.N. Hashima, M.A., Hora, S.Y., Anga, L.F., et Yama, M.F., «Safety assessment of standardized methanol extract of *Cinnamomum burmanni*», *Phytomedicine*, Vol 20, (2013), 1124-1130.
- [481]. Aïssatou, D.S., Ngatchic Metsagang, J.T., Dongmo Sokeng, C., et Nijintang, Y., «Anthihyperlipidemic and hypolipidemic properties of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze (Discoreales : Discoreaceae) tuber's aqueous extracts in the rats», *Brizilian Journal of Biological Sciences*, Vol 4, n°7, (2017), 67-80.
- [482]. Lullmann-Rauch, R., «Histologie». Edition de Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique, (2008), 704p.
- [483]. Gome, A.M.B., Kouakou, K., Toure, A., et Traore, F., «Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris», *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, Vol 5, n°5, (2011), 1777-1789.
- [484]. Luka, J., Badau, S.J., Mbaya, A.W., Gadzama, J.J. et Kumshe, H.A., «Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 153, n°1, (2014), 268–273.
- [485]. Da Silva, A.R.H., Reginato, F.Z., Guex, C.G., Figueredo, K.C., Araldi, I.C.D.C., De Freitas, R.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Melazzo De Andrade Mazzanti, C., Hübscher, G.H. et Bauermann, L.D.F., «Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals», *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol 74, (2015), 170-177.
- [486]. Adewale, O.B., Onasanya, A., Anadozie, S.O., Abu, M.F., Akintan, I.A., Ogbole, C.J., Olayide, I.I., Afolabi, O.B., Jaiyesimi, K.F., Ajiboye, B.O. et Fadaka, A.O., «Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of

Crassocephalum rubens leaves in rats», Journal of Ethnopharmacology, Vol 188, (2016), 153–158.

[487]. Serge, B., «Révision accélérée en biochimie clinique». Paris : Maloine, (1985), 384 p.

[488]. Davis, M. E. et Bredt, N. D., «Renal methods for toxicity, in Hayes AWC (ed) Principles and Methods of Toxicology», 3rd ed Raven Press, New York, NY, USA, (1994), 871p.

[489]. Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A.K. et Vernekar, S.N., «Markers of renal function tests», The American Journal of Medical Sciences, Vol 2, n°4, (2010), 170–173.

[490]. Gregg, L.V. et Voigt, D.V.M., «Hematology techniques and concepts for veterinary technicians», USA: Iowa State University Press, (2000), pp 95-101.

[491]. Mukinda, J.T. et Syce, J.A., «Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents», Journal of Ethnopharmacology, 112, (2007), 138–144.

[492]. Valencia, E., Manuel, V.E.F., Diaz, G., Gonzalez, A. et Bermejo, J., «Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of Lapidin a bicyclic sesquiterpene», Planta Medica, Vol 60, n°5, 1994, 395-399.

[493]. Vinegar, R., Schreiber, W. et Hugo, R., «Biphasic development of carrageenan edema in rats», Journal of Pharmacology Experimental Therapy, Vol 166, n°1, 1969, 95-103.

[494]. Cunkhorn, P. et Meacock, S.C.R., «Mediators of inflammation induced in the rat paw by carrageenan», British Journal Pharmacology, Vol 42, n°3, 1971, 392-402.

[495]. Di Rosa, M., Giroud, J.P. et Willoughby, D.A., «Studies of the mediators of acute inflammatory response reduced in rats in different sites by carrageenan and turpentine», Journal of Pathology, Vol 104, n°1, 1971, 15-29.

[496]. Singh, S., Kaur, M., Singh, A. et Kumar, B., «Pharmacological evaluation of anti-inflammatory and anti-ulcer potential of heartwood of *Santalum Album* in rats», Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, Vol 1, n°4, 2014, 140-153.

- [497]. Taher, Y.A., Samud, A.M., El-Taher, F.E., ben-Hussin, G., Elmezogi, J.S., Al-Mehdawi, B.F. et Salem, H.A., «Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice», *Libyan Journal of Medicine*, Vol 10, n° 10, (2015), 1-7.
- [498]. Geroushi, A., Auzi, A.A., Elhwuegi, A.S., Elzawam, F., Elsherif, A. ET Nahar, L., «Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*», *Phytotherapy Research*, Vol 25, (2011), 774–777.
- [499]. Chouhan, H.S., Sridevi, K., Singh, N.K. et Singh, S.K., «Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Vitex glabrata* leaves», *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 25, (2012), 131–134.
- [500]. Okokon, J.E. et Nwafor, P.A., «Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*», *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 23, (2010), 385–392.
- [501]. Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Wongcome, T. et Reutrakul, V., «Anti-inflammatory and antipyretic properties of *Clerodendrum petasites* S. Moore», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 85, n°1, 2003, 151-156.
- [502]. Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Neves B. M., Lopes, M.C., García-Rodríguez, C., Cruza, M.T. et Batista, M.T., «Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-kB pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 148, n° 1, (2013), 126-134.
- [503]. Yonathan, M., Asres, K., Assefa, A. et Bucar, F., «*In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 108, (2006), 462-470.
- [504]. Dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P. et De Souza, G. E. P., «Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid», *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol 29, n°11, (2006), 2236-2240.

- [505].Hwang, S. J., Kim, Y.W., Park, Y., Lee, H.J. et Kim, K.W., «Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells», *Inflammation Research*, Vol 63, (2014), 81–90.
- [506].Motaal, A. A., Ezzat, S.M., Tadros, M.G. et El-Askary, H.I., «In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats», *Pharmaceutical Biology*, Vol 54, n°12, (2016), 2864–2870.
- [507].Ferreira, A.A., Amaral, F.A., Duarte, I.D.G., Oliveira, P.M., Alves, R.B., Silveira, D., Azevedo, A.O., Raslan, D.S. et Castro, M.S.A. «Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 105, (2006), 148–153.
- [508].Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., de la Rocha, N.E. et Pelzer, L.E., «Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation», *Pharmacological Research*, Vol 48, (2003), 601–606.
- [509].Wang, S.J., Tong, Y., Lu, S., Yang, R., Liao, X., Xu, Y.F. et Li, X., «Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves», *Planta Medica*, Vol 76, n°14, (2010), 1492-1496.
- [510].Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y. et Morikawa, S., «Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats», *Life Sciences*, Vol 74, (2003), 709–721.
- [511].De Pascual-Teresa S., Johnston, K.L., DuPont, M.S., O’Leary, K.A., Needs, P.W., Morgan, L.M., Clifford, M.N. et Williamson, G., «Quercetin metabolites down regulate cyclooxygenase. 2. Transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*», *The Journal of Nutrition*, Vol 134, n°3, (2004), 552-557.
- [512].Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M.K., Dai, R., Ahamad, W. et Yu, Y.H., «Antiinflammatory and Analgesic Activities of *Thesium chinense* Turcz Extracts and its Major Flavonoids, Kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside», *Yakugaku Zasshi*, The Pharmaceutical Society of Japan, Vol 127, n° 8, (2007), 1275-1279.
- [513].Yang, J.H., Kim, S.C., Shin, B.Y., Jin, S. H., Jo, M.J., Jegal, K. H., Kim, Y.W., Lee, J. R., Ku, S. K., Cho, I.J. et Ki, S.H., «O-methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- κ B activation», *Food and Chemical Toxicology*, Vol 59, (2013), 362–372.

[514].Richardson, J. et Vasko, M.R., «Cellular mechanisms of neurogenic inflammation», *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, Vol 302, n°3, (2002), 839–845.

[515].Ishola, I.O., Akindede, A.J. et Adeyemi, O.O., «Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC (Connaraceae) methanolic root extract», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 135, (2011), 55-62.

[516].Li, Y.C., Xian, Y.F., Ip, S.P., Su, Zi.R., Su, Ji.Y., He, J.J., Xie, Q.F., Lai, X.P. et Lin, Z.X., «Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animal models», *Fitoterapia*, Vol 82, (2011), 1295-1301.

[517].Chiu, I.M., Von Hehn, C.A., and Woof, C.J., «Neurogenic inflammation, the peripheral nervous system's role in host defense and immunopathology», *Nature Neuroscience*, Vol 15, n°8, (2013), 1063-1067.

[518].Mañez, S., Hernandez, V., Giner, R.M., Rios, J.L. et Recio, M.C., «Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*», *Fitoterapia*, Vol 78, (2007), 329-331.

[519].Hernández, V., Mañez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., et Rios, J.L., «Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with pharmacophoric conjugated diene», *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 26, n°1, (2005), 162-169.

[520]. Sen, S., Charkraborty, R., Rekha, B., Revathi, D., Chinna Ayyanna, S., Hemalatha, G., AsohokKumar Reddy, G., Hyndavi, S., Jeevan Ikhyatha Babu, P., Ravi Prakash, P. et Sri-dar, C., «Anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant activities of *Pisonia aculeata*: folk medicinal use to scientific approach», *Pharmaceutical Biology*, Vol 51, n°4, (2013), 426–432.

[521]. Furtado, A.A., Torres-Rêgo, M.R., Lima, M.C.J.S., Bitencourt, M.A.O., Bergamo Estrela, A., Souza da Silva, N., Michell da Silva Siqueira, E., Tomaz, T., Peoporine Lopes, N., Antônio Silva-Júnior, A., Zucolotto, S.M. et Fernandes-Pedrosa, M.F., «Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema,

peritonitis and air-pouch-inflammation», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 192, (2016), 225-235.

[522]. Khan, H., Saeed, M., Gilani, A.U., Khan, M.A., Dar, A. et Khan, I., «The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 127, n°2, (2010), 521-527.

[523]. Jabsuwan, A., Sukrong, S., Swasdison, S. et Towiwat, P., «Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanolic extract of *Curcuma* aff. *Amada*», *Chiang Mai Journal of Science*, Vol 44, n°3, (2015), 912-928.

[524]. Mishra, D., Ghosh, G., Kumar, P.S. et Panda, P.K., «An experimental study of analgesic activity of selective COX 2 inhibitor with conventional NSAIDs», *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol 4, n°1, (2011), 78-81.

[525]. Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., et Schneider, C., «The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse», *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, Vol 32, n°2, (1968), 295-310.

[526]. Deradt, R., Jougney, S., Benzoni, J. et Peterfalvi, M., «Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition», *European Journal of Pharmacology*, Vol 61, (1980), 17-24.

[527]. Lenardão, E.J., Savegnago, L., Jacob, R.G., Victoria, F.N. et Martinez, D.M., «Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: an update review», *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol 27, n° 3, (2016), 435-474.

[528]. Gorzalczanya, S., Marrassini, C., Miño, J., Acevedo, C., Ferraro, G., «Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 134, (2011), 733–738.

[529]. Dos Santos, M.D., Gobbo-Neto, L., Albarella, L., de Souza, G. E.P. et Lopes, N. P., «Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra)», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 96, (2005) 545-549.

[530]. Guzzo, L.S., Saúde-Guimarães, D.A., Silva, A.C.A., Lombardi, J.A., Guimarães, H.N. et Grabe-Guimarães, A., «Antinociceptive and anti-inflammatory

activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species», *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 116, (2008), 120-124.

[531].Tong, Y., Zhou, X.M., Wang, S.J., Yang, Y. et Cao, Y. L., « Analgesic Activity of Myricetin Isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. Leaves», *Archives of Pharmacal Research*,Vol 32, n° 4, (2009), 527-533.

[532].Filho, A. W., Filho, V.C., Olinger, L. et de Souza, M.M., «Quercetin: Further Investigation of its Antinociceptive Properties and Mechanisms of Action», *Archives of Pharmacal Research* ,Vol 31, n°6, (2008), 713-721.

[533].Muhammad, N., Saeed, M. et Khan, H., «Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant», *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol 12, n° 59, (2012), 1-8.

[534].Saper, C.B. et Breder, C.D., «The neurologic basis of fever», *The New England Journal of Medicine*, Vol 330, n° 26, (1994), 1880-1886.

[535].Khan, H., Saeed, M., Gilani, A.H., Muhammad, N., Haq, I.U., Ashraf, N., Rehman, N.U. et Haleemi, A., «Antipyretic and anticonvulsant activity of *Polygonatum verticillatum*: comparison of rhizomes and aerial parts», *Phytotherapy Research*, Vol 27, n° 3, (2013), 468-471.

[536].Aronoff, D.M. et Neilson, E.G., «Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression», *American Journal of Medicine* , Vol 111, n°4, (2001), 304-315.

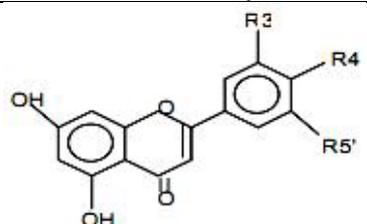
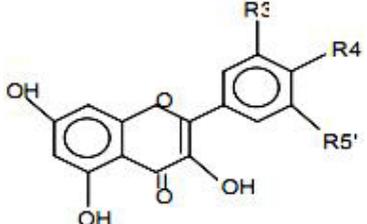
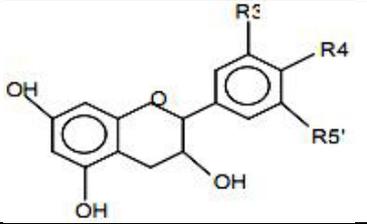
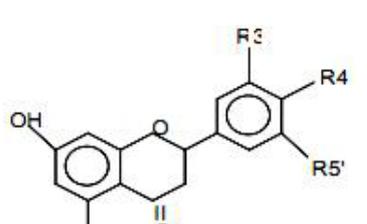
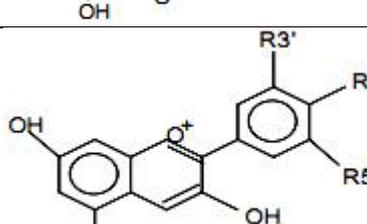
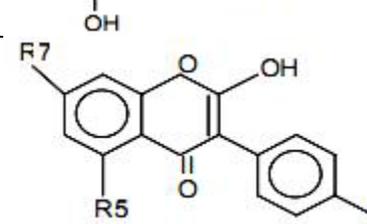
[537].Hajare, S.W., Chandra, S., Tandan, S.K., Sarma, J., Lal, J. et Telang, A.G., «Analgesic and antipyretic activities of *Dalbergia sissoo* leaves», *Indian Journal of Pharmacology*, Vol 32, (2000), 357-360.

[538].Kumar, B. S. A., Lakshman, K., Jayaveera, K. N., Shekar, D. S., Kumar, A. A. et Manoj, B., «Antioxidant and antipyretic properties of methanolic extract of *Amaranthus spinosus* leaves», *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol 3, n° 9, (2010), 702-706.

- [539].Alolga, R.N., Wambui Amadi, S.,Onoja, V., Assanhou, A.G., Muyaba, M. et Kassim, S. A., «Anti-inflammatory and antipyretic properties of Kang 601 heji, a traditional Chinese oral liquid dosage form», *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol 5, n° 11, (2015), 921-927.
- [540].Siva, V., Jeffrey Bose, N.J., Mehalingam, P. et Thanga Thirupathi, A., «Evaluation of Antipyretic Activity of *Petalium murex* Against Brewer's Yeast-Induced Pyrexia in Rats», *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, Vol 2, n° 2, (2012),131-137.
- [541]. Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R. et Krishna, D. R., «Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential», *Indian journal of pharmacology*, 33, (2001), 2-16.
- [542].Erdman, J.W., Balentine, J. D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly Hollman, J. P., LKeen, C., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. et Burrowes J., «Flavonoids and heart health»: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137, (2007), 718-737.
- [543]. Joly, B., Reynaud, A., « Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic », Edition Tec&Doc, (2003), 356p.
- [544]. Madigan, M. et Martinko, J., « Biologie des microorganismes »,11eme Edition Pearson, Paris, (2007), 1088p.
- [545]. Parija, S.C., «Textbook of Microbiology & Immunology», Elsevier India, (2009), 700p.

APPENDICE A

Tableau 1. Principales classes des flavonoïdes [541] [542]

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

APPENDICE B

Matériels non biologique

- Verrerie

Anse de platine

Ballons

Béchers

Boîtes de pétri

Cellule Thoma

Colonne ODS

Compressees stériles

Creusets

Cristallisoir

Disques d'antibiotiques et antifongiques de référence : Vancomycine, Imipèneme, Nystatine

Disques de papier filtre stérile

Ecouvillons stériles

Embouts

Entonnoirs

Ependorffs

Eprouvettes

Erlenmyers

Filtres PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,22µm

Fioles jaugées

Fioles jaugées

Flacons en verre sombre

Flasque

Gants, gaze chirurgicale

Lames et lamelles

Micropipette

Micropipette

Micropipette

Microplaques 96 puits à fond plat avec couvercle (Thermo-Scientific, Nunclon Delta Surface, CAT. No 167008)

Papier aluminium,

Papier filtre Whatman

Parafilm

Perforateur de papier 7mm.

 Pipeteur automatique

Pipette en verre

Pipettes graduées

Portoirs

Scalpels stériles, ciseau, seringues, pinces et spatules

Soxhlet

Tube EDTA

Tube sec

tubes à essai

Tubes coniques stériles

- Equipements

Agitateur (Vortex)

Autoclave

Automate d'hématologie (Sysmex KX-21N)

Automate de biochimie (Roche Hitachi 902).

Bain à Ultrason

Bain-Marie (Mettler)

Balance de précision (Mettler)

Balance électronique (Scaltec SBC 31)

Bec bunsen

Broyeur électrique

Centrifugeuse

Centrifugeuse (Sigma)

Chambre froide

Chauffe ballon

Chromatographe en phase Liquide à Haute Performance (Agilent série 1100) équipé

d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) et couplée à un spectromètre de

masse en tandem (MS/MS) à triple quadripôle (*MICROMASS Quattro Ultima*)

équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI)

Cuve électrophorétique

Etuve/ Etuve bactériologique

Évaporateur rotatif (300b Stuart, UK)

Hotte microbiologique de type II (Faster BH-EN 2004)

Incubateur (Mettler)

Incubateur CO₂ (Binder)

Lecteur ELISA

Lyophilisateur (Edwards Alto Vuoto, Italy)

Microscope à fluorescence

Microscope à phase inversée (Motic AE 31)

Microscope optique (Leica DM1000) avec caméra (Microsystem Leica LAS EZ

Framework)

Microscope optique (Motic)

Microtome

Pied à coulisse

Plaque chauffante (Stuart)

Réfrigérateur
Spectrophotomètre (Lambda 25 PerkinElmer, USA)
Thermomètre

- Produits chimiques et réactifs

Acide acétique
Acide ascorbique
Acide chlorhydrique (HCl)
Acide gallique
Agarose LMP
Agarose NA
Alcool chlorhydrique
Ammoniaque (NH₄OH)
Azote liquide
Bleu de Trypan
Bouillon Muller Hinton
Bouillon nutritif
Carragénine
Chloroforme
Copeaux de magnésium
Diclofenac
Diméthylsulfoxyde (DMSO)
Dodécylsulfate de sodium SDS
DPPH
Eau de Javel à 12°
Eau distillée
Eau physiologique 0,9%
Eosine
Ethanol
Ether
Fer Fe³⁺
Formol (10%)
Gélose nutritive
Hématoxyline
Ibuprofène
Isopropanol à 50%
Levure de bière
Méthanol
Milieu Muller Hinton
Milieu NNN
Milieu RPMI 1640
Milieu Sabouraud

MTT
 Myristate d'isopropyle
 n-hexane
 Phorbol Myrisate Acétate (PMA)
 Quercétine
 Réactif de MAYER
 Réactif de STIASNY
 Réactif Folin ciocalteu
 Rouge Congo
 Serum de Veau foetal(SVF)
 Soude (NaOH)
 sybr green I
 Tampon phosphate salin (PBS)
 Trichlorure d'Aluminium
 Trichlorure de fer (FeCl₃)
 Vert de méthyle
 Xylène

- Composition des milieux de culture :

- ✓ Gélose nutritive

Peptone.....	5g/L
Extrait de bœuf	17g/L
Extrait de levure.....	2g/L
Chlorure de sodium	5g/L
Agar.....	15g/L
pH=7,4	

- ✓ Gélose Muller Hinton (1L)

Infusion de viande de bœuf.....	300mL
Hydrolysate de caséine.....	17g/L
Amidon.....	1,5g/L
Agar.....	17,5g/L
pH=7,4	

- ✓ Milieu Sabouraud

Peptone.....	10g/L
--------------	-------

Glucose.....35g/L

Agar.....15g/L

pH=5,7

✓ Bouillon Muller Hinton

Hydrolysate acide de caséine17,5g/L

Infusion de viande2g/L

Amidon1,5g/L

pH=7,4

✓ Bouillon nutritif

Peptone5g/L

Extrait de viande de bœuf1g/L

Chlorure de sodium.....5g/L

Extrait de levure.....2g/L

pH=7,4

✓ Milieu Novy-Mc-Neal-Nicolle (NNN) IPA

Bacto-Agar5g/L

NaCl3g/L

Eau distillée stérile500mL

Sang de lapin.....10%

✓ Milieu Roswell Park Memorial Institute 164 (RPMI 1640) Sigma Aldrich

Chlorure de Calcium x 2 H₂O.....62,27mg/L

Chlorure de potassium.....400 mg/L

Sulfate de magnésium anhydre.....66,77mg/L

Chlorure de sodium.....5950,49mg/L

Nitrate de sodium.....72 mg/L

L'hydrogénophosphate de sodium anhydre800mg/L

D(+)-Glucose anhydre2000mg/L

L-Glutamine.....300mg/L

L-Glutathion1mg/L

L-Arginine x HCl241,86mg/L

L-Asparagine x H₂O.....50mg/L

L-Acide aspartique20mg/L

L-Cystine50mg/L

L-Acide glutamique20mg/L

Glycine10mg/L

L-Histidine base15mg/L

L-Hydroxyproline.....20mg/L

L-Isoleucine.....50mg/L

L- Leucine50mg/L

L-Lysine x HCl	40mg/L
L-Méthionine.....	15mg/L
L-Phénylalanine	15mg/L
L-Proline.....	20mg/L
L-Serine.....	30mg/L
L-Thréonine.....	20mg/L
L-Tryptophane	5mg/L
L-Tyrosine	20mg/L
L-Valine	20mg/L
4-Amino benzoïque acide.....	1mg/L
D(+)-Biotine	0,2mg/L
D-Pantothénate de calcium	0,25mg/L
Chlorure de choline	3mg/L
Acide folique	1mg/L
Myo-Inositol.....	35mg/L
Nicotinamide	1mg/L
Pyridoxine x HCl.....	1mg/L
Riboflavine	0,2mg/L
Thiamine x HCl.....	1mg/L
Vitamine B12.....	0,005mg/L
Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (HEPES)	25 mM

✓ Teste des comètes :

Agarose NA : 0,75 g d'agarose+ 100 ml de PBS

Agarose LMA: 0,065g+ 10 ml de PBS

1. La solution de lyse contient : 2,5 M de NaCl, 100 mM de Na₂EDTA, 10 mM de Tris (pH ajusté à 10 avec NaOH), à 89 mL de cette solution ont été ajoutés extemporanément 1% de Triton X-100 et 10% de DMSO.
2. La solution de tampon d'électrophorèse 300 mM NaOH et 1 mM Na₂EDTA, (p H>13)
3. La solution Tampon de neutralisation : 0,4 M Tris-HCl à pH 7,5

APPENDICE C

Questionnaire de l'enquête ethnobotanique

Sexe : Age : Région :	الجنس: العمر: المنطقة:
1- Connaissez-vous la phytothérapie ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	1- هل تعرفون التقليدي (التداوي بالأعشاب)؟ <input type="checkbox"/> نعم <input type="checkbox"/> لا
2- Si oui, comment vous la connaissez-vous? <input type="checkbox"/> Avez-vous entendu parler d'elle ? <input type="checkbox"/> Avez-vous été déjà soigné par la phytothérapie?	2- إذا كان؟ كيف، نعم <input type="checkbox"/> هل سمعتم <input type="checkbox"/> هل تداوونم الطبيّة بالأعشاب من قبل
3- Connaissez-vous l'inule visqueuse? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	3- هل تعرفون؟ النبتة هذه <input type="checkbox"/> نعم <input type="checkbox"/> لا
4- Comment la connaissez-vous ? <input type="checkbox"/> Utilisé par une personne de votre entourage? <input type="checkbox"/> Utilisé par vous-même	4- إذا كان نعم؟ كيف <input type="checkbox"/> هل استعمالها شخص من معارفكم <input type="checkbox"/> هل شخصيًا استعمالتموها
5- Dans quelles maladies est –elle utilisée ?	5- في أي مرض؟ استعمالتموها

<p>6- Quelle est la partie utilisée de la plante ?</p> <p><input type="checkbox"/> Les feuilles</p> <p><input type="checkbox"/> Les fleurs</p> <p><input type="checkbox"/> La racine</p>	<p>6 - ما هو الجزء؟ المستعمل</p> <p><input type="checkbox"/> الأوراق</p> <p><input type="checkbox"/> الأزهار</p> <p><input type="checkbox"/> الجذور</p>
<p>7- Son mode d'utilisation</p>	<p>7 - طريقة استعمالها(كيف تناولتها)</p>
<p>8- Est ce que le résultat est positif ?</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non</p>	<p>8- هل كانت النتائج؟ ايجابية</p> <p><input type="checkbox"/> نعم</p> <p><input type="checkbox"/> لا</p>
<p>9- Ya-t-il des effets secondaires ?</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non</p>	<p>9- هل لها تأثيرات؟ سلبية</p> <p><input type="checkbox"/> نعم</p> <p><input type="checkbox"/> لا</p>
<p>10- Préférez-vous :</p> <p><input type="checkbox"/> Un traitement naturel</p> <p><input type="checkbox"/> Un traitement médical</p> <p><input type="checkbox"/> Les deux</p>	<p>10- هل تفضلون:</p> <p><input type="checkbox"/> التداوي بالأعشاب</p> <p><input type="checkbox"/> التداوي بالطب الحديث</p> <p><input type="checkbox"/> الاثنين معاً</p>

APPENDICE D

Tableau 2. Souche bactériennes étudiées [543] [544] [545]

Souches bactérienne	Gram	Famille	Pathologies causées
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	Enterobacteriaceae	-Infections intestinales et urinaires -Septicémie -Méningites
<i>Salmonella spp</i>	Négatif	Enterobacteriaceae	-Toxi-infection Alimentaire Collective -Fièvre Typhoïde
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	Enterobacteriaceae	-Infections pulmonaires -Cystites -Méningites
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	<i>Pseudomonadaceae</i>	-Infections: -Du tractus respiratoire et urinaire, -Cutanées, -Auriculaires, -Bactériémies
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Négatif	<i>Moraxellaceae</i>	-infections : -Voies respiratoires -Appareil urinaire
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	<i>Staphylococcaceae</i>	- Furoncles -Abscesses, -Infections cutanées, -Pneumonies, -Syndrome du choc toxique
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positif	<i>Staphylococcaceae</i>	- Infections sur cathéters et prothèses
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Positif	<i>Staphylococcaceae</i>	-Infection du tractus urinaire
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Positif	<i>Streptococcaceae</i>	-Méningites, -Sinusites, -Otites -Endocardites
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Positif	<i>Streptococcaceae</i>	-Infections cutanée et invasives
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positif	<i>Enterococcaceae</i>	-Endocardite, -Infections urinaires -Bactériémies

APPENDICE E

1. Méthodes utilisées pour le dénombrement cellulaire par comptage direct

1.1. Dénombrement sur cellule de Thoma

✓ Description du matériel

La cellule correspond à une plaque, en verre optique spécial, à la taille d'une lame porte-objets. Celle-ci comporte un ou deux plateaux centraux sur lesquels un réseau de numération (zone de comptage) y est gravé : entrecroisement de lignes horizontales et verticales formant 16 grands carrés contenant chacun 16 petits carrés (figure 1). Les côtés de chaque petit carré possèdent une longueur de 0,05 mm, tandis que sa profondeur est de 0,1mm (volume égale à $2,5 \times 10^{-7}$ ml).

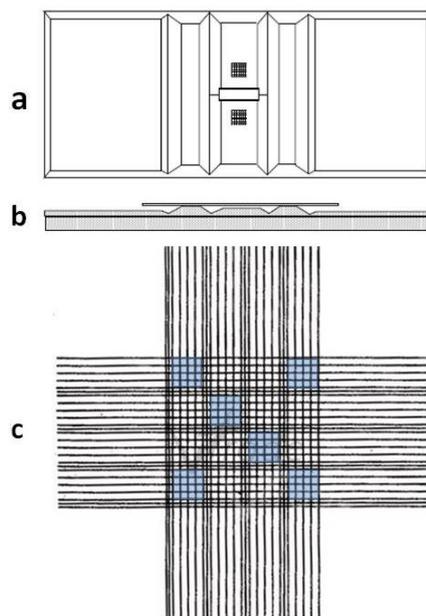


Figure 1. Représentation schématique de la cellule de Thoma. a : cellule représentée de face, b : cellule représentée de profil, c : représentation du réseau de numération.

✓ Procédure

- Homogénéiser de la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette automatique
- Déposer, au bord de la lamelle recouvrant la zone de dénombrement, un petit volume de la suspension cellulaire de manière à ce que cette dernière pénètre

(par capillarité) dans l'espace délimitée par les rigoles du plateau central de la cellule de Thoma.

- Laisser un temps de décompter les cellules (environ 10 min).
- Dénombrer les cellules contenues dans les grands carrés du réseau de numération selon une procédure préétablie : le dénombrement est effectué sur les six grands carrés représentés en bleu sur la figure I ; le comptage inclus les cellules situées à l'intérieur des lignes délimitant la surface du grand carré et celles touchant la ligne du haut et de droite, tandis que les cellules touchant la ligne du bas et celle de gauche ne sont pas comptabilisées.
- Rendre le résultat en appliquant la formule prenant en compte le facteur de dilution, le volume et le nombre de carrés dénombrés :

$$\text{Concentration cellulaire} = (\text{Nombre de cellules} / 6) \times 16 \times (1/\text{dilution}) \times 10^4 \text{ cellules/mL.}$$

1.2. Dénombrement sur microplaque par l'utilisation du microscope photonique inversé

- Insérer le quadrillage de 1 cm² dans l'oculaire du microscope photonique inversé,
- Compter le nombre de cellules vivantes (blanches) et mortes (bleues) sur le quadrillage entier et compter 3 champs/puits.
- Formule du comptage des cellules:

$$\text{Nombre de cellules/puits} = \text{moyenne des trois champs} \times \text{Gr}^2 \times \text{surface du puits} \text{ (cm}^2\text{)}$$

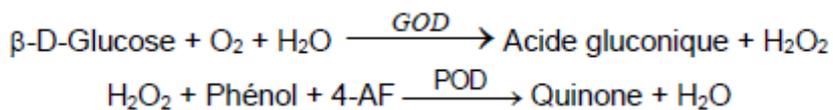
APPENDICE F

Fiches techniques « Spinreact »

1. Détermination quantitative de glucose

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit se détecte avec un accepteur chromogène d'oxygène, phénol, 4-aminophénazone (4- AF), en présence de la peroxydase (POD):



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

Le glucose est la plus grande source d'énergie pour les cellules de l'organisme ; l'insuline facilite l'entrée de glucose dans les cellules.

Le diabète est une maladie qui se manifeste par une hyperglycémie, causée par un déficit d'insuline.

➤ RÉACTIFS

R	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
	Phénol	0,3 mmol/L
	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4 – Aminophénazone (4-AF)	2,6 mmol/L
GLUCOSE CAL	Étalon primaire aqueux de Glucose 100 mg/dL	

➤ PROCEDURE

1. Conditions de test:

Longueur d'ondes: 505 nm (490-550)

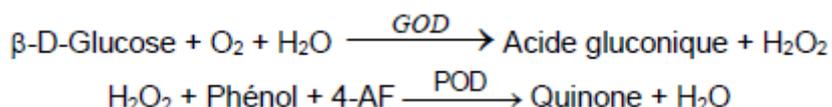
Echantillon : sérum

➤ Résultats : g/L

2. Détermination quantitative d'aspartate amino transférase GOT (ASAT)

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

L'aspartate amino transférase (AST), initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et d'oxalacétate. L'oxalacétate produit est réduit en malate en présence de déshydrogénées (MDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photo numériquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'AST dans l'échantillon.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

L'AST est une enzyme intracellulaire, qui se trouve en grandes quantités dans les muscles du coeur, les cellules du foie, les cellules du muscle squelettique et en plus faibles quantités dans les autres tissus.

Bien qu'un niveau élevé d'AST dans le sérum ne soit pas caractéristique d'une maladie hépatique, elle s'emploie principalement pour les diagnostics et le suivi, avec d'autres enzymes telles que l'ALT et l'ALP. Elle s'utilise également dans le cadre du contrôle post-infarctus, chez les patients souffrant de troubles musculaires du squelette et dans certains autres cas.

➤ REACTIFS

R 1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampon	L-aspartate	200 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrats	Lactate déshydrogéné (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogéné (MDH)	600 U/L
	α-cétoglutarate	12 mmol/L

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

Longueur d'ondes:340 nm

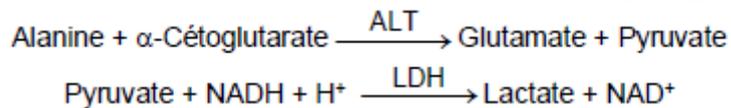
Echantillon : sérum

- Résultats: unité internationale (UI/L).

3. Détermination quantitative d'alanine amino transférase GPT (ALAT)

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

L'alanine amino transférase (ALT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogéné (LDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

L'ALT est une enzyme intracellulaire, qui se trouve principalement dans les cellules du foie et des reins.

Son meilleur avantage est le diagnostic de maladies du foie.

On l'observe en grandes quantités dans le cadre de maladies hépatiques, telles que l'hépatite, les maladies du muscles et des infarctus du coeur, étant donné que la valeur de l'ALT reste dans les limites standards et augmente dans les niveaux de AST.

➤ REACTIFS

R 1	TRIS pH 7,8	100 mmol/L
Tampon	L-Alanine	500 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrats	Lactate déshydrogéné (LDH)	1200 U/L
	α -Cétoglutarate	15 mmol/L

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

Longueur d'ondes:340 nm

Echantillon : sérum

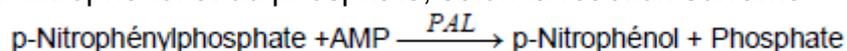
- Unités: unité internationale (UI/L).

4. Détermination quantitative de phosphatase alcaline (PAL)

➤ PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Test photométrique, conformément à l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC).

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1- propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

Les phosphatases alcalines sont des enzymes qui sont présentes dans presque tous les tissus de l'organisme, en étant particulièrement élevées dans les os, le foie, le placenta, les intestins et les reins.

Aussi bien l'augmentation que la diminution des niveaux dans le plasma, ont une signification clinique.

Les causes probables d'augmentation du niveau de PAL :

Maladie osseuse de Paget, obstructions hépatiques, hépatite, hépatotoxicité par médicaments et ostéomalacie.

Les causes les plus probables de diminution du niveau de PAL :

Crétinisme et déficit en vitamine C.

➤ REACTIFS

R 1 Tampon	2-Amino-2-méthyle-1-propanol Zinc sulfate Acétate de magnésium N-acide hydroxyéthyl éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)	0,35 mol/L 1 mmol/L 2 mmol/L 2 mmol/L
R 2 Substrat	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/L

➤ PROCÉDURE

- Conditions d'essai:

Longueur d'onde: 405 nm

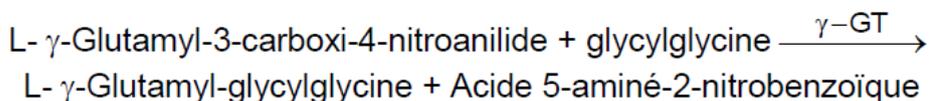
Echantillon : sérum

Unités : unité internationale (UIL).

5. Détermination quantitative de gamma-glutamyl transférase (gamma GT)

➤ PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La gamma glutamyl transférase (gamma-GT) catalyse le transfert d'un groupe gamma- glutamyl de la gamma-glutamyl-p-nitroanillide au dipeptide accepteur glycyglycine, d'après la réaction suivante :



La vitesse de formation de l'acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque, déterminée de manière photométrique, est proportionnelle à la concentration catalytique de gamma-glutamyl transférase (gamma-GT) dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

La gamma-glutamyl transférase (gamma-GT) est une enzyme qui est présente dans presque tous les tissus de l'organisme, en étant particulièrement élevée dans le foie, le pancréas, le rein et la prostate.

La détermination des niveaux de gamma-glutamyl transférase (gamma-GT) est la méthode la plus utilisée pour diagnostiquer et soigner les maladies hépatobiliaires telles que l'obstruction hépatique, la cirrhose ou les tumeurs hépatiques.

➤ RÉACTIFS

R 1	TRIS pH 8,6	100 mmol/L
Tampón	Glycyglycine	100 mmol/L
R 2	L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilide	3 mmol/L
Substrat		

➤ PROCÉDURE

- Conditions d'essai:

Longueur d'onde:.....405 nm

Echantillon : sérum

- Unité : unité internationale (UI/L).

6. Détermination quantitative de la bilirubine totale

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

La bilirubine est transformée en azobilirubine au moyen de l'acide sulfanilique diazote, et se mesure par photométrie. Des deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine-glucuronide et la bilirubine libre associée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe). La deuxième ne réagit que par solubilisation avec du diméthylsulfoxyde (DMSO)- (bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, on détermine également la directe, le résultat correspondant à la bilirubine totale. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

La bilirubine provient de la dégradation de l'hémoglobine.

Elle est transportée depuis la rate vers le foie et est excrétée dans la bile.

L'hyperbilirubinémie est le résultat d'une augmentation de la bilirubine dans le plasma. Les causes les plus probables de la hyperbilirubinémie sont:

La bilirubine totale (T): Augmentation de l'hémolyse, altérations génétiques, anémie néonatale, altérations d'érythropoïétines, présence de drogues.

➤ REACTIFS

R 1 (D)	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique (ClH)	150 mmol/L
R 2 (T)	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique (ClH)	50 mmol/L
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mol/L
R 3	Nitrite de sodium	29 mmol/L
Optionnel	BILIRRUBIN CAL (Remarque 3)	Réf: 1002250

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

- Longueur d'ondes:555 nm (530-580)

- Echantillon : sérum

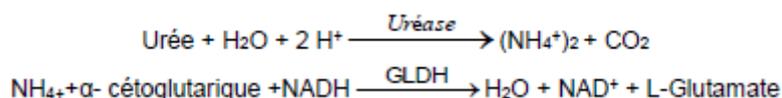
➤ unité : mg/L.

7. Détermination quantitative de l'urée

➤ PRINCIPE DE LA MÉTHODE

L'échantillon d'urée est hydrolysé de manière enzymatique dans l'ammoniac (NH₄⁺) et le dioxyde de carbone (CO₂).

Les ions d'ammoniac réagissent avec α-cétoglutarique dans une réaction catalysée par le glutamate déshydrogénase (GLDH) avec une oxydation simultanée de NADH à NAD⁺:



La baisse de la concentration du NADH est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillonnage.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

L'urée est le résultat final du métabolisme des protéines; Il est formé dans le foie à partir de la destruction de ces protéines.

Il peut arriver que l'urée soit élevée dans le sang (urémie) et dans : les régimes alimentaires riches en protéines, les maladies rénales, la crise cardiaque, l'hémorragie gastro-intestinale, la déshydratation ou l'obstruction rénale.

Le diagnostic clinique ne doit pas se faire sur la base d'un seul résultat d'analyse; il doit intégrer les données cliniques et d'autres données du laboratoire.

➤ RÉACTIFS

R 1 Tampon	TRIS pH 7,8 α-Cétoglutarique Uréase	80 mmol/L 6 mmol/L 75000 U/L
R 2 Enzymes	GLDH NADH	60000 U/L 0,32 mmol/L
CAL URÉE	Urée aqueuse en étalon primaire	50 mg/dL

➤ PROCÉDURE

- Conditions d'essai:

Longueur d'onde: 340 nm

Echantillon sérum

- unité : g/L.

8. Détermination quantitative de créatinine

➤ PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Dans la première réaction, nous utilisons de la créatinase oxydase dans l'hydrolyse enzymatique de la créatine endogène pour produire du peroxyde d'hydrogène, qui est éliminé par catalase. Dans la seconde réaction, la catalase est inhibée par l'azoture de sodium, on ajoute de la créatinase et 4-aminoantipyrine (4-AA), et seulement la créatine générée à partir de la créatinine par la créatinase on hydrolyse séquentiellement par la créatinase y sarcosine oxydase, pour produire du peroxyde d'hydrogène. Ce nouveau peroxyde d'hydrogène formé est mesuré dans une réaction accouplée catalysée par la peroxydase, avec N-éthyle-n-sulfopropyle-m-toluidine (TOPS)/4-AA comme chromogène.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

La créatinine est le résultat de la dégradation de la créatine, composant des muscles et elle peut être transformée en ATP source d'énergie pour les cellules.

La production de créatinine dépend de la modification de la masse musculaire. Elle varie peu et les niveaux sont généralement très stables.

Elle s'élimine par les reins. Des niveaux élevés de créatinine sont indicatifs de pathologie rénale.

Le diagnostic clinique doit être réalisé en prenant en compte toutes les données cliniques et de laboratoire.

➤ RÉACTIFS

R 1	MOPS 25 mmol/L, TOPS 0,5 mmol/L, Créatinase 10 KU/L, Sarcosine Oxydase 5 KU/L, Catalase 3 KU/L, EDTA 1mmol/L, pH7,5.
R 2	MOPS 90 mmol/L, Créatinase 30 KU/L, Peroxydase KU/L, pH 7,5. Azoture de sodium 0,5 g/L.
CRÉATININE CAL	Patron primaire aqueux de Créatinine 2 mg/dL.

➤ PROCÉDURE

- Conditions de l'essai :

Longueur d'onde :545nm (525-565)

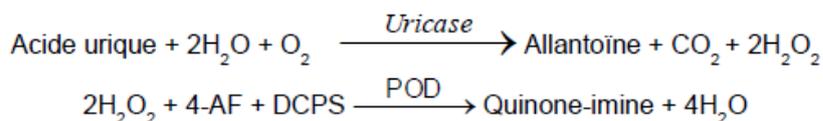
Echantillon : Sérum

- Unités :mg/L.

9. Détermination quantitative de l'acide urique

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoiné et peroxyde d'hydrogène (2H₂O₂) lequel, en présence de peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et 2-4 Dichlorophénol Sulfonate (DCPS), forme un composé rosacé :



L'intensité de quinone-imine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présent dans l'échantillon testé

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

L'acide urique et ses sels sont le produit final de la dégradation des purines. Dans une insuffisance rénale progressive, il y a une rétention dans le sang d'urée, créatinine et acide urique.

Des niveaux élevés d'acide urique indiquent une pathologie rénale et sont généralement associés à la goutte

➤ RÉACTIFS

R 1	Phosphates pH 7,4	50 mmol/L
Tampon	2-4 Dichlorophénol Sulfonate (DCPS)	4 mmol/L
R 2	Uricase	60 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4 - Aminophénazone (4-AF)	1 mmol/L
URIC ACID CAL	Étalon primaire aqueux d'Acide urique	6 mg/dL

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:
- Longueur d'ondes: 520 nm (490-550)
- Echantillon : sérum

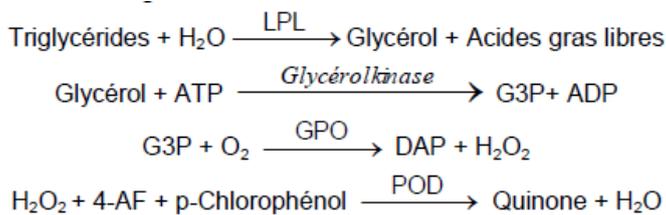
➤ unités : mg/L.

10. Détermination quantitative des triglycérides

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéinlipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par du glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par le GPO.

Au final, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec du 4-aminophénazone (4- AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge:



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

Les triglycérides sont des graisses qui fournissent à la cellule son énergie. Tout comme le cholestérol, ils sont transportés vers les cellules de l'organisme par les lipoprotéines du sang.

Un régime fort en graisses saturés ou en carbohydrates peut élever les niveaux de triglycérides. Leur augmentation est relativement neutre. Diverses maladies, telles que certaines dysfonctions hépatiques (cirrhose, hépatite, obstruction biliaire) ou diabète mellitus, peuvent être associées à des hausses de triglycérides.

➤ RÉACTIFS

R 1 Tampon	GOOD pH 7,5	50 mmol/L
	p-Chlorophénol	2 mmol/L
R 2 Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase(POD)	440 U/L
	4 - Aminophénazone (4-AF)	0,1 mmol/L
	ATP	0,1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Patron primaire de détection de triglycérides 200 mg/dL	

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

Longueur d'ondes: 505 nm (490-550)

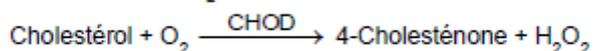
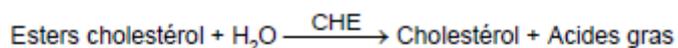
Echantillon : sérum

➤ unités : g/L.

11. Détermination quantitative de cholestérol

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

Le cholestérol présent dans l'échantillon donne lieu à un composé coloré, selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol présent dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

Le cholestérol est une substance grasse présente dans toutes les cellules de l'organisme. Le foie produit naturellement tout le cholestérol dont il a besoin pour former les membranes cellulaires et produire certaines hormones. La détermination du cholestérol est l'un des outils les plus importants pour diagnostiquer et classer les lipémies. L'augmentation du cholestérol est l'un des principaux facteurs de risque cardiovasculaire.

Le diagnostic clinique doit être réalisé en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire.

➤ RÉACTIFS

R	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
	Phénol	26 mmol/L
	Cholestérol-estérase (CHE)	1 000 U/L
	Cholestérol-oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	650 U/L
	4 – Aminophénazone (4-AF)	0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Étalon primaire aqueux de Cholestérol 200 mg/dL. Contient Triton X-114 10-15%.	

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

Longueur d'ondes: 505 nm (500-550)

Echantillon : sérum

- unités: g/L.

12. Détermination quantitative des protéines totales

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre; ces sels contiennent du iodure qui agit comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

Les protéines sont des composés organiques macromoléculaires, répartis largement dans l'organisme. Elles fonctionnent comme des éléments structurels et de transport. Elles sont divisées en deux fractions, albumines et globulines.

Leur détermination est utile pour détecter:

L'hyperprotéinémie produite par hémococoncentration, déshydratation ou augmentation de la concentration des protéines spécifiques.

L'hypo protéinémie par hémodilution due à une défaillance dans la synthèse protéique, à des pertes excessives (hémorragies) ou à un catabolisme protéique excessif.

➤ RÉACTIFS

R Biuret	Tartrate de potassium de sodium	15 mmol/L
	Iodure de sodium	100 mmol/L
	Iodure de potassium	5 mmol/L
	Sulfate de cuivre (II)	5 mmol/L
	Hydroxyde de sodium	1000 mmol/L
T PROTEIN CAL	Patron primaire d'albumine bovine 7 g/dL	

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:

Longueur d'ondes: 540 nm (530-550)

Echantillon : sérum

➤ unités: g/L.

13. Détermination quantitative de l'albumine

➤ PRINCIPE DE LA METHODE

L'albumine se combine au vert de bromocrésol, à pH légèrement acide, entraînant un changement de couleur de l'indice, passant du jaune-vert au vert-bleuté, et proportionnel à la concentration d'albumine présente dans l'échantillon testé.

➤ SIGNIFICATION CLINIQUE

L'albumine est l'une des protéines plasmatiques les plus importantes produite par le foie.

Parmi ses multiples fonctions, on retiendra la nutrition, l'entretien de la pression oncotique et le transport des substances telles que la Ca⁺⁺, la bilirubine, les acides gras, les drogues et les stéroïdes.

Des perturbations dans les valeurs de l'albumine signalent des maladies du foie, une malnutrition, des lésions de la peau telles que de la dermatite, des brûlures importantes ou une déhydratation

➤ RÉACTIFS

REACTIFS

R	Vert de bromocrésol pH 4,2	0,12 mmol/L
ALBUMINE CAL	Étalon primaire de détection de l'albumine 5 g/dL	

➤ PROCEDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes: 630 nm (600-650)
Echantillon : sérum

- unités: g/L.

APPENDICE G

Protocole de fixation de colorations des coupes histologiques

1. Fixation

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures et de les conserver en respectant leur morphologie. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement. La fixation des organes est réalisée dans le formol à 10%.

2. Déshydratation, éclaircissement et imprégnation (automate)

La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. Elle est réalisée à l'aide d'un automate muni de plusieurs bacs contenant de l'éthanol à concentration croissante.

L'éclaircissement est effectué dans deux bains de xylène afin de permettre l'élimination complète des traces d'éthanol.

Les organes sont imprégnés dans deux bains successifs: le premier bain contient 50% de xylène et 50% de paraffine pure dissoute et le deuxième bain comprend de la paraffine pure à une température de 60°C.

Mode opératoire

- On met les pièces (organes) dans des cassettes en plastique (Leica Micro Systems 39 LC – 550-2 J et Routine VI) qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de chaque pièce.
- On place le panier dans l'automate qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, éclaircissement et imprégnation. Le panier est transporté d'un poste à l'autre, le déplacement s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre. Un mouvement de va et vient est imprimé au panier immergé. Ce mouvement a pour but de faciliter et d'accélérer l'infiltration. Avant de quitter un poste, le panier est maintenu pendant 60 secondes au-dessus du récipient pour laisser au produit le temps de s'égoutter (on réduit ainsi au minimum le risque de contamination de solvants.) (Tableau 1).
- On retire le panier et on prend les cassettes pour l'enrobage.

Tableau 3. Etapes de déshydratation, éclaircissement et imprégnation

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol 10%	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 50%	1	45
Ethanol 60%	1	45
Ethanol 70%	1	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 99%	1	45
Xylène	1	45
Xylène	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine	2	60

3. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion consiste à enfermer l'organe dans une cassette en plastique avec de la paraffine. On obtient alors un bloc de consistance homogène que l'on coupera au microtome. Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Elle se fait dans des moules permettant les confections de blocs.

Mode opératoire

- On utilise pour cette étape une station d'enrobage tissu-TEK 111, (Réf.74588), contenant : console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante.

- On place les moules en Acier inoxydable (tissus-TEK111) dans le bac de préchauffage.
- On retire les cassettes de la paraffine liquide à l'aide des pinces préchauffées et on les place sur la plate-forme chaude de travail.
- Après avoir rempli le moule de paraffine, on le place sur la plate-forme chaude, puis on positionne le tissu au centre et au fond du moule.
- On déplace le moule de la «région chaude» à la «région froide». Le refroidissement de la base du moule fait que le tissu est maintenu exactement dans la position choisie.
- On enlève la cassette d'enrobage de la plate-forme de travail chauffée, puis on la place au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate.
- On place de nouveau la cassette et le moule sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie.

- On met la cassette et le moule ainsi remplis sur la grande plaque réfrigérée pour refroidissement définitif.
- Après quelques minutes de refroidissement, les blocs ainsi réalisés, avec précision, peuvent donc être stockés dans le tiroir réfrigéré en attendant d'être coupés.

4. Confection des coupes

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 5 µm d'épaisseur.

5. Collage et séchage

Les rubans obtenus sont étalés sur les lames (CITOGLAS® 217105-1 Super GRADE) et mises à sécher 1h à 60°C. Les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante à l'aide d'un diamant.

7. Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant deux minutes. L'hydratation a pour objet de retirer le xylène afin de les préparer pour la coloration. Les coupes sont passées dans trois bains d'éthanol décroissant : 100% ; 96% ; 70% d'une durée de quelques secondes chacun. Elles sont enfin lavées à l'eau courante.

8. Coloration

La coloration est réalisée par l'hématoxyline & Eosine selon les étapes suivantes :

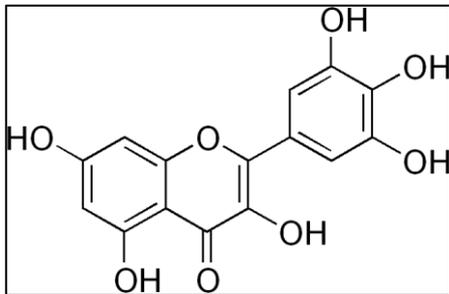
- Un bain d'hématoxyline pendant trois minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Un bain d'éosine pendant deux minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Passer successivement dans des bains d'alcool (70°,96°,99°).
- Passer dans deux bains de xylène.

9. Montage et observation

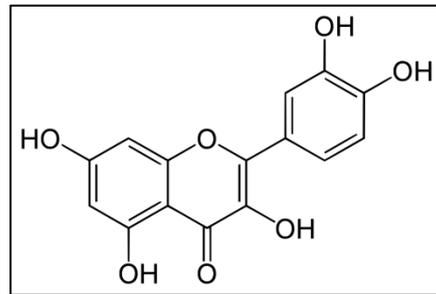
Le montage est l'opération qui consiste à fixer à l'aide d'une substance appropriée (Eukit) une lamelle de verre sur l'échantillon histologique, cette étape a comme but de protéger les coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air libre. Les lames sont ensuite nettoyées au xylène, séchées sur papier absorbant et enfin observées au microscope optique à différents grossissements : GX4, Gx10 et Gx40.

APPENDICE H

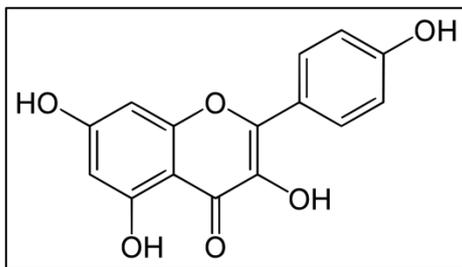
Figure 2. Structure chimique de quelques composés identifiés



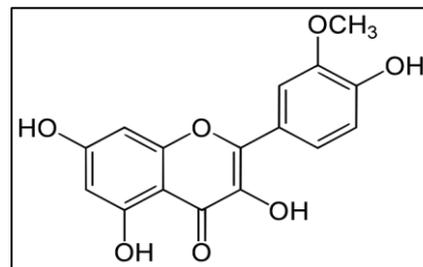
Myricétine



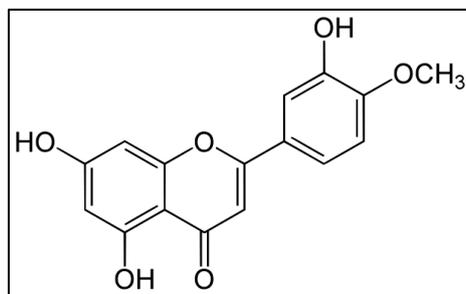
Quercétine



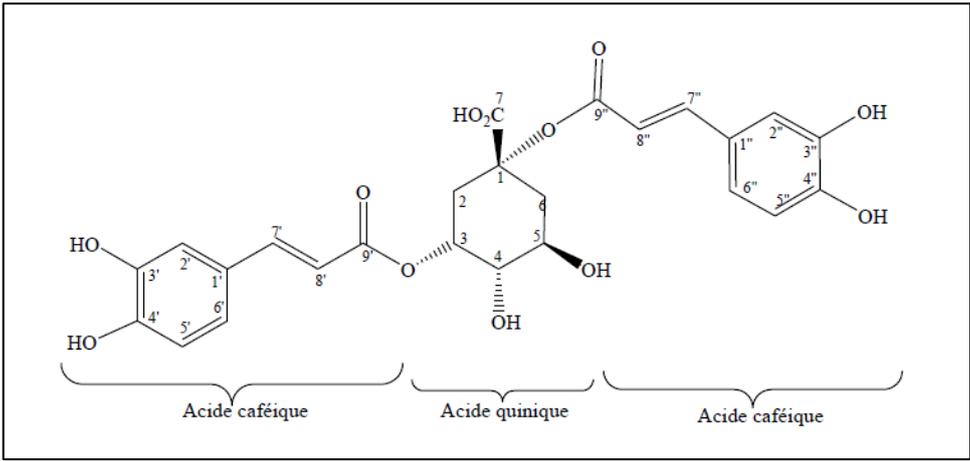
Kaempférol



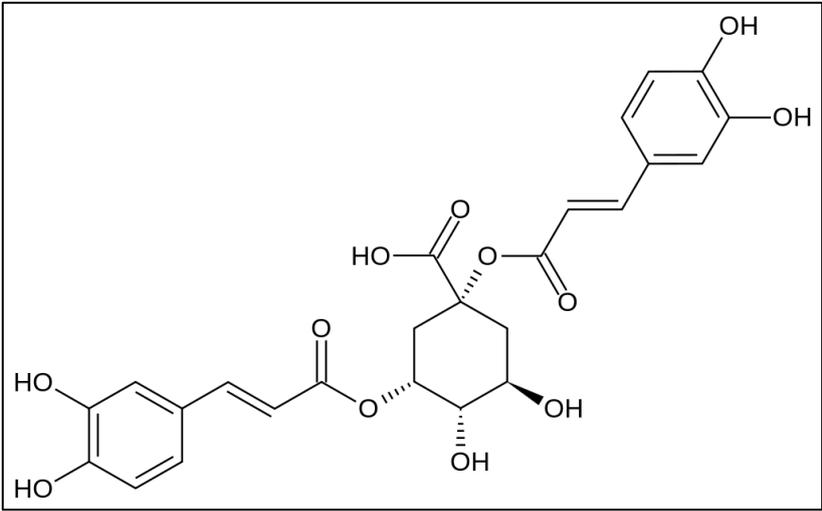
Isorhamnétine



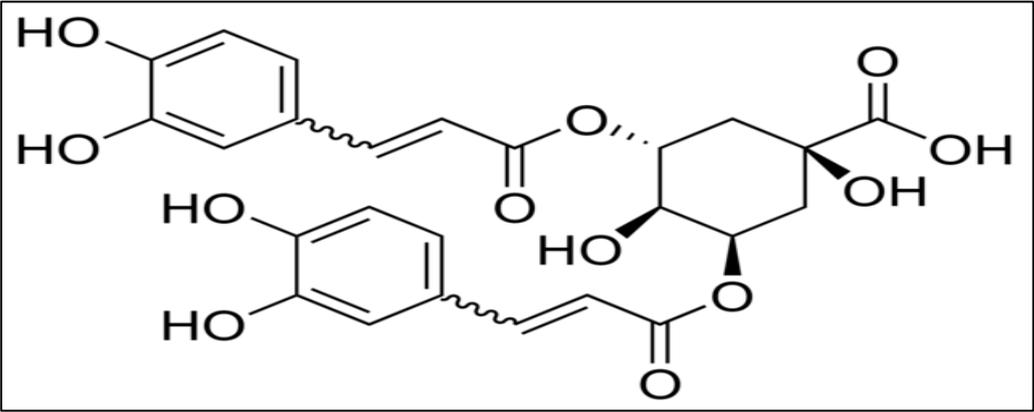
Diosmétine



L'acide 1,3-Dicafféoylquinique



L'acide 1,5-Dicafféoylquinique



L'acide 3,5-Dicafféoylquinique

APPENDICE I

Tableau 5. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* sur les bactéries à gram négatif

Souches	Extraits de feuilles	Doses mg/mL			Antibiotique
		200	100	50	
<i>E.coli</i> ATCC	EMeOH	12,33±0,33 ^b	11±0	9,33±0,33	28,33±0,33 ^a
	Décocté	7,33±0,33 ^d	6,33±0,33	6±0	
	n-hexane	10±0,58 ^c	10±0,58	8,33±0,33	
<i>E.coli</i> Pat.	EMeOH	12±0 ^b	11±0,58	10,33±0,33	27,33±0,33 ^a
	Décocté	7±0 ^c	7±0,58	6,67±0,33	
	n-hexane	11±0,58 ^b	10±0	9,33±0,33	
<i>K.pneumoniae</i> ATCC	EMeOH	10,33±0,33 ^b	10±0,58	8±0,58	24±0,57 ^a
	Décocté	6,67±0,67 ^c	6±0	6,33±0,33	
	n-hexane	9,33±0,33 ^b	9±0	6,67±0,33	
<i>K.pneumoniae</i> Pat.	EMeOH	9,33±0,33 ^b	8,33±0,66	6,33±0,33	23,33±0,33 ^a
	Décocté	6,33±0,33 ^c	6,33±0,33	6±0	
	n-hexane	9,33±0,88 ^b	9±0,58	8,33±0,33	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	EMeOH	12,33±0,33 ^b	12±0,58	8±0,58	27±00 ^a
	Décocté	6±0 ^d	6,33±0,33	6±0	
	n-hexane	10,67±0,33 ^c	9,33±0,67	8,67±0,33	
<i>P.aeruginosa</i> Pat.	EMeOH	11,33±0,33 ^b	9,33±0,33	8,67±0,33	18±0,57 ^a
	Décocté	6,33±0,33 ^c	6±0	6±0	
	n-hexane	6,67±0,67 ^c	6,33±0,33	6,33±0,33	
<i>A.baumannii</i> ATCC	EMeOH	24±0,58 ^a	16,67±0,33	13±0	18,67±0,33 ^b
	Décocté	13,67±0,33 ^c	10,67±0,67	9,33±0,33	
	n-hexane	13,33±0,33 ^c	11,67±0,33	10±0	
<i>A.baumannii</i> Pat.	EMeOH	26,67±0,33 ^a	14,33±0,88	12,67±0,67	21,67±0,33 ^b
	Décocté	12,33±0,33 ^c	10,33±0,33	8,67±0,33	
	n-hexane	10,33±0,33 ^d	8,33±0,33	8±0,58	
<i>Salmonella</i> Sp. Pat.	EMeOH	11,67±0,33 ^b	10,33±0,67	9±0	18,67±0,33 ^a
	Décocté	7,66±0,33 ^c	7,33±0,33	7±0	
	n-hexane	11±0,57 ^b	10,33±0,33	8±0,58	

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=3/ groupe

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative (p<0,05) entre l'activité des extraits à la dose de 200 mg/mL et l'antibiotique sur la même souche selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Tableau 6. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* sur les bactéries à gram positif

Souches	Extraits de feuilles	Doses mg/mL			Antibiotique
		200	100	50	
<i>S.aureus</i> ATCC	EMeOH	23±0,58 ^a	18,33±0,33	15±0,58	17,67±0,33 ^b
	Décocté	13,66±0,33 ^c	12±0,57	10,67±0,33	
	n-hexane	16±0,58 ^b	14,33±0,33	12±0	
SARM	EMeOH	21,67±0,67 ^a	16±0	15±0,58	14,33±0,33 ^b
	Décocté	13,33±0,33 ^b	11,67±0,67	9,33±0,33	
	n-hexane	15±0,58 ^b	13,33±0,33	12,33±0,33	
<i>S.epidermidis</i> ATCC	EMeOH	17,33±0,67 ^a	15±0,58	12,67±0,33	16,33±0,88 ^a
	Décocté	12,67±0,33 ^b	11±0,58	9,67±0,33	
	n-hexane	13±0 ^b	12±0,33	11,33±0,33	
<i>S.saprophyticus</i> Pat.	EMeOH	12,33±0,67 ^b	11,33±0,33	11±0	16,67±0,67 ^a
	Décocté	10±0,57 ^b	8,33±0,33	7±0	
	n-hexane	12,33±0,33 ^b	12±0	11,33±0,33	
<i>E.faecalis</i> ATCC	EMeOH	16±0,58 ^b	12,67±0,33	10,67±0,33	18,33±0,33 ^a
	Décocté	13,33±0,33 ^c	10±0	8,67±0,33	
	n-hexane	13,33±0,33 ^c	12±0	10,33±0,33	
<i>E.faecalis</i> Pat.	EMeOH	16,33±0,33 ^a	14±0	13,33±0,33	16±0,58 ^a
	Décocté	12±0 ^b	9,33±0,33	8,33±0,33	
	n-hexane	12,67±0,33 ^b	12,33±0,33	9,33±0,33	
<i>S.pneumoniae</i> ATCC	EMeOH	16±0 ^b	14,67±0,33	12,67±0,33	19±0 ^a
	Décocté	11,33±0,33 ^c	11±0	8,33±0,33	
	n-hexane	10,67±0,33 ^c	10±0,58	9±0,33	
<i>S.pneumoniae</i> Pat.	EMeOH	16,33±0,33 ^b	15±0,58	13±0	19,67±0,33 ^a
	Décocté	12,33±0,33 ^c	11,33±0,33	9±0	
	n-hexane	11±0,58 ^c	10,67±0,33	10,33±0,33	
<i>S.pyogenes</i> Pat.	EMeOH	15,67±0,33 ^a	14,67±0,33	11,6±0,67	17,67±0,67 ^a
	Décocté	12,33±0,33 ^b	10±0	9,67±0,33	
	n-hexane	11±0,58 ^b	10,67±0,33	8±0	

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=3/ groupe

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative (p<0,05) entre l'activité des extraits à la dose de 200 mg/mL et l'antibiotique sur la même souche selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Tableau 7. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* sur les bactéries à gram négatif

Souches	Extraits de fleurs	Doses mg/mL			Antibiotique
		200	100	50	
<i>E.coli</i> ATCC	EMeOH	11±0,58 ^b	10,33±0,33	10±0	28,33±0,33 ^a
	Décocté	7±0 ^c	6,67±0,33	6,33±0,33	
	n-hexane	10,33±0,33 ^b	8,67±0,33	8,33±0,33	
<i>E.coli</i> Pat.	EMeOH	12±0,57 ^b	10,67±0,67	10,33±0,33	27,33±0,33 ^a
	Décocté	7±0 ^c	7±0,58	6,67±0,33	
	n-hexane	12±0 ^b	10±0,58	9,67±0,33	
<i>K.pneumoniae</i> ATCC	EMeOH	6,67±0,33 ^b	6,33±0,33	6,33±0,33	24±0,57 ^a
	Décocté	6,33±0,33 ^b	6±0	6±0	
	n-hexane	6,67±0,67 ^b	6±0	6±0	
<i>K.pneumoniae</i> Pat.	EMeOH	6,67±0,67 ^b	6±0 ^b	6±0	23,33±0,33 ^a
	Décocté	6,67±0,33 ^b	6,33±0,33	6,33±0,33	
	n-hexane	7,33±0,33 ^b	6,67±0,33	6±0	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	EMeOH	11±0 ^b	9,33±0,33	7,33±0,66	27±00 ^a
	Décocté	6,33±0,33 ^c	6±0	6±0	
	n-hexane	10,67±0,33 ^b	9,33±0,33	9±0	
<i>P.aeruginosa</i> Pat.	EMeOH	11,33±0,33 ^b	8±0	7,33±0,33	18±0,57 ^a
	Décocté	6,67±0,67 ^c	6±0	6±0	
	n-hexane	8±0 ^c	7,67±0,33	6,67±0,33	
<i>A.baumannii</i> ATCC	EMeOH	20,67±0,67 ^a	14,33±0,33	11,33±0,33	18,67±0,33 ^b
	Décocté	12,67±0,33 ^c	10,33±0,33	9,67±0,33	
	n-hexane	11,67±0,33 ^c	11±0,58	9,33±0,33	
<i>A.baumannii</i> Pat.	EMeOH	25±0,58 ^a	14±0	10,33±0,33	21,67±0,33 ^b
	Décocté	13±0,58 ^c	9,67±0,67	8,33±0,33	
	n-hexane	10,67±0,33 ^d	9±0,58	8,33±0,33	
<i>Salmonella</i> Sp.	EMeOH	10,33±0,33 ^b	9,67±0,33	9,33±0,33	18,67±0,33 ^a
	Décocté	7,67±0,33 ^c	7±0	6,33±0,33	
	n-hexane	11,67±0,33 ^b	8,33±0,33	8±0	

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=3/ groupe

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative (p<0,05) entre l'activité des extraits à la dose de 200 mg/mL et l'antibiotique sur la même souche selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

Tableau 8. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de fleurs d'*Inula viscosa* sur les bactéries à gram positif

Souches	Extraits de fleurs	Doses mg/mL			Antibiotique
		200	100	50	
<i>S.aureus</i> ATCC	EMeOH	21,67±0,67 ^a	18±0	14,67±0,33	17,67±0,33 ^b
	Décocté	13,33±0,33 ^d	11,66±0,33	10±0,57	
	n-hexane	15,67±0,33 ^c	13,67±0,33	11,67±0,33	
SARM	EMeOH	19,33±0,33 ^a	16±0,58	12,33±0,33	14,33±0,33 ^{bc}
	Décocté	13±0 ^c	11±0,58	9,67±0,33	
	n-hexane	16±0,58 ^b	14±0,58	11,33±0,33	
<i>S.epidermidis</i> ATCC	EMeOH	15,33±0,33 ^{ab}	13,33±0,33	11,67±0,33	16,33±0,88 ^a
	Décocté	12±0,58 ^c	11±0,58	9,33±0,33	
	n-hexane	13,33±0,33 ^{bc}	13±0	10±0,58	
<i>S.saprophyticus</i> Pat.	EMeOH	12±0,57 ^b	11,67±0,33	10,67±0,67	16,67±0,67 ^a
	Décocté	9,33±0,33 ^c	8,33±0,33	7,67±0,33	
	n-hexane	12,33±0,33 ^b	11,33±0,33	11±0	
<i>E.faecalis</i> ATCC	EMeOH	16,67±0,67 ^a	13±0,58	11,33±0,33	18,33±0,33 ^a
	Décocté	13±0,57 ^b	9,67±0,67	8,33±0,33	
	n-hexane	13±0 ^b	12±0,33	10±0	
<i>E.faecalis</i> Pat.	EMeOH	15±0,58 ^a	13,67±0,33	12,33±0,33	16±0,58 ^a
	Décocté	12,67±0,33 ^b	9,33±0,67	9±0	
	n-hexane	12,33±0,33 ^b	11,33±0,33	9,33±0,33	
<i>S.pneumoniae</i> ATCC	EMeOH	13,33±0,3 ^b	12±0,57	10,67±0,33	19±0 ^a
	Décocté	10±0,57 ^c	9,67±0,33	8,33±0,33	
	n-hexane	10,67±0,67 ^c	9,33±0,33	8,33±0,33	
<i>S.pneumoniae</i> Pat.	EMeOH	15±0,58 ^b	12,33±0,33	11±0,58	19,67±0,33 ^a
	Décocté	11,67±0,33 ^c	10±0,58	8±0	
	n-hexane	11±0 ^c	10,33±0,33	9,67±0,33	
<i>S.pyogenes</i> Pat.	EMeOH	15,33±0,33 ^b	11,67±0,33	10±0	17,67±0,67 ^a
	Décocté	13±0,58 ^c	10,33±0,33	8,67±0,33	
	n-hexane	13,33±0,33 ^{bc}	11±0	10,33±0,33	

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM; n=3/ groupe

Différentes lettres alphabétique indiquent une différence significative (p<0,05) entre l'activité des extraits à la dose de 200 mg/mL et l'antibiotique sur la même souche selon le test ANOVA one way suivi par le test de Tukey.

APPENDICE J

Tableau 9. Résultats de la toxicité aiguë des extraits d'*Inula viscosa* L.

Lots	Dose (mg/Kg)	Nombre de souris morte	Symptômes
Témoin	Eau physiologique	0	-
EMeOH/F	400	0	-
	800	0	-
	2000	0	-
D/F	400	0	-
	800	0	-
	2000	0	-
EMeOH/Flr	400	0	-
	800	0	-
	2000	0	-
D/Flr	400	0	-
	800	0	-
	2000	0	-

APPENDICE K



Figure 3.a. Injection de la carragénine



Figure 3.b. Mesure de l'épaisseur de patte à l'aide d'un pied à coulisse



Figure 4. a. Injection de la suspension de levure de bière



Figure 4.b. Mesure de la température rectale des rats



Figure 5. Forme promastigote des leishmanies



Figure 6. Microplaque pour la lecture visuelle

TOXICITÉ AIGUË ET SUBAIGUË DES EXTRAITS MÉTHANOLIQUES D'*INULA VISCOSA* L. (*DITTRICHIA VISCOSA* L.)

OUAHCHIA Célia^{1*}, CHERIF Hamida-Saida¹, HAMAIDI-CHERGUI Fella¹, MARZEN Loubna¹, DERADJI Samira¹, HEMMA Rym¹, NOUAR Nouria² et SAIDI Fairouz¹

1. Université Blida1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé. Algérie.
2. CHU BENI MESSOUS. Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique. Algérie.

Reçu le 07/11/2017, Révisé le 18/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet : Beaucoup de travaux se sont intéressés à l'étude des effets thérapeutiques des plantes médicinales. Cependant elles doivent être utilisées avec une grande prudence car elles peuvent être toxiques.

Objectifs : C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à faire une étude de la toxicité aiguë et subaiguë des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* connue au Nord de l'Algérie sous le nom de Magrammane.

Méthodes : Pour l'étude de la toxicité aiguë, les extraits méthanoliques des feuilles et les fleurs ont été administrés en une seule fois, par voie orale à des souris albinos Swiss aux doses 400 mg/kg et 800mg/kg. Les souris ont été surveillées pendant 14 jours. Dans l'étude de la toxicité subaiguë, les extraits ont été administrés par voie orale à des rats Wistar aux doses 400 mg/kg et 800 mg/kg quotidiennement pendant 28 jours. Leur poids corporel a été surveillé durant la période expérimentale, alors que les paramètres hématologiques, biochimiques du sang et l'étude histo-pathologique des reins et des foies ont été évalués à la fin de l'expérience.

Résultats : Les résultats obtenus ont montré dans l'étude de la toxicité aiguë, qu'aucune des doses n'a entraîné la mort de souris. L'étude de la toxicité subaiguë n'a révélé que peu de changements significatifs dans le bilan biochimique, les ASAT ont diminuées significativement ($p < 0,01$) : 116,17 mg/L \pm 1,27 chez les rats traités avec l'EMeOH/F à la dose 800mg/Kg et l'urée a augmentée significativement ($p < 0,01$) : 0,50 mg/L \pm 0,05 chez les rats traités avec l'EMeOH/Flr à la dose 800 mg/Kg en comparaison avec les rats témoins. Aucun changement significatif n'a été constaté dans le bilan hématologique. Les organes sont restés intacts.

Conclusion : L'étude de la toxicité des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* n'a pas montré de signes de toxicité aiguë ou subaiguë aux doses étudiées.

Mots clés : Toxicité ; extrait méthanolique ; feuilles ; fleurs ; *Inula viscosa* L.

ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF *INULA VISCOSA* L. (*DITTRICHIA VISCOSA* L.) METHANOLIC EXTRACTS

Abstract

Description of the subject: Many studies have investigated the therapeutic effects of medicinal plants. However, they should be used with great caution because they may be toxic.

Objectives: The purpose of this study focuses on the acute and subacute toxicity of *Inula viscosa* L. methanolic extracts, known in North Algeria as Magrammane.

Methods: For the study of acute toxicity, the methanolic extracts of leaves and flowers were orally administered to Swiss albinos mice as single doses of 400 mg/kg and 800 mg/kg. The mice were observed over 14 days. In the sub-chronic toxicity study, the extracts were orally administered at doses of 400 mg/kg et 800 mg/kg to Wistar rats over 28 days. Their body weight was measured throughout the experimental period, while hematological, biochemical parameters and histopathological study of the kidney and liver were evaluated at the end of the experiment.

Results: The results obtained in the acute toxicity study show that none of the doses caused death in the treated mice. The study of sub-chronic toxicity revealed a slightly significant change in the biochemical balance, AST decreased significantly ($p < 0,01$): 116,17mg/Kg \pm 1,27 in groups of rats treated with EMeOH/F at the dose of 800mg/Kg, urea increased significantly ($p < 0,01$): 0,50mg/Kg \pm 0,05 in groups of rats treated with EMeOH/Flr at the dose of 800mg/Kg en compared to control group. No significant change were observed in the hematological balance. The organs studied have also remained intact.

Conclusion: The study of the toxicity of leaves and flowers of *Inula viscosa* L. methanolic extracts showed no acute toxicity or sub-chronic toxicity at the doses studied.

Keywords: Toxicity; methanolic extract; leaves; flowers; *Inula viscosa* L.

*Auteur correspondant: OUAHCHIA Célia; E-mail : ouahchiacelia@yahoo.fr.

INTRODUCTION

Depuis quelques années on constate un regain d'intérêt pour la phytothérapie, en effet de plus en plus de personnes ont recours aux plantes médicinales pour se soigner . [1].

Il convient de souligner que l'utilisation traditionnelle de toute plante à des fins thérapeutiques ne garantit en rien son innocuité [2]. Si les effets pharmacologiques de nombreuses plantes ont été prouvés dans divers laboratoires, leur toxicité est généralement méconnue. Par conséquent, l'évaluation de la toxicité des préparations à base de plantes est importante pour déterminer l'innocuité de ces remèdes [3].

Inula viscosa (L.) Aiton (syn. *Dittrichia viscosa* Greuter) [4], est une plante vivace qui appartient à la famille des *Asteraceae* qui évolue dans la majeure partie du bassin méditerranéen [5, 6]. Cette plante est utilisée depuis des années en médecine traditionnelle pour ses activités anti-inflammatoire, antipyrétique et antiseptique elle est également utilisée pour le traitement du diabète et le traitement de certains troubles gastro-duodénaux [7-15].

Inula viscosa contient certains composés pharmacologiquement actifs, y compris les sesquiterpènes, [11, 16], les azulènes, les lactones, les flavonoïdes et les huiles essentielles [8, 17, 18].

Le but de ce travail est d'étudier la toxicité aiguë et subaiguë des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* L. aux doses 400 mg/ Kg et 800 mg/Kg chez des souris et des rats.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Les feuilles et les fleurs de la plante ont été récoltées respectivement au mois d'Avril et Novembre 2015 dans la région de Tipaza (Wilaya de Tipaza, Algérie). Les échantillons ont été nettoyés, séchés à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les feuilles et/ou les fleurs ont été ensuite réduites en poudre et bien conservées jusqu'à leur utilisation.

2. Extraction

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un appareil : soxhlet, selon la méthode de William [19], la poudre végétale a été épuisée successivement par le n-hexane (fraction apolaire) ($C_6H_{14} \geq 95\%$ puriss, Sigma Aldrich, Allemagne) et le méthanol (fraction polaire) ($CH_4O \geq 99,7\%$ puriss, Sigma Aldrich, Allemagne), les extraits obtenus ont été concentrés à l'évaporateur rotatif (Stuart 300b, U.K). Le résidu sec est récupéré et pesé pour déterminer le rendement par la suite, il est conservé à 4°C dans des flacons opaques bien fermés jusqu'à leur utilisation.

3. Animaux

Pour l'étude de la toxicité aiguë des souris albinos Swiss des deux sexes pesant chacune entre 20-30g ont été utilisées. Pour l'étude de la toxicité sub-chronique des rats Wistar des deux sexes pesant entre 100-120g ont été utilisés. Ces animaux provenaient tous de l'Institut Pasteur d'Alger, les femelles utilisées étaient nullipares. Les animaux ont été distribués en groupes de 6 chacun (3 mâles et 3 femelles) par dose et par lot, les femelles et les mâles étaient séparés dans des cages différentes tout au long de l'étude et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture, à l'exception d'une courte période de jeûn avant l'administration par voie orale des doses d'extraits. Tous les animaux (souris et rats) ont été maintenus sous un cycle lumière / obscurité de 12/12 h, à température ($22 \pm 2^\circ C$) et humidité ($50 \pm 15\%$) constantes.

4. Toxicité aiguë

Le test de toxicité aiguë a été réalisé selon le protocole décrit par Costa-Silva et al., [20], les souris ont été divisées en 5 lots de 6 individus (3 mâles et 3 femelles) et acclimatées pendant une semaine avant de commencer l'expérience. Elles ont été maintenues à jeûn pendant 18 heures avant l'administration des différents extraits méthanoliques :

Le premier lot (témoin) a reçu de l'eau physiologique tandis que les groupes 2 et 3 ont reçu par voie orale en une seule administration l'extrait méthanolique des feuilles d'*Inula viscosa* (EMeOH/F) aux doses respectives de 400 et 800 mg/kg.

Les groupes 4 et 5 ont reçu par voie orale en une seule fois également l'extrait méthanolique des fleurs d'*Inula viscosa* (EMeOH/Flr) aux mêmes doses. Le changement du comportement général ou la mortalité des souris de chaque lot ont été surveillés durant 14 jours.

5. Toxicité subaiguë

Le test de toxicité subaiguë a été réalisé selon le protocole décrit par Silva et al., et Musa et al., [21, 22], les rats ont été divisés en 5 groupes (de 1 à 5) à raison de 6 rats par lot (3 mâles et 3 femelles) et leurs poids ont été enregistrés avant le début du traitement.

Le premier lot (groupe 1) qui a reçu de l'eau physiologique est utilisé comme lot de référence. Les groupes 2 et 3 ont reçu par voie orale l'EMeOH/F aux doses respectives de 400 et 800 mg/kg. Les groupes 4 et 5 ont également reçu également par voie orale l'EMeOH/Flr aux mêmes doses. Tous les traitements ont été administrés par voie orale une fois par jour pendant 28 jours. Les rats étaient observés à la recherche de signes d'anomalies pendant la période du traitement. En outre, leur poids corporel a été enregistré à la fin de chaque

semaine jusqu'au dernier jour du traitement. À la fin de l'expérimentation, les rats ont été mis à jeûn pendant 16h mais ont eu un accès libre à l'eau. Ils ont ensuite été anesthésiés avec de l'éther par inhalation, après décapitation le sang a été recueilli dans des tubes avec ou sans anticoagulant (éthylène diamine tétra Acétate), pour des études hématologiques et biochimiques. Les rats ont ensuite été disséqués et les organes tels que le cœur, le foie, les poumons, les reins et la rate ont été recueillis et pesés.

6. Mesure des paramètres hématologiques et biochimiques

L'analyse hématologique a été réalisée à l'aide d'un système automatique hématologique (Sysmex KX-21N). L'analyse biochimique du sang a été réalisée après centrifugation à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 10 min. Le sérum a été séparé et recueilli pour la réalisation des analyses. Les paramètres ont été déterminés à l'aide d'un automate biochimique (Roche Hitachi 902, Allemagne) avec le kit biochimique Spinreact (Espagne). (Tableau 1).

Tableau 1 : Paramètres hématologiques et biochimiques étudiés

Examens hématologiques	Examens biochimiques
Hématocrite (HCT), Taux d'hémoglobine (Hb), Nombre de Plaquettes (PLT), Numération globulaire (Erythrocytes : GR et Leucocytes : GB), Volume Corpusculaire Moyen (MCV), Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCHC), Lymphocytes (LYM).	Taux de glucose (Gly) Bilan hépatique : Aspartate Amino Transférase (ASAT) Alanine amino transférase (ALAT), Phosphatase alcaline (PA), Triglycérides (TG), Cholestérol totale (Chol.), Bilirubine totale (TB), et l'albumine (ALB). Bilan Rénal : Urée, Acide urique (AU), Créatinine (Créat), Protides (Prot), Albumine (Alb).

7. Examen histo-pathologique du foie et rein

Les échantillons des foies et des reins des rats traités avec la dose la plus élevée (800 mg/Kg) ont été fixés dans du formol à 10%, les organes ont subi une série de déshydratation dans des bains d'éthanol, et inclusion dans de la paraffine. Des coupes de 5µm ont été réalisées au microtome puis colorées par l'Hématoxyline et l'Éosine (H&E) et observées au microscope optique (Leica DM1000, Allemagne). Des photos des différentes coupes histologiques ont

été prises à l'aide d'une caméra numérique reliée à un logiciel (Microsystem Leica LAS EZ Framework, Allemagne)[23].

8. Analyse statistique

Les résultats de la toxicité sont exprimés en moyenne \pm erreur standard moyenne (\pm SEM). La comparaison des moyennes et des variances a été effectuée à l'aide du logiciel XLSTAT 2016 par le test ANOVA à un seul facteur suivi du test de Tukey.

RÉSULTATS

1. Toxicité aiguë

L'administration orale des extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr d'*Inula viscosa* L. n'a pas entraîné la mort de souris dans tous les lots traités. Les observations n'ont révélées aucun signe d'asthénie, de somnolence, d'anorexie, de diarrhée ou de réduction de la mobilité durant la période expérimentale. La dose létale 50 (DL₅₀) est donc supposée être supérieure aux doses testées (Tableau 2).

2. Toxicité subaiguë

2.1. Evolution du poids des rats

Comme le montre la figure (Fig. 1), le poids corporel des rats qui ont reçu les extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr aux différentes doses par voie orale pendant 28 jours a continué à augmenter chaque semaine jusqu'au 28^{ème} jour du traitement. Aucune différence significative n'a été observée en comparaison au poids corporel des rats témoins.

Tableau 2 : Résultats de la toxicité aiguës extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L.

	Dose (mg/Kg)	Nombre de souris morte	Symptômes
Témoin	0	0	-
EMeOH/F	400	0	-
	800	0	-
EMeOH/Flr	400	0	-
	800	0	-

EMeOH/F : Extrait Méthanolique des Feuilles ; EMeOH/Flr : Extrait Méthanolique des Fleurs.

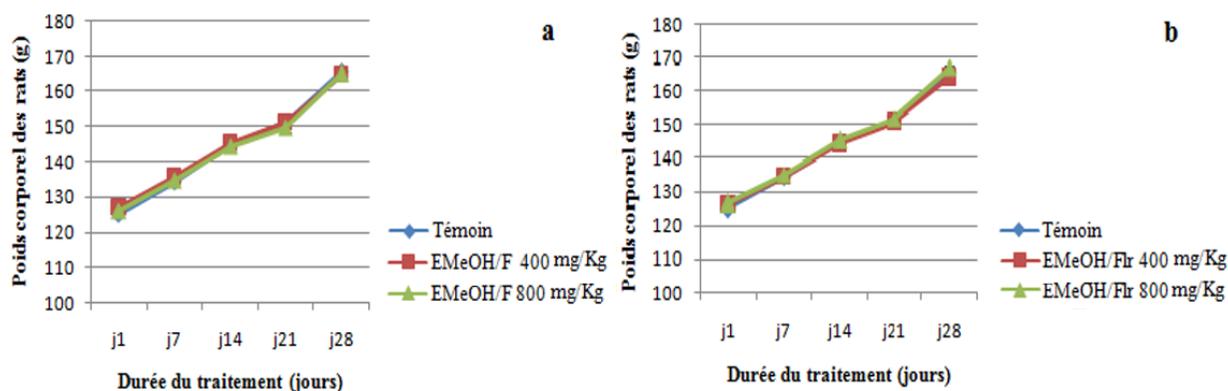


Figure 1 : Évolution du poids corporel des rats en fonction du temps

(a) Rats traités avec l'EMeOH/ F, (b) Rats traités avec l'EMeOH/ Flr

2.2. Poids des organes

L'examen macroscopique des différents organes après 4 semaines de gavage n'a montré aucun changement morphologique des organes des rats traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr d'*Inula viscosa* L. aux doses 400mg/kg

et 800mg/kg en comparaison avec les organes des rats non traités que ce soit pour la couleur ou la texture. Aucune différence significative n'a été observée entre le poids des différents organes des rats traités et celui des organes des rats témoins (Tableau 3).

Tableau 3 : Poids des organes des rats non traités et traités par les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa*L.

Organes	Poids des organes				
	Témoin	EMeOH/F		EMeOH/Flr	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
Foie	5,55 ± 0,07	5,24 ± 0,37	5,26 ± 0,07	5,5 ± 0,14	5,5 ± 0,06
Rein	0,47 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,04	0,47 ± 0,008	0,46 ± 0,007
Cœur	0,53 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,61 ± 0,007	0,47 ± 0,02
Poumon	1,19 ± 0,20	1,05 ± 0,10	1,17 ± 0,02	1,11 ± 0,06	1,08 ± 0,01
Rate	0,64 ± 0,09	0,53 ± 0,05	0,64 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,49 ± 0,08

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM ; n = 6 pour chaque groupe. $p > 0,05$ par rapport au groupe témoin.

Les données indiquent le poids des différents organes des rats traités par l'EMeOH/F et l'EMeOH/Flr aux doses 400mg/kg et 800mg/kg.

EMeOH/F : Extrait Méthanolique des Feuilles ; EMeOH/Flr : Extrait Méthanolique des Fleurs.

2.3. Analyses biochimiques et hématologiques

Les extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr n'ont entraîné aucun changement significatif dans le taux de la glycémie, des triglycérides, du cholestérol, et de l'albumine dans les lots traités aux doses 400mg/Kg et 800mg/Kg en comparaison avec le lot témoin.

Concernant le bilan hépatique (ASAT, ALAT, PA), aucune différence significative n'a été observée à l'exception de l'enzyme ASAT qui a diminué significativement ($p < 0,01$) dans le groupe de rats qui a reçu l'extrait MeOH/F à la dose 800mg/Kg en comparaison avec le lot témoin.

Une augmentation significative a été observée pour l'urée ($p < 0,01$) chez les rats du groupe qui a reçu l'extrait EMeOH/Flr à la dose 800mg/Kg. Cependant aucun changement significatif n'a été observé pour le taux de protéines sériques, de la créatinine et de l'acide urique dans tous les groupes traités par les deux extraits

aux différentes doses en comparaison avec le lot témoin (Tableau 4).

L'administration orale des extraits EMeOH/F et EMeOH/Flr quotidiennement pendant 28 jours n'a pas entraîné de changement significatif dans le bilan hématologique (WBC, HGB, RBC, HCT, PLT, MCV, MCH, MCHC et LYM) dans les groupes de rats traités aux différentes doses par rapport au témoin (Tableau 5).

2.4. Examen histopathologique des organes

La comparaison des organes : foie et rein des rats traités aux doses 800 mg/Kg avec ceux du témoin sain montre une architecture hépatique et rénale conservée, sans signe de cytolysse inhérente à une éventuelle toxicité des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs, il n'a pas été constaté de lésion organique ni de fibrose au niveau rénal ou hépatique. Des signes de congestions probablement dus au sacrifice ont été observés à la fois dans les lots traités et le lot témoin (Fig.2 et 3).

Tableau 4 : Paramètres biochimiques des rats traités et non traités par les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* L.

Paramètres	Paramètres biochimiques				
	Témoïn	EMeOH/F		EMeOH/Flr	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
Gly (g/L)	1,08±0,06	1,14±0,02	1,19±0,10	1,12±0,06	1,14±0,05
ASAT (UI/L)	131,17±3,14	127,83±2,53	116,17±1,27**	137,5±2,23	138,5±1,51
ALAT (UI/L)	52,83±2,53	53,67±1,94	52,5±2,73	53,83±2,31	54,17±2,13
PA (UI/L)	119±4,08	120,5±1,98	114,83±4,15	118,67±2,72	109,83±1,22
GT (UI/L)	1,83±0,48	1,5±0,34	2,83±0,48	2,33±0,42	3,00±0,37
BT (mg/L)	1,67±0,33	1,68±0,22	2±0,26	1,83±0,40	2,16±0,17
TG (g/L)	0,60±0,05	0,57±0,05	0,56±0,04	0,51±0,03	0,55±0,04
Chol (g/L)	0,67±0,06	0,45±0,01	0,49±0,03	0,46±0,02	0,47±0,03
Urée (mg/L)	0,36±0,02	0,37±0,01	0,33±0,02	0,36±0,03	0,50±0,05**
Créat (mg/L)	5,83±0,31	4,83±0,31	4,83±0,31	5±0,26	6,33±0,42
AU (mg/L)	20,83±0,75	21,5±2,09	22,33±1,20	21,33±1,40	22,67±0,49
Pro (g/L)	74,33±1,67	72,67±1,02	73,83±1,49	72,5±1,48	74±1,46
Albu (g/L)	32,83±1,08	33,33±1,05	32,67±2,29	32,67±1,66	32,33±2,29

Les valeurs représentent : la moyenne ± SEM ; n = 6 pour chaque groupe.

** p<0.01 par rapport au groupe témoïn.

EMeOH/F : Extrait Méthanolique des Feuilles ; EMeOH/Flr : Extrait Méthanolique des Fleurs.

Tableau 5 : Paramètres hématologiques des rats traités et non traités par les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs

Paramètres	Paramètres hématologiques				
	Témoïn	EMeOH/F		EMeOH/Flr	
		Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg	Dose 400mg/kg	Dose 800mg/kg
WBC ×10 ³ /μl	7,91±0,55	7,7±0,23	9,05±0,39	7,78±0,48	8,14±0,34
HGB (g/DI)	13,58±0,38	13,35±0,35	13,13±0,48	13,2±0,41	13,73±0,40
RBC ×10 ⁶ /μl	7,52±0,29	7,45±0,2	7,98±0,26	7,28±0,19	8,22±0,30
HCT %	47,95±2,68	53,53±3,64	50,95±1,02	48,93±2,93	51,71±1,39
PLT ×10 ³ /μl	713,33±70,18	727,66±39,68	700,33±37,28	716±24,41	681,66±36,62
MCV FI	58,68±1,77	58,7±1,39	60,26±0,86	58,71±0,91	59,41±0,90
MCH pg	16,63±0,41	16,63±0,47	16,78±0,22	16,76±0,20	16,63±0,24
MCHC g/DI	28,28±0,59	28,25±0,47	29±0,15	28,03±0,33	28,21±0,54
LYM %	81,38±4,83	81,71±4,08	85,68±3,11	78,83±3,5	82,33±3,19

Les valeurs représentent : la moyenne ± SEM ; n = 6 pour chaque groupe ; p>0.05 par rapport au groupe témoïn.

EMeOH/F : Extrait Méthanolique des Feuilles ; EMeOH/Flr : Extrait Méthanolique des Fleurs.

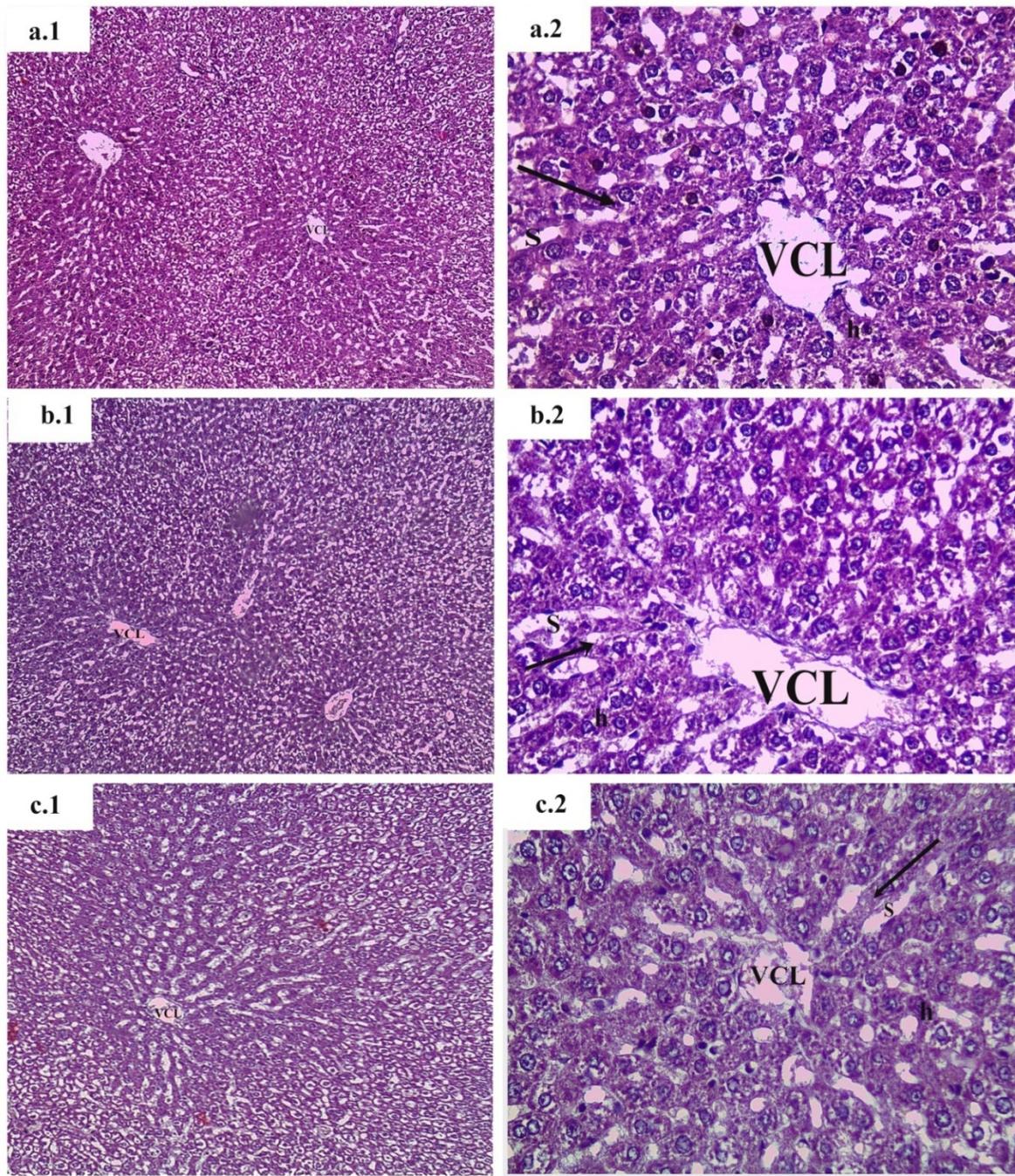


Figure 2 : Histologie du foie des rats témoins (**a.1** : GX10 ; **a.2** : GX40), des rats traités EMeOH/ F à la dose 800mg/Kg (**b.1** : GX10 ; **b.2** : GX40), des rats traités EMeOH/ Flr à la dose 800mg/Kg (**c.1** : GX10 ; **c.2** : GX40).

VCL : Veine Centrolobulaire ; Lames d'hépatocytes en disposition radiaire autour de la veine centrolobulaire (flèche) ; h :hépatocyte ; S : Sinusoïde (a.2 ; b.2 ; c.2) ; Coloration H&E .

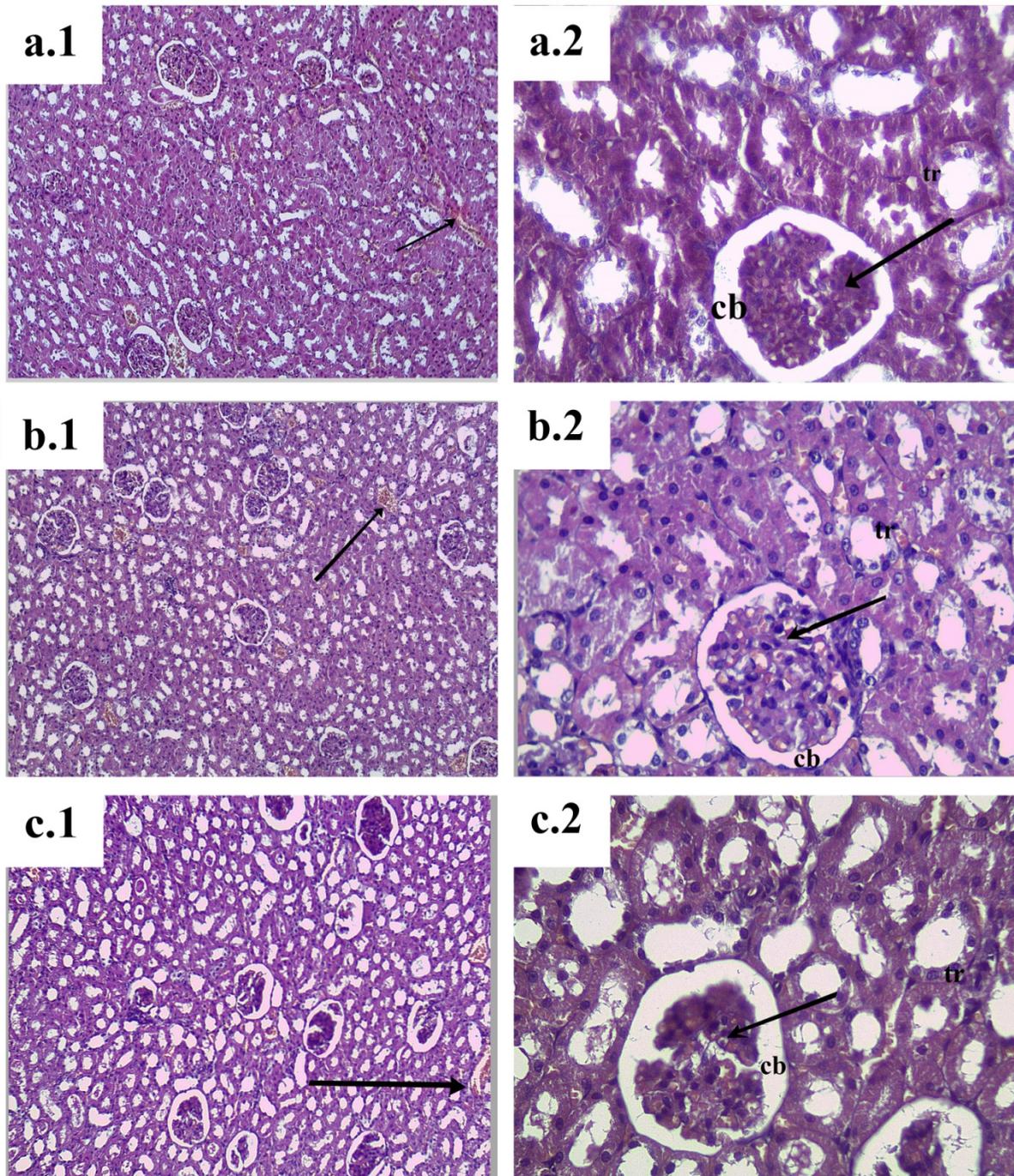


Figure 3 : Histologie du rein des rats témoins (**a.1** : GX10 ; **a.2** : GX40), des rats traités EMeOH/ F à la dose 800mg/Kg (**b.1** : GX10 ; **b.2** : GX40), des rats traités EMeOH/ Flr à la dose 800mg/Kg (**c.1** : GX10; **c.2** : GX40).

Congestion (flèche : a.1 ; b.1 ; c.1) ; Parenchyme rénal : glomérule (flèche : a.2 ; b.2 ; c.2) ; tr : tube rénal (a.2 ; b.2 ; c.2) ; cb : chambre ou espace de bowman; Coloration H&E

DISCUSSION

Bien que les plantes médicinales ont de nombreuses activités biologiques, on connaît très peu le potentiel toxique de ses substances bioactives [24]. *Inula viscosa* L. est une plante largement répandue dans la majeure partie des pays méditerranéens. Elle est utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour ses nombreux effets thérapeutiques [25].

La présente étude montre que les extraits MeOH/F et MeOH/Flr d'*Inula viscosa* L. n'ont entraîné ni la mort ni de changements de comportement des souris qui ont reçu par voie orale en une seule administration les extraits aux doses 400mg/Kg et 800mg/Kg.

Étant donné qu'aucun effet toxique n'a été observé au cours de l'étude de la toxicité aiguë, une étude supplémentaire a été menée pour évaluer la toxicité sub-chronique des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L. durant une expérimentation de 28 jours chez le rat.

Les modifications du poids corporel ont été utilisées comme indicateur des effets indésirables des médicaments, des produits chimiques et des substances bioactives [26,27].

Étant donné qu'aucun changement significatif du poids corporel n'a été observé chez les rats des groupes traités par rapport au témoin après un traitement quotidien durant 28 jours, on suggère que l'administration orale et sub-chronique des extraits n'a pas d'effet sur la croissance normale des rats. Une perte d'appétit entraîne souvent une perte de poids due à des perturbations dans le métabolisme des glucides, des protéines ou des graisses [28, 29, 30, 31].

De même, aucun changement significatif n'a été observé dans le poids des organes : le cœur, le foie, la rate, les reins et les poumons, suggérant que l'administration des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L. n'a eu aucun effet sur leur croissance normale. Le poids relatif des organes est considéré comme étant un indicateur relativement sensible dans les études de toxicité [32].

Les hépatocytes ont pour rôle la neutralisation des toxines, qu'elles proviennent de l'intérieur ou de l'extérieur de l'organisme (détoxification), alors que le rein a pour rôle l'épuration du sang et l'élimination des déchets [33]. L'analyse de la fonction du foie et du rein est donc très importante dans l'évaluation de la toxicité des médicaments et des extraits végétaux car ils sont nécessaires à la survie d'un organisme [34].

Ainsi des analyses hématologiques et biochimiques ont été effectuées pour évaluer les éventuelles altérations des fonctions hépatiques et rénales provoquées par l'ingestion des extraits. L'augmentation des niveaux d'ASAT et d'ALAT dans le sang est due à leur libération suite à l'endommagement des cellules hépatiques [35, 36, 37, 38, 39].

L'administration sub-chronique d'EMeOH/F à la dose 800 mg/Kg a entraîné une diminution significative des niveaux de l'enzyme ASAT chez les rats traités. Ces observations peuvent suggérer que l'EMeOH/F d'*Inula viscosa* aurait des effets hépatoprotecteurs surtout qu'aucun changement n'a été observé dans l'étude histopathologique. Selon Atsamo et al., ; Gome et al., ; Luka et al., ; Da Silva et al., ; Adewale et al. [3, 40, 41, 42, 43], une diminution des enzymes hépatiques ASAT et/ou ALAT et/ou PA pourrait indiquer un effet hépatoprotecteur de la plante, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

Un dysfonctionnement rénal peut être évalué par des mesures simultanées de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique [27, 44, 45, 46]. Dans la présente étude, les changements dans les niveaux plasmatiques de l'urée des rats traités par l'EMeOH/Flr à la dose 800mg/Kg ne peuvent à eux seuls indiquer une altération de la fonction rénale étant donné qu'aucune différence significative n'a été retrouvée entre les taux de créatinine et d'acide urique des rats traités et ceux des rats témoins. D'autant plus que l'étude histologique n'a montré aucune altération de la structure rénale.

D'après Gregg et Voigt ; Mukinda et al., [47, 48], l'analyse des paramètres sanguins est pertinente car elle donne des informations sur la fonction hématopoïétique (évaluation des cellules de la lignée myéloïde), sur l'apparition d'allergies (études des globules blancs) et sur les effets intravasculaires comme l'hémolyse. Le bilan hématologique n'a montré aucune différence significative entre les rats traités et les rats témoins.

CONCLUSION

L'administration par voie orale des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa* L. n'a pas montré de toxicité aiguë chez les souris aux doses étudiées.

L'étude de la toxicité subaiguë chez les rats n'a pas montré de toxicité de l'extrait méthanolique des feuilles aux doses administrées. Concernant l'extrait méthanolique des fleurs il serait intéressant de prolonger la durée d'administration de cette extrait afin d'observer d'éventuels effets sur le rein.

L'étude histologique des organes (foies et reins) à la dose 800mg/Kg n'a pas montré de signe de toxicité des extraits méthanoliques. Toutefois il serait judicieux d'étudier la toxicité chronique de ces extraits à des doses plus élevées ainsi que la toxicité des extraits aqueux et des extraits apolaires (n-hexane).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **WHO. (2007).** WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines With Reference to Contaminants and Residues. World Health Organization, Geneva, 105 p.
- [2]. **Ukwuani, A. N., Abubakar, M. G., Hassan, S.W. & Agaie, B.M. (2012).** Toxicological studies of hydromethanolic leaves extract of *Grewia crenata*. *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research*, 4: 245–249.
- [3]. **Atsamo, A.D., Nguelfack, T.B., Datté, J.Y. & Kamanyi, A. (2011).** Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 697–702.
- [4]. **Brullo, S. & De Marco, G. (2000).** Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae). *Portugaliae Acta Biology*, 19: 341-354.
- [5]. **Al-Eisawi, D. (1998).** Field guide to wild flowers in Jordan and neighbouring countries. *Jordan Foundation Press, Amman, Jordan*, 296 p.
- [6]. **Al-Dissi, N.M., Salhab, A.S. & Al-Hajj, H.A. (2001).** Effects of *inula viscosa* leaf extract on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 117–121.
- [7]. **Barbetti, P., Chiappini, I., Fardella, G. & Menghini, A. (1985).** A new eudesmane acid from *Dittrichia (Inula) viscosa*. *Planta Medica*, 51(5): 471.
- [8]. **Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, L. & Palevitch, D. (1987).** Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19: 145–151.
- [9]. **Lauro, L. & Rolih, C. (1990).** Observations and research on an extract of *Inula viscosa*. *Bollettino della Societa Italiona di Biologia Sperimentale*, 66: 829-834.
- [10]. **Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R.M., Faidi, Y.R., Salem, K. & Al-Nuri, M.A. (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60:265–71.
- [11]. **Fontana, G., LaRocca, S., Passannanti, S. & Paternostro, M. (2007).** Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 2: 824–827.
- [12]. **Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A. & Lemhadri, A. (2007).** The use of medicinal plants in the treatment of diabetes in Morocco. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytotherapie*, 5: 194–203.
- [13]. **Hernandez, V., Manez, S., Recio, M.C., Giner, R.M. & Rios, J.L. (2005).** Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with pharmacophoric conjugated diene. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 26, 162-169.
- [14]. **Manez, S., Hernandez, V., Giner, R.M., Rios, J.L. & Recio, M.C. (2007).** Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*. 78, 329-331.
- [15]. **Amin, S., Kaloo, Z.A., Singh, S. & Altaf, T. (2013).** Medicinal importance of Genus *Inula*- a review. *International Journal of Current Research and Review*, 05 (02):20-26.
- [16]. **Marongiu, B., Piras, A., Pani, F., Porcedda, S. & Ballero, M. (2003).** Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 505–509.
- [17]. **Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M. & Ríos, J.-L. (2007).** Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences*. 81, 480-488.

- [18]. Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V. & Puccini, V. (2002). Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, 44: 153–156.
- [19]. William B.J. (2007). The original of soxhlet extractor. *Journal of Chemical Education*, 84: 1913-1915.
- [20]. Costa-Silva, J.H., Lima, C.R., Silva, E.J.R., Araujo, A.V., Fraga, M.C.C.A., Ribeiro, A., Arruda, A.C., Lafayette, S.S.L. & Wanderley, A.G. (2008). Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 495–500.
- [21]. Silva, E.J.R., Gonçalves, E.S., Aguiar, F., Evencio, L.B., Lyra, M.M.A., Coelho, M.C.O.C., Fraga, M.C.C.A. & Wanderley, A.G. (2007). Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. *Phytotherapy Research*, 21: 332–336.
- [22]. Musa, A.H., Kumar Vata, P., Gebru, G., Mekonnen, Y., Debella, A., Makonnen. (2016). Biochemical and hematological study on butznol fraction of leaves of *Moringa Stenopetala* in Experimental rats. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 6(5): 2319-4219.
- [23]. Mcmanus, J.G.A. & Mowry, R.W. (1984). Staining Methods: Histological and Histochemical; Harper and Row: New York, NY, USA, 1009 p.
- [24]. Rosidah, Yam, M.F., Sadikun, A., Ahmad, M., Akowuah, G.A. & Asmawi. M. Z. (2009). Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123:244–249.
- [25]. Susplugas, C., Balansard, G. & Julien, J. (1980). Evidence of anthelmintic action of aerial part from *Inula viscosa* Ait. *Herba Hung*, 19: 19-33.
- [26]. Theo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A. & Khetani V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in sprague-Dawly rats. *Toxicology*, 179:183-196.
- [27]. Hilaly, J.E., Israili, Z.H. & Lyouss, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 43–50.
- [28]. Klaassen, C. D., Casarett, L.J. & Doull, J. (2001). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Press, New York, NY, USA, 1236 p.
- [29]. Ezeonwumelu, J.O. C., Julius, A.K., Muhoho, C. N., Ajayi, A.M., Oyewale, A. A., Tanayen, J. K., Balogun, S.O., Ibrahim, A., Adzu, A., Adiukwu, C.P., Oloro, J., Kiplagat, D.M., Goji, A.D.T., Okoruwa, A.G., Onchweri, A.N. & Reddy, P.M. K. (2011). Biochemical and histological studies of aqueous extract of *Bidens pilosa* leaves from Ugandan Rift Valley in Rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(6): 302–309.
- [30]. Chokshi, D. (2007). Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 45 (1): 32–40.
- [31]. Tahraoui, A., Israili, Z.H. & Lyoussi, B. (2010). Acute and sub-chronic toxicity of lyophilized aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132:48-55.
- [32]. Kluwe, W. M. (1981). Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 57 (3): 414–424.
- [33]. Lullmann-Rauch, R. (2008). Histologie. de Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique. 704p.
- [34]. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245:194–205.
- [35]. Wolf, P.L., Williams, D., Tsudaka, T. & Acosta, L. (1972). Methods and Techniques in Clinical Chemistry. John Wiley & Sons, USA, 516 p.
- [36]. Burger, C., Fischer, D.R., Cordenunzi, D.A., Batschauer, A.P.B., Filho, V.C. & Soares, A.R.S. (2005). Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. *Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 8: 370–373.

- [37]. Ramaiah, S.K. (2011). Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31 (1): 161–172.
- [38]. Ahmada, M., Lima, C.P., Akowvuaahb, G.A., Ismaila, N.N. Hashima, M.A., Hora, S.Y., Anga, L.F. & Yama, M.F. (2013). Safety assessment of standardized methanol extract of *Cinnamomum burmanni*. *Phytomedicine*, 20: 1124-1130.
- [39]. Aïssatou, D.S., Ngatchic Metsagang, J.T., Dongmo Sokeng, C. & Nijintang, Y. (2017). Anthihyperlipidemic and hypolipidemic properties of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze (Discoreales : Discoreaceae) tuber's aqueous extracts in the rats. *Brizilian Journal of Biological Sciences*, 4(7): 67-80.
- [40]. Gome, A.M.B., Kouakou, K., Toure, A., & Traore, F. (2011). Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5): 1777-1789.
- [41]. Luka, J., Badau, S.J., Mbaya, A.W., Gadzama, J.J. & Kumshe, H.A. (2014). Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 153 (1), 268–273.
- [42]. Da Silva, A.R.H., Reginato, F.Z., Guex, C.G., Figueredo, K.C., Araldi, I.C.D.C., De Freitas, R.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Melazzo De Andrade Mazzanti, C., Hübscher, G.H. & Bauermann, L.D.F. (2015). Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 74:170-177.
- [43]. Adewale, O.B., Onasanya, A., Anadozie, S.O., Abu, M.F., Akintan, I.A., Ogbole, C.J., Olayide, I.I., Afolabi, O.B., Jaiyesimi, K.F., Ajiboye, B.O. & Fadaka, A.O. (2016). Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of *Crassocephalum rubens* leaves in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 188: 153–158.
- [44]. Serge, B. (1985). Révision accélérée en biochimie clinique. Paris : Maloine, 384 p.
- [45]. Davis, M. E. & Bredt, N. D. (1994). Renal methods for toxicity, in Hayes AWC (ed) Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed Raven Press, New York, NY, USA, 871 p.
- [46]. Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A.K. & Vernekar, S.N. (2010). Markers of renal function tests. *The American Journal of Medical Sciences*, 2 (4): 170–173.
- [47]. Gregg, L.V. & Voigt, D.V.M. (2000). Hematology techniques and concepts for veterinary technicians. USA: Iowa State University Press, p 95-101.
- [48]. Mukinda, J.T. & Syce, J.A. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 138–144.

Paris, le 19/02/2019

À l'attention de Mme C. Ouahchia
Laboratoire de Biotechnologies
Environnement et Santé
Université Saad Dahlab –
Blida 1, Algérie

Chère Madame,

Conformément à votre demande, les éditions Lavoisier attestent avoir accepté pour publication dans la revue *Phytothérapie*, l'article suivant : *Total phenolic content, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of some extracts of Inula viscosa (L.) from Algeria* (2019) C. Ouahchia, F. Hamaidi-Chergui, H-S. Cherif, R. Hemma, I. Negab, K. Azine, F. Saidi, dont vous êtes l'un des auteurs.

Cet article sera publié en ligne en 2019 sur le site de la revue (<https://phyto.revuesonline.com>), puis ultérieurement dans la version papier de la revue, ce dont vous serez informée.

Nous vous remercions de votre confiance et vous prions, Chère Madame, d'agréer l'expression de nos plus sincères salutations

Chère Madame,



Librairie



Editions



Diffusion



Datec

Siège social :
14 rue de Provigny
94236 Cachan cedex - France
tél. : +33 (0)1 47 40 67 00
fax : +33 (0)1 47 40 67 02
web : www.lavoisier.fr
e-mail : info@lavoisier.fr

SAS au capital de : 1.527.900 €
RCS : Créteil 542 029 376
Siret : 542 029 376 00044
N° de TVA / VAT : FR 25542029376

LAVOISIER SAS
14, rue de Provigny
94230 CACHAN - FRANCE
N° SIREN : 542 029 376


Yvonne Berthelot
Responsable d'édition / Publishing Editor

Lavoisier S.A.S
14, rue de Provigny
94230 Cachan Cedex - France
Tél : 01 47 40 67 24 | Mobile : 06 95 87 45 22
www.lavoisier.fr

Nous vous remercions de votre confiance et vous prions, Chère Madame, d'agréer l'expression de nos plus sincères salutations

