

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère
de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Agro-alimentaire

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de master en

Spécialité : Nutrition et pathologie

Filière : Sciences agroalimentaire

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et
antibactérienne des extraits de racine du Costus**

(*Saussurea lappa*)

Présenter par : **ZIUI Khaled** et **BENBETKA Selma**

Devant le jury :

Dr ABDELLAOUI Zakia	Maitre de conférences B	Présidente
Dr HADJADJ Naima	Maitre de conférences B	Examinatrice
Dr KOUIDRI Amel	Maitre de conférences A	Promotrice
Mme KETFI Sabrina	Ingénieur	Co-promotrice

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à Dr KOUIDRI Amel pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, Sa disponibilité, ses conseils et la confiance Qu'elle nous a accordé, nous ont permis de réaliser ce mémoire .

Nos profonds remerciements à notre Co-promotrice Mme Ketfi qui n'a pas cessé de nous diriger et de nous transmettre tout son savoir jusqu'à la fin de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Dr ABDELLAOUI Zakia d'avoir accepté de présider le jury. Nous tenons également nos vifs remerciements à Dr HADJADJ Naima, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Nous ne saurons remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail. On cite spécialement AITAMAR Imene Chef de laboratoire de toxicologie à NOVAPHARM qui n'a laissée aucun effort pour venir à notre aide. Et aussi à toute l'équipe NOVAPHARM pour leur précieuse aide.

Nous remercions nos Familles pour tout le soutien qu'ils nous apportent.

Dédicace

Je dédie ce travail

À mon cher papa

À ma chère maman

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

À mes deux frères Abdelkrim et Mohamed Réda

À ma sœur Ranya

À toute ma famille et mes amis

À toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Selma

Dédicace

Je dédie ce projet :

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mon frère, Tarek

A ma chère sœur et ses petits anges, Hiba et Sohaib

Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A mon cher binôme, Selma,

Pour son entente et sa sympathie.

A mes chers amis, Oussama, Nassim, Hamza et Amine.

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

A toute ma famille,

A tous mes autres ami(e)s,

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Khaled

Tables des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I.1 Généralité	4
I.2 Historique et origine	4
I.3 Classification et Description morphologique	5
I.3.1 Classification	5
I.3.2 Description morphologique	5
I.4 Utilisations du costus	7
I.5 Composition chimique.....	10
I.5.1 Les terpènes	10
I.5.1.1 Les Monoterpènes	11
I.5.1.2 Les sesquiterpènes	11
I.5.2 Les flavonoïdes	12
I.5.3 Les tannins.....	13
I.5.4 Les coumarines.....	14
I.5.5 Les alcaloïdes	14
I.6 Le Criblage phyto-chimique de différents extraits du costus	14
I.7 Les constituants biologiquement actifs du costus	15
I.8 Effet anti inflammatoire	17
I.8.1 Définition de l'inflammation	17
I.8.2 Les types d'inflammation	17
I.8.2.1 L'inflammation aiguë	17
I.8.2.2 L'inflammation chronique	17
I.8.3 Les molécules biologiquement actives dans le traitement de l'inflammation	18
I.8.3.1 Dehydrocostus lactone	18
I.8.3.2 L'extrait d'éthanol	18
I.8.3.3 Cynaropicrine	19
I.9 Activité antioxydante.....	19
I.9.1 Les radicaux libres	19
I.9.1.1 Définition des radicaux libres	19
I.9.1.2 Formation des radicaux libres.....	19

I.9.1.3	Les principales espèces réactives de l'oxygène	20
I.9.2	Le stress oxydant.....	20
I.9.2.1	Définition Le stress oxydatif.....	20
I.9.2.2	Origine du stress oxydant.....	20
I.9.2.3	Effets du stress oxydant sur l'organisme	21
I.9.2.4	Principales affections liées au stress oxydant	21
I.9.3	Les antioxydants.....	22
I.9.3.1	Endogène : Les systèmes de défense enzymatiques des radicaux libres	22
I.9.3.2	Exogène	22
I.10	les molécules biologiquement actives dans le traitement du cancer.....	23
I.10.1.1	Costunolide	23
I.10.1.2	La mokkolactone	24
I.10.1.3	L'extrait d'hexane	24
I.11	Effet Anti-ulcère et cholagogue.....	24
I.11.1	Les molécules biologiquement actives dans le traitement des ulcères	24
I.11.1.1	L'extrait d'acétone	24
I.11.1.2	Costunolide	25
I.11.1.3	Saussureamines	25
I.11.1.4	Extrait éthanolique	25
I.12	Les molécules biologiquement actives ayants un effet immunomodulateur.	25
I.12.1	Le Costunolide et la déhydrocostus lactone	25
I.13	Effet antimicrobien	26
I.14	Activité anti-hépatotoxique.....	26
I.15	Effet Hypolipidémiant	26
I.16	Effet cardioprotecteur	26
I.17	Effet anticonvulsif.....	26
II.	Partie 2 : Matériel et methodes	27
II.1	Lieu de stage	28
II.2	Matériel végétal	28
II.3	Le criblage phytochimique de la poudre de costus	29
II.3.1	Test de présence des saponines	29
II.3.2	Test de présence des tannins	29
II.3.3	Test des triterpènes	29
II.3.4	Test des flavonoïdes	29
II.4	Préparation des extraits du costus	29

II.4.1	Préparation de l'extrait brut de la poudre de racine de <i>Saussurea lappa</i> par Extraction au Soxhlet	29
II.4.2	Préparation de l'extrait brut de la poudre de racine de <i>Saussurea lappa</i> par macération	31
II.4.3	Calcul des rendements des extractions des principes actifs	32
II.5	Détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH	33
II.5.1	Préparation de la solution mère de DPPH	33
II.5.2	Préparation des différentes concentrations	33
II.5.3	Expression des résultats	34
II.5.3.1	Calcul des pourcentages d'inhibition	34
II.5.3.2	Calcul d'IC ₅₀	34
II.6	Détermination de l'activité antibactérienne	35
II.6.1	Principe	35
II.6.2	Mode opératoire : d'après le protocole de (Neggaz, 2002).	35
II.6.2.1	Préparation de l'extrait	35
II.6.2.2	Préparation de pré-culture bactérienne	35
II.6.2.3	Ensemencement	36
II.6.2.4	Préparation des disques	36
II.6.2.5	Incubation	36
II.6.2.6	Lecteur des résultats	36
III.	Partie 3 : Résultats et discussion	37
III.1	méthodes d'extraction et le rendement du costus (<i>Saussurea lappa</i>)	38
III.2	Le criblage phytochimique de la poudre du costus	39
III.3	Evaluation de l'activité antioxydante	39
III.4	La Détermination d'IC ₅₀	40
III.5	Evaluation de l'activité antibactérienne	43
	Conclusion	
	Références bibliographiques	

Résumé

Saussurea lappa connue sous le nom vernaculaire «costus » est une plante médicinale utilisé en médecine traditionnelle.

Les recherches actuelles sont focalisées sur les molécules douées d'activités biologiques d'origine naturelle. L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de deux extraits non volatile de racines du costus : extrait hydro alcoolique obtenus par macération (EMM) et extrait éthanolique au Soxhlet (EMS). Les rendements respectifs sont : 15.41% (m/m), 12.08 % (m/m).

Le screening phytochimiques a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, saponines.

D'une part L'activité antioxydante d'extrait éthanolique a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH. Des différentes concentrations d'échantillons (extrait éthanolique) (entre 100-800 µg/ml), a révélé que cette plante possède une activité antioxydante (IC₅₀= 681ug/ml), elle est capables de piéger le radical DPPH.

D'autre part, les tests de l'activité antibactérienne testée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, vis-à-vis de deux espèces bactériennes de référence, a montré que l'extrait hydroalcoolique, à la concentration de 120mg/ml, présente l'activité antibactérienne la plus importante sur les *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 15,58 mm. Aucune activité n'a été observée sur *Escherichia coli*.

Mots clés : *Saussurea lappa*, Costus, activité antioxydante, radical DPPH, activité antibactérienne

Abstract

Saussurea lappa known as vernacular "costus" is a medicinal plant used in traditional medicine. Current research is focused on molecules with biological activities of natural origin.

The objective of this study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of two costus root non-volatile extracts: hydro alcoholic extract obtained by maceration (EMM) and ethanolic extract with Soxhlet (EMS). The respective yields are 15.41% (m/m), 12.08% (m/m).

The phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, tannins, terpenoids and saponins.

On the one hand, the antioxidant activity of ethanolic extract was evaluated by the DPPH free radical scavenging test. Different concentrations of samples (ethanolic extract) (between 100-800 µg/ml), revealed that this plant has antioxidant activity (IC₅₀= 681ug/ml), it is able to trap the DPPH radical.

On the other hand, the antibacterial activity tested by the method of disc diffusion on agar medium, with respect to two reference bacterial species, showed that the hydroalcoholic extract, at the concentration of 120mg/ml, has the most important antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* with an inhibition diameter of 15.58 mm. No activity was observed on *Escherichia coli*.

Key words: *Saussurea lappa*, Costus, antioxidant activity, DPPH radical, antibacterial activity.

ملخص

Saussurea lappa المعروف بالاسم العام ****القسط الهندي**** هو نبات طبي يستخدم ف الطب التقليدي. تهتم العديد من البحوث العلمية حاليا بدراسة الفوائد الحيوية للجزيئات الطبيعية. تهدف هذه الدراسة الى تقدير النشاط المضاد للاكسدة و المضاد للمكروبات لمستخلص غير متطاير جذور نبتة القسط الهندي : مستخلص مائي كحولي متحصل عليه بواسطة النقع و مستخلص ايثانولي متحصل عليه بواسطة جهاز Soxhlet. قدر مردود الاستخلاص ب : 15.41% (ك/ك)، 12.08% (ك/ك) على التوالي . سمح الفحص الكيميائي-النباتي باظهار فلافونويدات ،دباغ ،تريينويدات . قدرالنشاط المضاد للاكسدة للمستخلص الايثانولي باستعمال اختبار DPPH. اظهرت تراكيز مختلفة من عينات (مستخلص الايثانولي)(بين 100-800ميكروغرام/مل) ان تركيز المثبط ل 50 % هو (681 ميكروغرام /مل). تم في هذه الدراسة ايضا تقييم النشاط المضاد للمكروبات، حيث بينت النتائج ان مستخلص مائي الكحول بتركيز (120 مغ /مل) يمتلك نشاط عالي ضد *staphylococcus aureus* بقطر تثبيط يبلغ قطره 15.58 مم و لم يلاحظ اي نشاط على *escherichia coli*.

الكلمات المفتاحية: *saussurea lappa*، قسط، النشاطية المضادة للاكسدة، radical dpph، النشاطية المضادة للبكتيريا.

Liste de figures

- Figure 1 Carte de l'inde montrant la distribution du costus
- Figure 2 champs de costus
- Figure 3 Partie florale du costus
- Figure 4 Racines du costus
- Figure 5 les aiguilles du costus
- Figure 6 Structure de base des flavonoïdes
- Figure 7 Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène
- Figure 8 La poudre du costus
- Figure 9 Les racines du costus
- Figure 10 Etapes de l'extraction au Soxhlet
- Figure 11 Broyage de la poudre du costus
- Figure 12 Étapes d'extraction du costus par macération
- Figure 13 Forme libre et réduite du test du DPPH
- Figure 14 Étapes du test de DPPH
- Figure 15 Extraction par macération
- Figure 16 Extraction au Soxhlet
- Figure 17 Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique du costus et de BHT.
- Figure 18 Concentration inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de 50% des radicaux DPPH (IC_{50})
- Figure 19 Concentration inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de 50% avec du BHT
- Figure 20 les résultats de l'antibiogramme de staphylococcus aureus
- Figure 21 les résultats de l'antibiogramme d'Escherichia coli

Liste des tableaux

- Tableau 1 les différents noms du *Saussurea Costus*
- Tableau 2 Hiérarchie taxonomique de *Saussurea Lappa C.B*
- Tableau 3 Méthodes d'applications traditionnelles du *Saussurea lappa*
- Tableau 4 Utilisation ethno médicales du *Saussurea lappa*
- Tableau 5 Les principaux monoterpènes du costus
- Tableau 6 Les principaux sesquiterpènes du costus
- Tableau 7 Les flavonoïdes isolés des racines de *Saussurea lappa*
- Tableau 8 Résultats du criblage phytochimique d'extraits de racine de *Saussurea lappa*
- Tableau 9 Constituants chimiques biologiquement actifs du costus
- Tableau 10 Espèces réactives de l'oxygène
- Tableau 11 préparation des dilutions
- Tableau 12 Résultat de rendement d'extraction.
- Tableau 13 Résultats du criblage phytochimique de la poudre de costus
- Tableau 14 diamètre des zones d'inhibition (en millimètre) de l'extrait hydroéthanolique du costus sur la croissance de la souche *staphylococcus aureus*

Introduction

Introduction

La phytothérapie est une ancienne discipline médicale. Cette médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies, continue à être utilisée, et au cours de ces dernières années sa popularité n'a fait qu'augmenter. Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. Elles sont influencées par des facteurs connus : la culture, l'histoire et les philosophies personnelles.

Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie. Ainsi, l'utilisation des remèdes à base de plantes connaît dernièrement un engouement sans précédent.

De plus en plus de gens sont à la recherche de médicaments "naturels" et il semblerait même que les cosmétiques et les produits d'entretien à base de plantes soient aujourd'hui de plus en plus utilisés. Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle. Le costus indien est l'une des plantes les plus utilisées dans l'axe de médecine traditionnelle, il attire récemment l'attention de plusieurs recherches au monde (**Rajender Kumar Sharma *et al*, 2014**), (**Mohammad Mansoob Khan *et al*, 2019**).

Les plantes médicinales sont d'une grande importance pour la santé des individus et des communautés. La valeur médicinale de ces plantes réside dans certaines substances chimiques actives qui produisent une action physiologique définie sur le corps humain. Les plus importants de ces constituants chimiquement actifs (bioactifs) des plantes sont les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes et les composés phénoliques. Plusieurs de ces plantes médicinales indigènes sont également utilisées à des fins médicinales (**Chandur *et al* ; 2011**).

C'est dans ce but s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire et antibactérienne de l'extrait brut des racines séchées du *Saussurea lappa*, connu sous le nom de Costus.

Ce travail est subdivisé en trois chapitres qui présentent l'intérêt de notre travail.

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique, et regroupe la présentation du costus sur le plan botanique et chimique ainsi que ces utilisations ethno-médicinales et pharmacologiques.

Le deuxième chapitre relatif aux méthodes expérimentales physicochimiques, biologiques électrochimiques avec l'appareillage utilisé.

Le troisième chapitre renferme les résultats obtenus et les discussions.

Et enfin une conclusion générale présente l'intérêt de notre travail.

I. PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Saussurea costus (généralité)

I.1 Généralité :

Saussurea lappa est une plante appartenant à la famille des *Astéracées* qui provient des hauts plateaux himalayens. Sa racine, aussi appelée racine costus, est aromatique et elle est utilisée en tant que plante médicinale. Elle contient divers composés comme les sesquiterpènes Costunolide et Dehydrocostuslactone, mais aussi des triterpènes, des phénols, des lignanes ainsi que de l'inuline. De nombreuses études ont mis en évidence ses propriétés notamment anti-infectieuses, anti-inflammatoire et anticancéreuses.

I.2 Historique et origine :

Le *Saussurea lappa* (*S. lappa*) est originaire de l'Inde, du Pakistan et de la Chine, et de la région de l'Himalaya où il pousse entre 2 500 et 3 500 m d'altitude (**Rao et al, 2013**).

En Inde, cette plante est endémique dans les régions subalpines du Jammu et Cachemire, de l'Himachal Pradesh et de l'Uttaranchal. (Figure 1)

Cette plante est connue depuis environ 2,500 ans et utilisée traditionnellement dans la médecine traditionnelle indienne (**Kuniyal et al., 2005**).

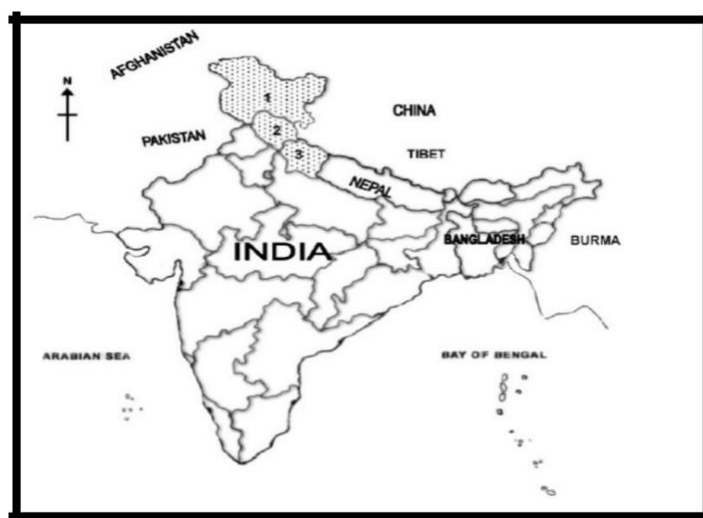


Figure 1 : Carte de l'Inde montrant la distribution du costus *Saussurea* :
1-Jammu et Kashmir 2-Himachal Pradesh, 3-Uttaranchal (**Kuniyal et al, 2005**)

Saussurea lappa Clarke généralement appelé costus ou kuth en anglais et en différentes langues :

Tableau 1 : les différents noms du *Saussurea* Costus

La langue	Le nom
En arabe	KUST
Hindi et bengali	Kut, Kur, Pachak
Indo-européen (Sanskrit)	Khstha
Nom commercial	Kuth

(**Kritikar, Basu ; 1987**)

I.3 Classification et Description morphologique :

I.3.1 Classification :

La famille des *Asteraceae* comprend environ 1000 genres et 30.000 espèces, réparties plus ou moins dans le monde entier, dont environ 177 genres et 1052 espèces se trouvent en Inde (**Rao et al, 1988**). Le genre *Saussurea DC.* De la même famille comprend environ 300 espèces dans le monde (**Bremer, 1994**) *Saussurea costus* une des espèces les plus connues.

Tableau 2 : Hiérarchie taxonomique de *Saussurea Lappa C.B*

Règne	<i>plantae</i>
Sous-règne	<i>viridiaeplantae</i>
Division	<i>tracheophyta</i>
Sous-division	<i>spermatophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Saussurea DC.</i>
Espèce	<i>S. lappa C.B. Clarke</i>

(Zahara et al, 2014)

I.3.2 Description morphologique :

Saussure lappa (SL) est une plante herbacée vivace dressée, robuste et haute, atteignant une hauteur de 1 à 2 m et dont la tige est bien dressée (**photo1**). La tige est robuste et fibreuse. Les feuilles sont lobées, pétiolées et mesurent environ 1 m de long. Les fleurs sont de couleur pourpre bleuâtre foncé à noires disposées en grappes axillaires. Les capitules sont dépourvus de tige, de forme dure et ronde, d'environ 3 à 5 cm de diamètre (**photo2**). Le fruit mesure environ 3 mm de long, est courbé en coupe et compressé (**Madhuri et al, 2011**).



Figure 2 champs de costus

Kuniyal, C. P., et al. (2019).



Figure 3 : Partie florale du costus

Kuniyal, C. P., et al. (2019).

La racine est grosse d'environ 60 cm et dégage une forte odeur caractéristique. La plupart du temps, l'huile essentielle de racine et la racine sont utilisées à des fins médicinales. La racine séchée qui a un goût légèrement amer est de couleur gris sale à jaune à l'extérieur et mesure environ **8 à 12 cm** de long, **1 à 3 cm** de diamètre (**photo 3**). Elle est généralement ridée, striée et les racines secondaires sont plus ou moins cylindriques (**Madhuri et al, 2011**).



Figure 4 : Racines du costus (**Photo originale ; 2020**)

I.4 Utilisations du costus :

Dans la médecine traditionnelle indienne (Ayurveda, Siddha et Unani), le costus est utilisé soit comme médicament unique, soit en combinaison avec d'autres médicaments. Ses racines sont principalement utilisées comme antispasmodique dans l'asthme, la toux et également dans le traitement du choléra, des maladies chroniques de la peau et des rhumatismes (Tableau3) (Chopra *et al*, 1956 ; Dhar *et al*, 1984).

Tableau 3 : Utilisation ethno médicales du Costus

Parties de la plante du costus	utilisations ethno médicales	Références
Racines	Dysenterie Ulcère maux d'estomac	Kala and Manjerkar (1999)
Décoction de racine	Toux et rhume	Singh (1999)
Racine / poudre de racine	Paludisme Lèpre hoquet persistant rhumatisme Lavant pour les cheveux stimulant astringent	Kapoor (2001)
Décoction de racine	Maux d'estomac maux de dents fièvre typhoïde	Nautiyal et al. (2003)
Racines	Utilisé pour protéger les vêtements d'insectes	Mittre (1981)
Racines	Asthme Dysenterie troubles cutanés maux de dents	Shah (1982)
Racines	Rhumatisme	Jain (1984)
Racines	Maux d'estomac	Rawat and Pangtey (1987)
Racines	Ulcère	Kaul (1941)

Ses différentes préparations sont également utilisées par les médecins ayurvédiques ¹ pour le traitement de diverses affections comme la toux et le rhume, le paludisme, la lèpre, le hoquet persistant, les rhumatismes, les maux d'estomac, les maux de dents, la fièvre typhoïde, etc. C'est un médicament important pour la goutte, l'érysipèle et favorise la spermatogenèse. Le costus a été utilisé par différentes personnes et tribus ethniques du nord de l'Inde pour le traitement de diverses maladies. (Tableau 4)(Tsarong, 1994).

¹ L'Ayurveda est une des médecines traditionnelles reconnues et répertoriées par l'OMS comme étant un système de santé naturel, traditionnel et intégratif.

Tableau 4 : Méthodes d'applications traditionnelles du Saussurea Costus :

Etats	Méthode d'application du costus	Références
Maux d'estomac	La poudre des racines prise avec de l'eau. La décoction des racines. La poudre de racine est torréfiée dans de l'huile de moutarde et la pâte est appliquée sur l'estomac.	Kumar (1989)
Maux de tête	L'huile du costus est chauffée avec des racines est appliquée au niveau des maux.	
Toux et rhume	La poudre de racine est prise avec de l'eau tiède.	
Infection de la gorge	La racine est mâchée.	
Mal de dos et douleur thoracique	La poudre de racine est prise avec du lait/décoction de poudre de racine/L'huile de racine chauffée et masser la zone touchée.	
Rhumatismes et douleurs au niveau des articulations	Les racines sont grillées dans du beurre et moulues, la poudre est prise avec du lait, le beurre obtenu est frotté sur la zone affectée et bandé pour rester chaud.	
Les rougeurs de peau formées après la piqûre d'insecte	La poudre de racine est grillée dans du beurre et le beurre est appliqué sur la zone affectée.	
Épuisement	Des morceaux de racine sont brûlés et la fumée inhalée.	
L'éclat et la croissance de Cheveux	Les cheveux sont lavés à la décoction. /L'huile de moutarde est chauffée avec de la poudre de racine et utilisée comme application topique sur les cheveux.	
Pustule	Une poudre de racine fine est saupoudrée sur la plaie. L'huile de moutarde est chauffée avec de la poudre de racine et l'huile est appliquée et bandée.	
Évanouissements	La racine est mise dans de l'eau, l'eau obtenue est utilisée comme gouttes nasales. La fine poudre de racine est utilisée pour les éternuements.	
Faiblesse générale	La racine est bouillie dans du lait et celui-ci est pris 2 fois par jour.	Bapalal (1998)
Épilepsie	Les racines sont prises avec du miel.	
gale	Appliquée huile essentielle de la racine.	

Chapitre II

Composition chimique du Costus

I.5 Composition chimique

I.5.1 Les terpènes :

Les terpènes représentent la classe la plus large et vaste de produits secondaires générés par les plantes. Chez les conifères, les terpènes s'accumulent en général au niveau des tissus des aiguilles, surtout en grande quantité dans les trichomes glandulaires de la face supérieure des aiguilles et ils sont également nombreux dans la résine présente dans le tronc (xylème et phloème) des conifères (Miller *et al*, 2005).



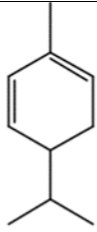
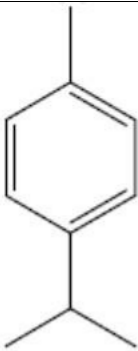
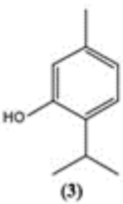
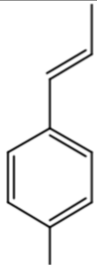
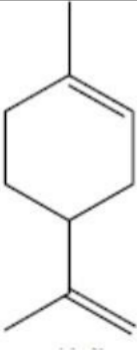
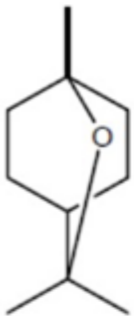
Figure 5 : les aiguilles du costus (Zahara *et al*, 2014)

Se situant en grande partie dans les tissus des aiguilles chez les conifères et dans la résine, les terpènes peuvent ainsi assurer plusieurs rôles différents chez les conifères. Les familles de molécules les plus connues pour être des agents de défense contre divers agresseurs pour les conifères sont en majorités les monoterpènes et les sesquiterpènes (Lewinsohn *et al*, 1990 ; Ibrahim *et al*, 2001).

I.5.1.1 Les Monoterpènes :

Les monoterpènes sont des éléments principaux des essences végétales (les huiles essentielles), **Singh, et al (2017)** regroupe les principaux monoterpènes en précisant leur structure chimique dans le (tableau 5).

Tableau 5 : Les principaux monoterpènes du costus

Phellandrène		p-cymène		Thymol	
Anethole		limonène		1,8 cinéol	

Singh, et al (2017)

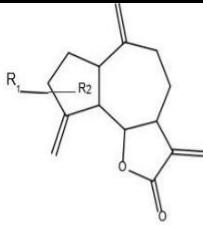
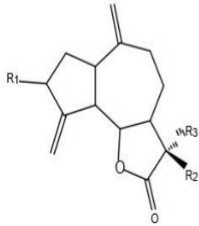
I.5.1.2 Les sesquiterpènes :

Les racines de *Saussurea lappa* sont des sources très riches de sesquiterpènes (tableau 6). En ce qui concerne leur squelette carbocyclique, ces sesquiterpènes appartiennent à trois groupes:

- guaiane ;
- eudesmane ;
- germacrane.

Ils ont été séquentiellement bio synthétisés, et en raison de l'instabilité de la germacrane, la moitié des sesquiterpènes se présentent sous la forme de guaianes et 40% en eudesmanes et le reste en germacrane (**Singh, et al 2017**).

Tableau 6 : Les principaux sesquiterpènes du costus

<u>Sesquiterpénoïdes de type Guaianes</u>	
Dehydrocostus lactone (25) Isozaluzanin (26) Zaluzanin C (27) 13-dihydro-3-epizaluzanin C (28)	 <p> 25 R₁ = -H R₂ = -H 26 R₁ = -OH R₂ = -H 27 R₁ = -OH R₂ = -H 28 R₁ = -OH R₂ = -H </p>
Cynaropicrin (29) Lappalone (30) Saussuramine B (31) Saussuramine C (32) 12-methoxy-dihydrocostus lactone (33) Mokko lactone (34) 11,13 dihydroglucoaluzanin C (35)	 <p> 29 R₁ = -OH R₂ = -H R₃ = -CH₃ 30 R₁ = -H R₂ = -H R₃ = -CH₂COCH₃ 31 R₁ = -H R₂ = -H R₃ = -CH₂-N(CH₂)₂-COOH 32 R₁ = -H R₂ = -H R₃ = -CH₂-N(CH₂)₂-COOH 33 R₁ = -H R₂ = -CH₂OCH₃ R₃ = -H 34 R₁ = -H R₂ = -H R₃ = -CH₃ 35 R₁ = -OCH₃ R₂ = -CH₃ R₃ = -H </p>
<u>Sesquiterpénoïdes de type Eudesmanes</u>	<u>Sesquiterpénoïdes de type Germacrane</u>
Saussureal	Dihydrocostunolide
13-Sulfodihydro-santamarine	Costunolide

Singh, *et al* (2017)**I.5.2 Les flavonoïdes :**

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides.

Elle se trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Middleton, *et al* ; 1986).

Singh, *et al* (2017) regroupe les principaux flavonoïdes en précisant leur structure chimique dans le (tableau7) .

Ils ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (figure 6) (Yao *et al.* 2004).

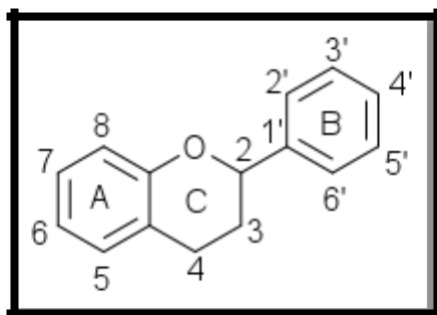


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

Tableau 7 : Les flavonoïdes isolés des racines de *Saussurea lappa*

3' [(3R)-3- Acetoxy- 5,5-dimethylcyclopent-1-en-1-yl]-4'-O-methylscutellarein 7- O-(β-O-6'''-O- acetylglucopyranosyl-(1 3)- [α-L- rhamnopyranosyl- (1→2)]-β-D-glucopyranoside	Kaempferol 3- O-β-D -glucopyranosyl-(1→2)-β-D- (6 α'-O-caffeoyl) galactopyranoside 7- O- (β-D-6'''-O- acetyl-β-D- gluco-pyranosyl- (1→3)- [β- L- rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D- glucopyranoside.
Kaempferol 3- O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl- (1→6)-β-D-galactopyranoside 7- O- (6'''-O- acetyl-β-D-gluco-pyranosyl- (1→3)- [α- L- rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside	Kaempferol 3- O-α-L-(2α', 3α'- (E)-di-p-coumaroyl) rhamnoside 7- O- (6'''-O- acetyl-β-D glucopyranosyl- (1→3)- [α- L- rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside.

Singh, *et al* (2017)

I.5.3 Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, résultant de la polymérisation de molécules élémentaires possédant des fonctions phénols telles que la catéchine et l'épicatéchine. Ils sont caractérisés par leur capacité à interagir avec les protéines salivaires (Bate-Smith, 1954).

I.5.4 Les coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus ; se trouvant dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

Ils sont connues par leur activité cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices et hypotensives. Ils sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées ; ce sont des toniques veineux aux propriétés anticoagulantes (au niveau du cœur) (Igor, 2002).

I.5.5 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central, ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine etc...). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) (Kansole, 2009).

I.6 Le Criblage phyto-chimique de différents extraits du costus :

Les différents extraits du costus (Tableau 8) ont été testés pour détecter la présence ou l'absence d'alcaloïdes, de saponines, de glycosides, de flavonoïdes, de stérols, de triterpènes, de sesquiterpènelactons, de tanins et de sucres, selon des méthodes décrites par Rasha *et al*, (2015).

Tableau 8 : Résultats du criblage phytochimique d'extraits de racine de *Saussurea lappa*

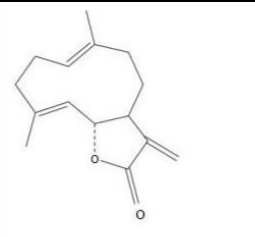
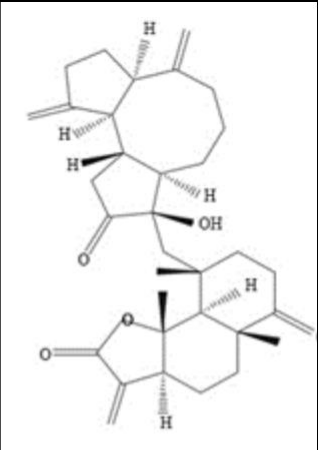
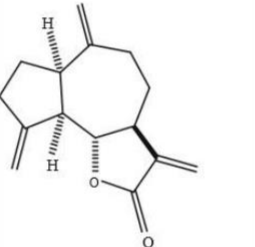
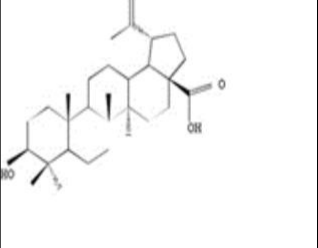
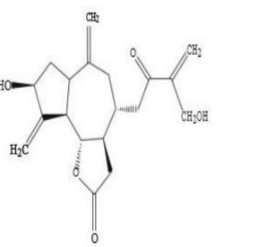
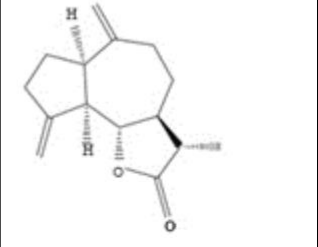
Extractions tests	Éther de pétrole	Chloroforme	Méthanol	Eau
Alcaloïdes	+	+	+	+
Anthraquinones	–	–	–	–
Glycosides cardiaques	+	–	+	–
Coumarines	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+
Saponines	–	+	+	+
Stérols	+	+	+	–
Tannins	–	–	+	+
Triterpènes	–	+	+	+

(Rasha *et al*, 2015)

I.7 Les constituants biologiquement actifs du costus :

L'analyse phytochimique des racines de *Saussurea lappa* a montré la présence de plusieurs constituants chimiques biologiquement actifs (Tableau 9) (Singh, et al 2017).

Tableau 9 : Constituants chimiques biologiquement actifs du costus

<i>Costunolide</i>		<i>Lappadilactone</i>	
<i>Dehydrocostus lactone</i>		acide bétulinique	
<i>Cynaropicrine</i>		<i>Mokko lactone</i>	

(Singh, et al 2017)

Chapitre III :

Activités pharmacologiques du Costus

Activités pharmacologiques du Costus :

Saussurea lappa a été testé pour diverses activités pharmacologiques et a été prouvé pour des activités telles que l'effet d'angiogenèse², antiarthritique, anticonvulsivant, anti-cancer, anti-ulcère, antiviral et hépato protecteur en utilisant différentes activités et des modèles in vitro et in vivo appropriés (Singh, *et al* 2017).

I.8 Effet anti inflammatoire :

I.8.1 Définition de l'inflammation :

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression ayant pour origine des éléments physiques : chaleur, froid, rayonnements ionisants ; ou des éléments solides exogènes ou endogènes : pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques, composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...). Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables (Zerbato, 2010).

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases :

- Une phase d'initiation survient suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires ;
- Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires ;
- Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Ces trois phases mettent en action différents systèmes et impliquent de nombreux médiateurs. La nature du développement de chacune de ces trois phases et la nature des effecteurs primaires et secondaires impliqués (cellules résidentes et recrutées ; médiateurs préformés et néoformés) conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère) (Zerbato, 2010).

I.8.2 Les types d'inflammation :

I.8.2.1 L'inflammation aiguë :

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles *et al.* 2010).

I.8.2.2 L'inflammation chronique :

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est

² L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire.

considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la béryllose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires (**Charles et al., 2010**).

L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (**Charles et al., 2010**).

Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorise l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (**Nourshargh et al. 2006**).

I.8.3 Les molécules biologiquement actives dans le traitement de l'inflammation :

Le costus est fréquemment utilisée dans les prescriptions traditionnelles coréennes pour les maladies inflammatoires (**Singh, et al 2017**).

Les molécules biologiquement actives dans le traitement de l'inflammation :

I.8.3.1 Dehydrocostus lactone :

Dehydrocostus lactone isolée de *Saussurea costus*, a inhibé la production d'oxyde nitrique³ (**Lee et al, 1999**). Les résultats ont montré que la suppression de la production de NO est médiée par l'action inhibitrice sur l'expression du gène de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) par l'inactivation du NF-kappa B et ces lactones peuvent agir comme des inhibiteurs pharmacologiques de l'activation du NF-kappa B (**Jin et al, 2000**).

I.8.3.2 L'extrait d'éthanol :

L'extrait éthanolique de *Saussurea costus* aux doses de 50, 100 et 200 mg/kg, a été examiné pour son effet sur l'inflammation aiguë et chronique induite chez les souris et les rats. Il a été constaté que *Saussurea lappa* inhibe de manière significative l'œdème des pattes induit par le

³ L'oxyde nitrique est un gaz constitué de molécules d'oxygène et d'azote. Il joue le rôle de messenger dans l'organisme et possède des propriétés vasodilatatrices.

carragénine⁴ et l'adjuvant complet de Freund⁵ et prévient l'accumulation de cellules inflammatoires dans la péritonite induite par le carragénine à des doses de 50-200 mg/kg. Les résultats ont montré une activité anti-inflammatoire et antiarthritique⁶ et ont soutenu le raisonnement qui justifie l'utilisation traditionnelle de cette plante dans des conditions inflammatoires (**Gokhale et al. 2002**).

I.8.3.3 Cynaropicrine :

L'extrait de méthanol total de *Saussurea costus* a montré un puissant effet inhibiteur sur la production de TNF-alpha⁷, une cytokine pro-inflammatoire, dans des cellules macrophages, le traitement avec des composés sulfhydryles (SH) tels que la L-cystéine, le dithiothréitol, et le 2-mercaptoéthanol a abrogé l'effet inhibiteur de la Cynaropicrine sur la production de TNF-alpha. Il a donc été conclu que le principal composant inhibiteur de *Saussurea costus* est la Cynaropicrine et que son effet inhibiteur est médié par la conjugaison avec les groupes SH des protéines cibles (**Cho et al, 1998**).

I.9 Activité antioxydante

Les réactions radicalaires sont omniprésentes chez les êtres vivants, et sont impliquées plus ou moins directement dans la reproduction, la modification des gènes et la défense contre les maladies.

I.9.1 Les radicaux libres

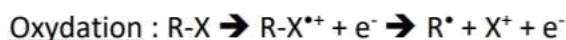
I.9.1.1 Définition des radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins (**El babili, 2016**).

I.9.1.2 Formation des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes.

Réaction d'oxydoréduction : Les radicaux libres les plus courants possèdent un seul électron célibataire. Ils peuvent être formés depuis une espèce radicalaire qui subit une réaction d'oxydoréduction. Il y a alors perte ou gain d'électron.



Le signe « • » représente l'électron célibataire.

Rupture homolytique : La production de radicaux libres peut se faire également par rupture homolytique d'une liaison covalente, ce qui entraîne la formation de deux entités ayant chacune un électron célibataire.

⁴ Mélange de polysaccharides sulfatés extraits d'algues rouge, gélifiant et émulsifiant alimentaire. Utilisée notamment pour induire des foyers inflammatoires (œdème à la carragénine) en expérimentation animale.

⁵ L'adjuvant de Freund est un mélange lipidique qui entre en jeu dans les techniques d'immunostimulation. Cet adjuvant est ajouté à l'antigène de manière à provoquer une réaction immunitaire.

⁶ Arthrite est une inflammation aiguë ou chronique des articulations

⁷ Les TNF—alpha (facteur de nécrose tumorale) sont des molécules produites par le système immunitaire jouant un rôle important dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire.



I.9.1.3 Les principales espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être radicalaires (radicaux libres de l'oxygène à proprement dit) ou non radicalaires (certains dérivés oxygénés réactifs ne possédant pas d'électron célibataire). (Tableau 10)

Tableau 10 : Espèces réactives de l'oxygène (Kohen *et al*, 2002)

Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Peroxyde organique	$ROOH$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Aldéhydes	$HCOR$
Oxygène singulet	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^-$

(Kohen *et al*, 2002)

I.9.2 Le stress oxydant

I.9.2.1 Définition Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif. Celui-ci peut favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou apoptose (El babili, 2016).

I.9.2.2 Origine du stress oxydant

Les origines du stress oxydant peuvent être multiples. (Figure 7) ; il peut être du :

- à des facteurs externes (exposition prolongée aux UV, pollution, pesticides, infection)
- au mode de vie (tabac, alcool, alimentation déséquilibrée, sport intense, stress, fatigue)
- à une déficience nutritionnelle en un ou plusieurs antioxydants comme les vitamines et les oligoéléments.

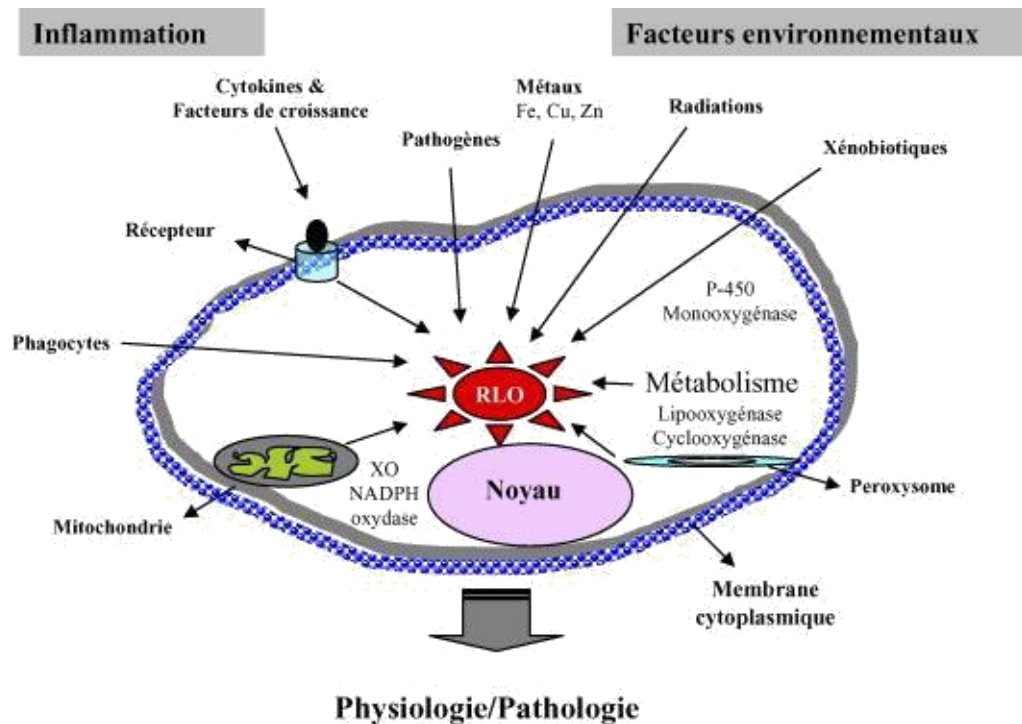


Figure 7 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso, 2007)

I.9.2.3 Effets du stress oxydant sur l'organisme

Les Espèces Réactives de l'Oxygène réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne certaines modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire physiologique (El babili, 2016).

- Altération des membranes lipidiques
- Altération de l'ADN
- Altération des protéines
- Inflammations

I.9.2.4 Principales affections liées au stress oxydant

Le stress oxydant est étroitement lié au vieillissement cellulaire et à de nombreuses pathologies :

- Athérosclérose
- Cancers
- Diabète de type 2
- Maladies neurodégénératives
- Maladies rhumatismales

I.9.3 Les antioxydants

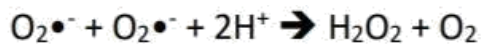
Les antioxydants sont des substances qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat. Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires). Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes.

Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes superoxydes dismutases, catalase et glutathion peroxydase dont les mécanismes sont développés plus haut. La deuxième partie permet d'appréhender les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés en grande partie par l'alimentation (**Giasson, 2000**).

I.9.3.1 Endogène : Les systèmes de défense enzymatiques des radicaux libres

1. Superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont des métallo-enzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène. Leur cible privilégiée est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



2. Catalases

Les catalases sont localisées dans les peroxysomes et leur cible principale est le H_2O_2 . Cette place est stratégique puisque c'est ici que des enzymes comme les flavines, l'urate oxydase, le glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent des radicaux libres H_2O_2 . L'activité de la catalase est coordonnée avec la concentration en H_2O_2 .



3. Glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases sont localisées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries. Elles permettent de réduire H_2O_2 en H_2O en parallèle de l'oxydation du glutathion.



I.9.3.2 Exogène :

1. **Les polyphénols** : Cette catégorie est largement retrouvée dans les végétaux et très diversifiée. Les phénols réagissent rapidement avec les radicaux libres, notamment les peroxydes en donnant un radical phénoxy incapable de propager la réaction radicalaire. De plus, les polyphénols circulants sont majoritairement des formes conjuguées avec des sucres, ce qui laisse supposer que ce sont les métabolites conjugués des polyphénols qui sont biologiquement actifs (**El babili, 2016**).

2. **Les vitamines** : Certaines vitamines antioxydantes protègent le corps des effets néfastes des radicaux libres ;
- Vitamine E
 - Vitamine C ou acide ascorbique
 - Rétinol ou vitamine A
 - Caroténoïdes
3. **Les oligoéléments** : Les oligoéléments antioxydants sont des micronutriments qui sont fortement impliqués dans l'homéostasie énergétique. Ce sont des cofacteurs indispensables pour des réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Il s'agit principalement du :
- Cuivre
 - Manganèse
 - Sélénium
 - Zinc

Plusieurs études ont démontré que la plante *Saussurea lappa* peut aider à prévenir le stress antioxydant. Et cela est dû à sa richesse en composés phénoliques. (Kyung-Mi *et al*, 2012).

I.10 Les molécules biologiquement actives dans le traitement du cancer

I.10.1.1 Costunolide :

Il a été démontré que le Costunolide extrait de *Saussurea lappa* supprimait la croissance tumorale et les métastases des cellules de cancer du sein humain hautement métastatique. Il est donc conclu que *Saussurea lappa* et son dérivé le Costunolide ont supprimé la croissance du cancer du sein et les métastases ce qui suggère que le Costunolide ainsi que *Saussurea lappa* pourraient être des médicaments anticancéreux prometteurs, en particulier pour le cancer du sein métastatique (Youn *et al*. 2013)

La capacité anti tumorale du Costunolide était due à l'inhibition de la prolifération, de l'invasion et des métastases, ainsi qu'à l'induction de l'apoptose, ce qui indique que le Costunolide possède le potentiel pour devenir un remède anti tumoral efficace et systémique. Le traitement à l'extrait de *Saussurea lappa* sur des cellules KB⁸ a réduit la viabilité cellulaire de manière significative avec une valeur IC50⁹ de 300µg/mL. On peut donc conclure que l'extrait de *S. lappa* a inhibé la prolifération cellulaire par la voie de l'apoptose dans les cellules cancéreuses orales humaines KB (Azhar *et al*. 2012) (Moon *et al*. 2013).

⁸ Souche de cellules de lignée continue ayant pour origine un cancer épidermoïde de la langue et du plancher buccal, servant à des cultures virales.

⁹ La concentration inhibitrice médiane IC50 est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber 50 % de l'effet observé.

I.10.1.2 La mokkolactone :

La mokkolactone et un alcaloïde isolé de *Saussurea lappa* a induit l'apoptose dans les cellules leucémiques. Aussi des études ont révélé une activité anticancéreuse due à l'inhibition de la croissance et de la propagation du cancer en arrêtant la division des cellules cancéreuses dans la phase G2¹⁰ du cycle cellulaire et ont induit l'apoptose contre divers cancers de l'ovaire, du poumon, du côlon et du système nerveux central (**Ko et al. 2005**).

I.10.1.3 L'extrait d'hexane :

L'extrait d'hexane de *Saussurea lappa* a été étudié pour le mécanisme d'induction de l'apoptose dans les cellules DU145¹¹ et les effets chimio préventifs dans le cancer de la prostate indépendant des androgènes. Le principe actif déhydrocostus lactone isolé de L'extrait d'hexane de *Saussurea lappa* par chromatographie sur colonne a inhibé la croissance cellulaire et induit l'apoptose dans les lignées cellulaires DU145 de cancer de la prostate humaine (**Kim et al. 2008**).

I.11 Effet Anti-ulcère et cholagogue

Saussurea costus est l'un des principaux ingrédients d'une formulation UL-409¹², qui possède une activité antiulcéreuse (**Venkataramanna et al, 1998**) et l'activité observée peut être due à la modulation des facteurs de défense par l'amélioration de la cytoprotection gastrique (**Mitra et al, 1996**).

I.11.1 Les molécules biologiquement actives dans le traitement des ulcères :I.11.1.1 L'extrait d'acétone :

L'extrait d'acétone de *Saussurea costus* et de Costunolide a eu un effet cholagogue¹³ et inhibiteur sur la formation d'un ulcère gastrique (induit par la rétention d'eau) chez la souris (**Yamahara et al, 1985**).

¹⁰Phase préparant la mitose (synthèses d'enzymes, d'organites...)

¹¹est une lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine. DU145 sont considérés comme la lignée cellulaire standard du cancer de la prostate utilisée dans la recherche thérapeutique.

¹²Une formulation à base de plantes contre les ulcères gastriques et duodénaux

¹³Une substance cholagogue a pour effet de faciliter l'évacuation de la bile vers l'intestin en provoquant une chasse biliaire à partir de la vésicule qui se vide en se contractant.

I.11.1.2 Costunolide :

La variation du débit d'acidité gastrique, de la gastrine sérique et de la concentration plasmatique de somatostatine a été observée lors de la perfusion de décoction de *Saussurea costus* dans l'estomac de patients souffrant de gastrite superficielle chronique. Elle a révélé que la décoction pouvait accélérer la vidange gastrique et augmenter la libération de motiline endogène ¹⁴(Chen et al, 1994).

I.11.1.3 Saussureamines :

Les produits d'addition acides aminés-sesquiterpènes, les Saussureamine A, B et C, isolés de la racine séchée du *Saussurea costus* chinois ont montré un effet antiulcéreux sur la lésion induite par le HCl/éthanol chez les rats. La Saussureamine A a également montré une activité inhibitrice sur la formation d'ulcères induits par le stress chez les souris (Yoshikawa et al, 1993).

I.11.1.4 Extrait éthanolique :

Il a été établi que l'infection par *Helicobacter pylori* est un facteur étiologique important qui conduit généralement à une gastrite chronique active et à un ulcère gastrique, dont l'incidence est en augmentation dans le monde entier.

En utilisant comme agent pathogène de test, une souche standard et cinq souches cliniques d'*Helicobacter pylori*, l'action antibactérienne a été évaluée in vitro avec de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* qui est prescrit depuis l'Antiquité dans la phytothérapie chinoise pour traiter les troubles gastriques. Il s'est avéré être fortement inhibiteur pour toutes les souches testées (concentration minimale inhibitrice : 40 µg/ml) (Yang et al, 2005).

I.12 Les molécules biologiquement actives ayants un effet immunomodulateur.**I.12.1 Le Costunolide et la déhydrocostus lactone :**

Le Costunolide et la déhydrocostus lactone ont été isolés à partir d'un extrait de *Saussurea costus* comme inhibiteurs de l'activité de destruction des lymphocytes T cytotoxiques¹⁵. Le Costunolide a inhibé l'activité de destruction de ces derniers en empêchant l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine en réponse à la réticulation des récepteurs des lymphocytes T(Taniguchi et al, 1995).

¹⁴La motiline est une hormone peptidique digestive, elle intervient dans l'activité motrice cyclique du muscle intestinal dans les périodes de jeûne.

¹⁵Sont capables de reconnaître spécifiquement leurs cellules cibles, ici les cellules infectées, et de les tuer par des processus de cytotoxicité.

I.13 Effet antimicrobien

Les effets inhibiteurs de l'extrait d'éthanol de *Saussurea lappa* sur la croissance, la production d'acide, l'adhérence et la synthèse de glucane insoluble dans l'eau de *Streptococcus mutans* ont été examinés (Yu *et al*, 2006). La croissance et la production d'acide de *Streptococcus mutans* ont été significativement inhibées par la présence d'un extrait d'éthanol (0,5-4 µg/ml). L'extrait d'éthanol du costus (0,25-4 µg/ml) a également réduit de manière significative l'adhérence de *Streptococcus mutans* en fonction de la dose. Dans le test de synthèse du glucane insoluble dans l'eau, 2-4 µg/ml de l'extrait d'éthanol de *Saussurea lappa* ont inhibé de manière significative la formation de glucane insoluble dans l'eau. *Saussurea lappa* est connu pour ses effets thérapeutiques sur les maladies buccales telles que l'halitose, la carie dentaire et les maladies parodontales (Lee, 1986). Ces résultats ont fourni quelques justifications scientifiques pour son utilisation dans le traitement des maladies dentaires et ont suggéré que la *Saussurea lappa* pourrait inhiber les propriétés cariogènes du *Streptococcus mutans* (Kim *et al*, 1991).

I.14 Activité anti-hépatotoxique

Les études révèlent que l'extrait de racine de *Saussurea lappa* agit contre l'activité hépatotoxique. Des extraits aqueux et méthanoliques de racine de *Saussurea lappa* ont été étudiés pour leur activité hépatotoxique contre la D-galactosamine (D-GalN) et l'hépatite induite par les lipopolysaccharides (LPS) chez la souris. Le prétraitement de souris avec différentes doses de *Saussurea lappa* a entraîné une augmentation des niveaux de créatinine dans le plasma en fonction de la dose et des niveaux d'Aspartate aminotransférase Et Alanine aminotransférase. Alors que le post-traitement a conduit à une progression limitée des dommages hépatiques induits par le D-GalN et le LPS (Yaesh *et al*. 2010).

I.15 Effet Hypolipidémiant

Extrait aqueux de *Saussurea lappa* administre par voie orale A vingt-sept lapins a une dose de 2 mg/kg de poids corporel a montré un effet hypolipidémiant. Réduction du cholestérol sérique et les triglycérides sériques se sont révélés importants (upadhyayet al, 1994).

I.16 Effet cardioprotecteur

Les résultats ont révélé que l'extrait méthanolique de *Saussurea lappa* montrait des effets cardiotoniques, ce qui pourrait être dû à la présence de flavonoïdes, de lactones sesquiterpénique, d'un bloqueur des canaux calciques et de constituants cholinergiques (Muhammad *et al*. 2013).

I.17 Effet anticonvulsif

L'activité anticonvulsive de l'éther de pétrole, de l'alcool et de l'extrait aqueux de *Saussurea lappa* a été évaluée. Les résultats ont démontrés que l'extrait d'éther de pétrole des racines de *Saussurea lappa* présentait une puissante activité anticonvulsive contre le pentylènetétrazole et les convulsions induites par les picrotoxines chez les souris (Ambavadeet *al*. 2009).

II. Partie

Matériel et méthodes

II.1 Lieu de stage :

Cette étude a été réalisée au niveau du :

- Laboratoire pédagogique de la faculté de sciences de la nature et de la vie de Blida département agroalimentaire. Nous avons commencé notre expérimentation durant la période allant du 17 février jusqu'au 10 mars 2020.
- Laboratoire physico-chimique et microbiologique de la boîte pharmaceutique NOVAPHARM à Bouismail (Alger). Durant la période du 28 Juillet jusqu'au 03 Août 2020, d'autres analyses ont été effectuées.

II.2 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail, comporte des racines séchées (200g) du costus (*Saussurea Lappa*) et leur poudre (200g) qui sont originaires d'Inde. Nous les avons achetés du commerce chez un herboriste à Blida (photo 8 et 9).



Figure 8 : La poudre du costus
(Photographie originale, 2020)



Figure 9 : Les racines du costus
(Photographie originale, 2020)

II.3 Le criblage phytochimique de la poudre de costus :

(Benzahi *et al*, 2001) (Par utilisation des méthodes décrites dans le recueil de normes françaises)

Mode opératoire :

Il s'agit d'une analyse qui met en évidence qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. C'est une des techniques qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

L'analyse phytochimique qualitatif de la poudre végétale brute du costus a été déterminée Comme suit :

II.3.1 Test de présence des saponines :

2 g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence des saponines.

II.3.2 Test de présence des tannins :

Il s'agit d'ajouter 2 g de matière végétale (le costus en poudre) à 10 ml d'eau distillée puis filtrer. Ensuite, 2 ml du filtrat et 2 ml de FeCl₃ ont été mélangés. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre.

II.3.3 Test des triterpènes :

5g du costus en poudre ont été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration, la solution obtenue est mise dans un tube à essai. On ajoute d'abord de l'anhydride d'acétate 1ml, ensuite 1ml d'H₂SO₄ est ajouté au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration brunâtre de la couche surnageant révèle la présence des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard.

II.3.4 Test des flavonoïdes

10g de poudre de costus est pesé puis mélangé à 100 ml d'une solution d'HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h. Après filtration, on ajoute NH₄OH au filtrat jusqu'à la basicité Ph=6 L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes.

II.4 Préparation des extraits du costus :**II.4.1 Préparation de l'extrait brut de la poudre de racine de *Saussurea lappa* par Extraction au Soxhlet :**

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction de certaines plantes car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale.

Principe de la méthode :

Selon le protocole de Pandey *et al*, (2014) :

- On pèse 50g de poudre de racine de *Saussurea lappa* à l'aide d'une balance de précision (Figure10, phase-1-).
- Mettre la poudre dans un papier filtre et bien l'enrouler de façon qu'elle ne s'éparpille pas (Figure 10, phase -2-).
- Mettre le papier filtre contenant la poudre dans la cartouche à Soxhlet (Figure 10, phase-3-).
- Placer la cartouche dans le réservoir du Soxhlet (Figure 10, phase -4-).
- Remplir le réservoir avec 300 ml d'éthanol (Figure 10, phase -5-).

La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et la poudre est toujours en contact avec du l'éthanol fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque l'extrait d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Figure 10, phase -6-).

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Figure 10, phase -7-).

- Mettre la solution dans une boîte de pétri en verre et Soumettre le mélange à une évaporation à 40°C dans une étuve. L'extrait obtenu est appelé extrait brut (Figure 10, phase -8-).
- Recouvrir la boîte de pétri et l'emballer entièrement avec de l'aluminium.
- A conserver dans le froid (à 4°C).

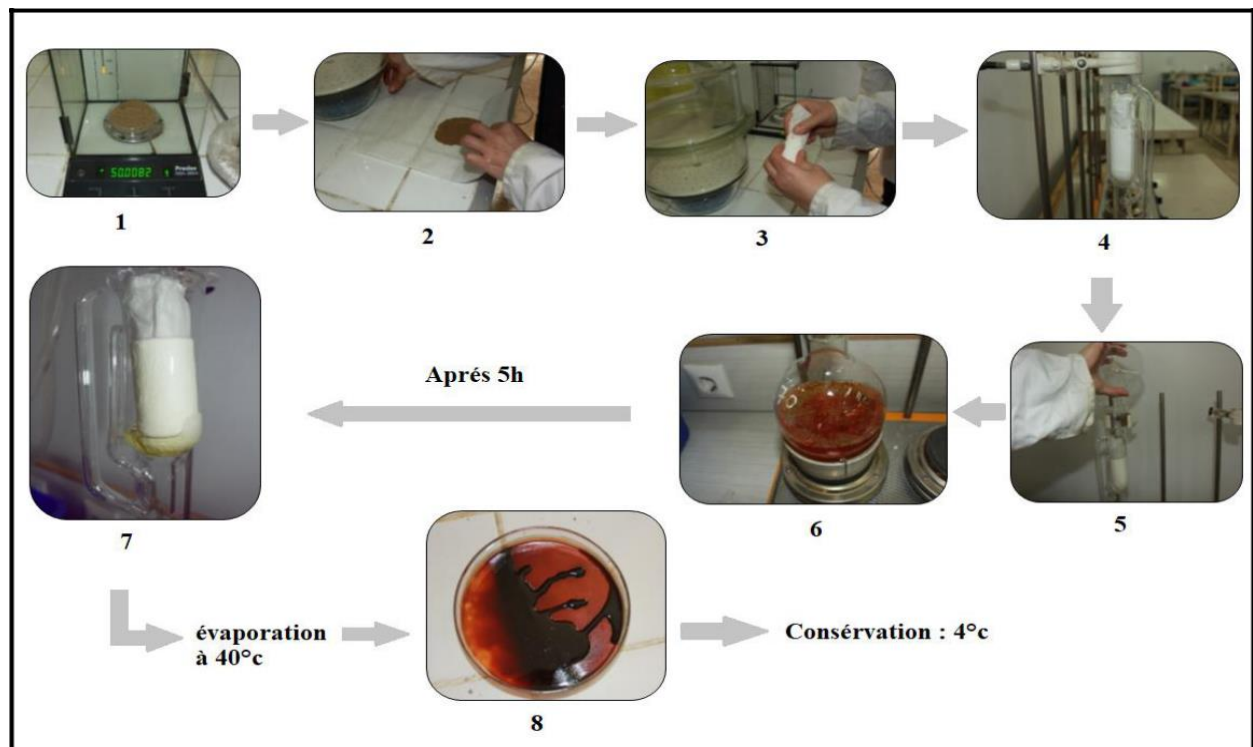


Figure 10 : Etapes de l'extraction au Soxhlet (Photographies originales, 2020), Selon Pandey *et al*, (2014)

II.4.2 Préparation de l'extrait brut de la poudre de racine de *Saussurea lappa* par macération :

a. Broyage de la poudre du costus :

200g de racine de *Saussurea lappa* ont été moulues en poudre à l'aide d'un broyeur mécanique de type Retsch Mühlen (Figure 11).

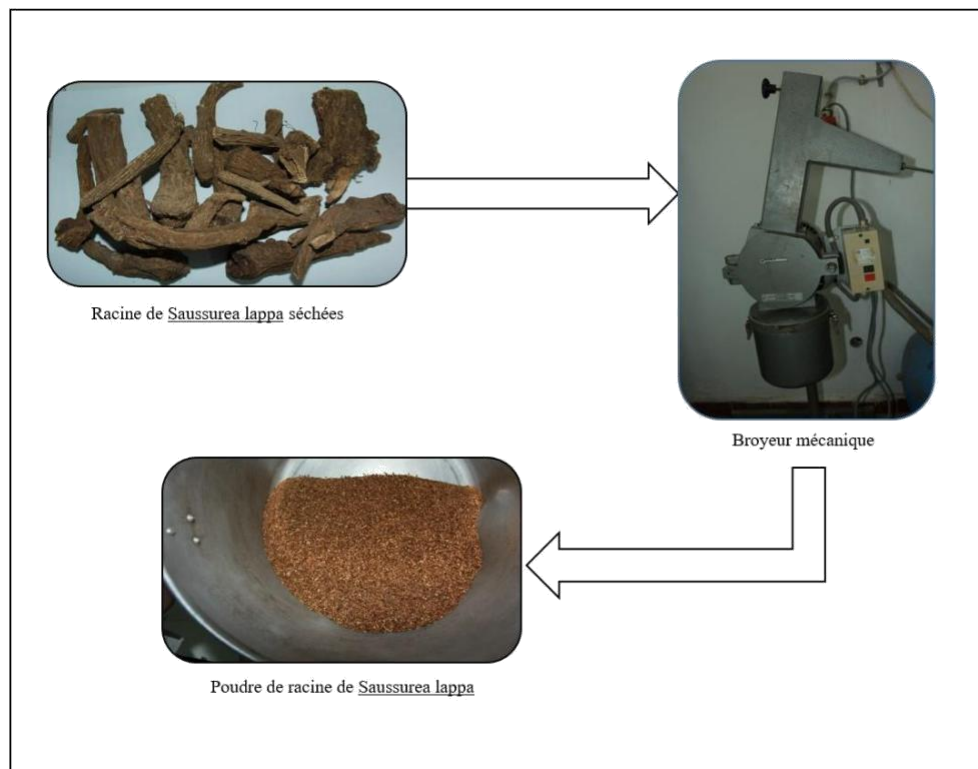


Figure 11 : Broyage de la poudre du costus

(Photographies originales, 2020)

b. Principe de la méthode d'extraction :

Selon le protocole de *Tag et al*, (2015) :

Mélanger dans un erlenmeyer 200g de poudre racine du costus avec 600 ml d'eau distillée et 600 ml d'éthanol (Figure 12, phase -1-).

Mettre la solution sur un agitateur magnétique en plaçant un barreau dans l'erlenmeyer. (Figure 12, phase -2-).

Mettre la solution à l'abri de l'air et de la lumière en couvrant entièrement l'erlenmeyer avec de l'aluminium. (Figure 12, phase -3-).

- Laisser la solution macérée pendant 72 h.
- Après 72h de macération on filtre la solution 3 fois
- Mettre la solution filtrée dans une boîte de pétri en verre.

La solution est incubée à 50°C pour une évaporation afin d'obtenir un extrait brut du costus (Figure 12, phase -1-).

Recouvrir la boîte de pétri contenant l'extrait et l'emballer entièrement avec de l'aluminium.

- A conserver dans le froid (à 4°C).

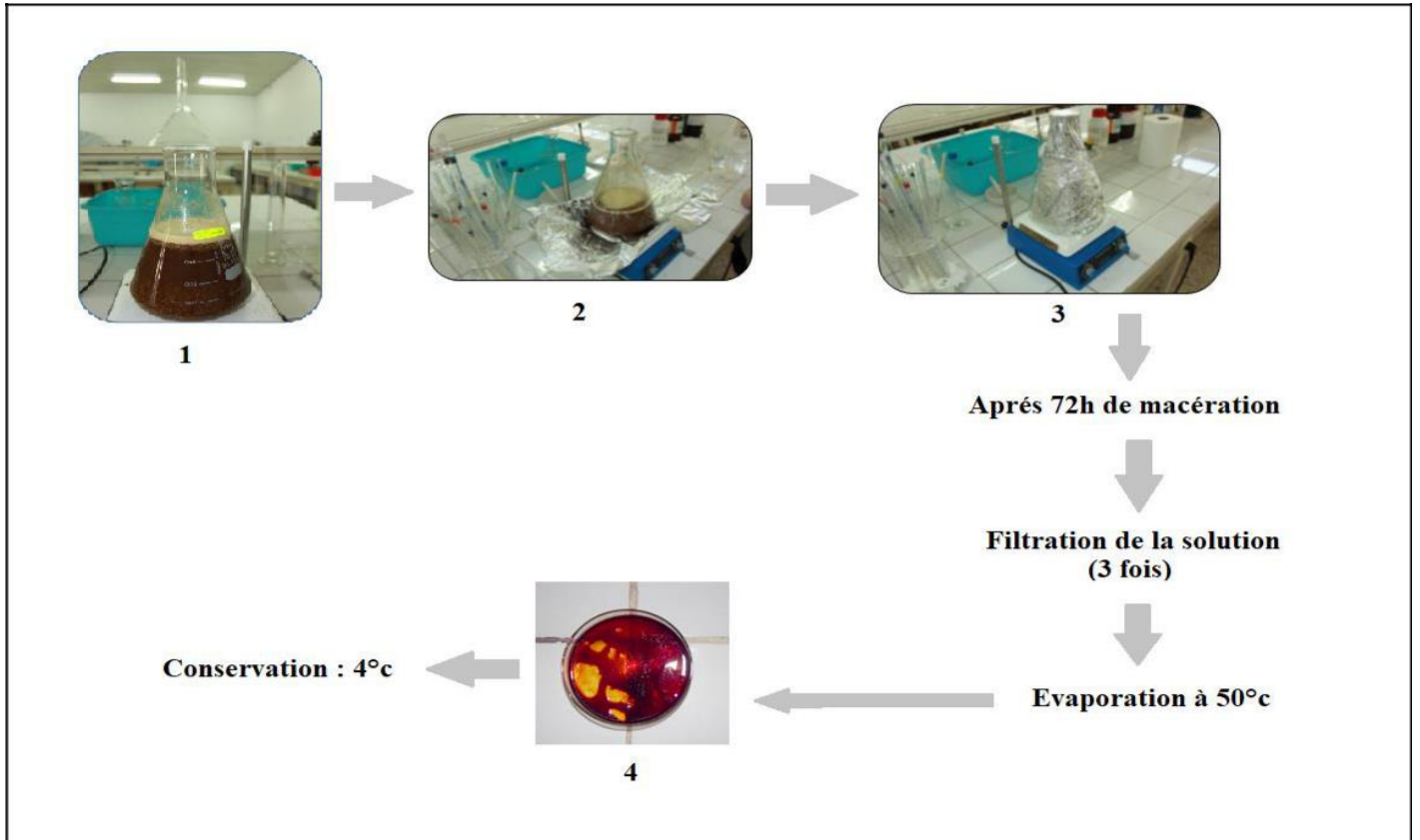


Figure 12.11: Étapes d'extraction du Costus par macération selon Tag *et al*, (2015)

(Photographies originales, 2020)

II.4.3 Calcul des rendements des extractions des principes actifs :

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : Poids de la boîte de pétri avec l'extrait après évaporation.

P2 : Poids de la boîte de pétri vide.

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

II.5 Détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH :

Dans nos conditions expérimentales, nous avons suivi le protocole de Kumer *et al*, (2013) pour déterminer l'activité antioxydante du costus par le test DPPH.

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir anti radicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Figure 13) (Berset, 2006).

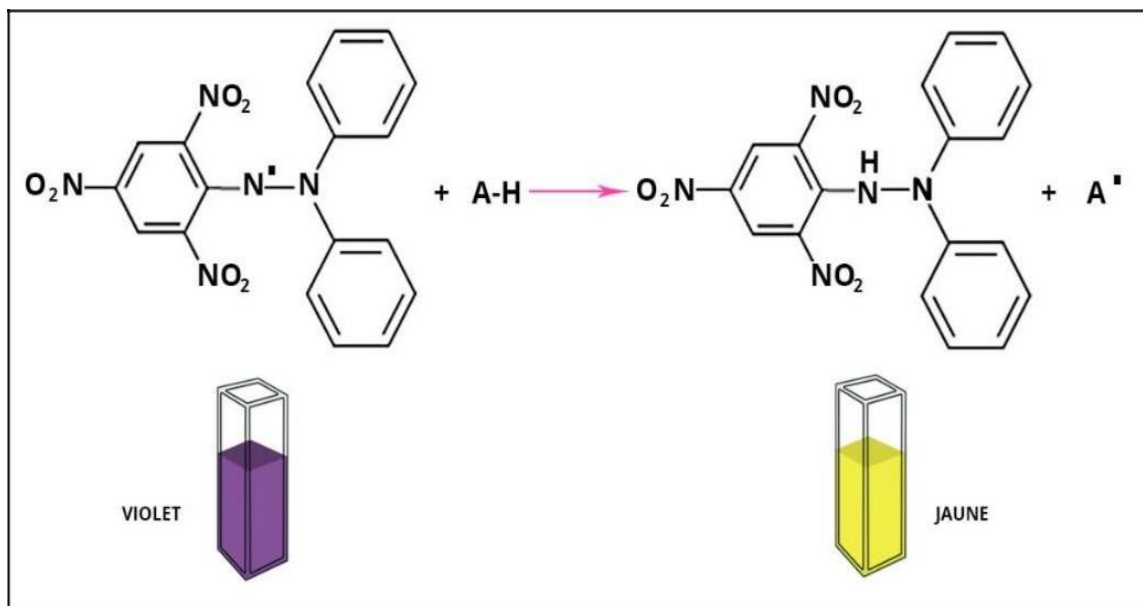


Figure 13 : Forme libre et réduite du test du DPPH (Berset, 2006).

II.5.1 Préparation de la solution mère de DPPH :

Le DPPH est solubilisé dans l'éthanol à raison de 0,4 mg / 100 ml, sous agitation magnétique pendant 30 min à l'abri de l'oxygène et la lumière (Figure 14, phase -1-).

II.5.2 Préparation des différentes concentrations : (Figure 14, phase -2-).

Nous avons procédé à la préparation de différentes concentrations du costus selon ce qui suit :

- Tube 1 : 100µg de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* dans 100 ml d'éthanol
- Tube 2 : 200µg de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* dans 100 ml d'éthanol
- Tube 3 : 400µg de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* dans 100 ml d'éthanol
- Tube 4 : 500µg de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* dans 100 ml d'éthanol
- Tube 5 : 800µg de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* dans 100 ml d'éthanol

100 µl de la solution de DPPH (0,4 % p/v) est ajoutée à chaque tube à l'aide d'une micro pipette et la solution est bien mélangée (Figure 14, phase -3-).

Ce mélange a été conservé à température ambiante pendant 30 minutes dans un endroit sombre. Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance du mélange a été prise à 517 nm en utilisant l'UV-visible spectrophotomètre (Figure 14, phase -4-)

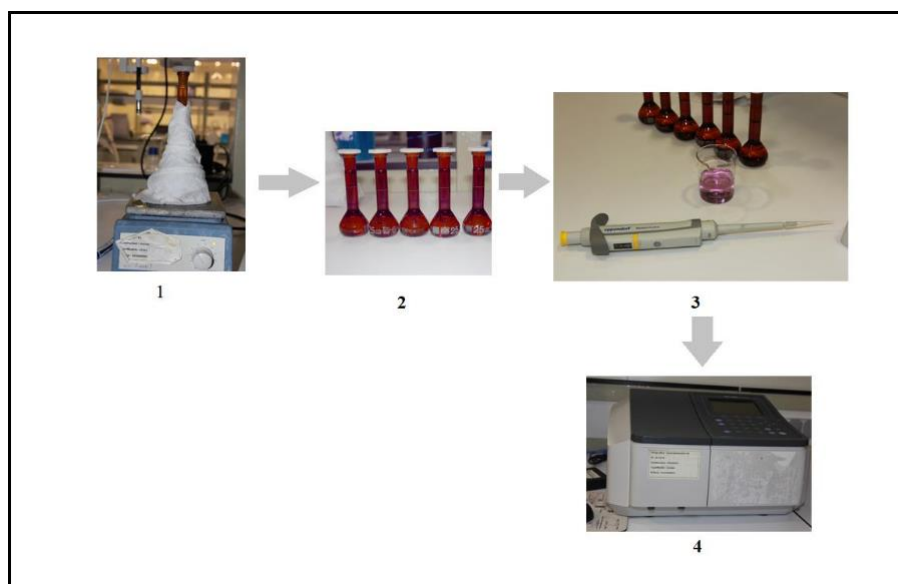


Figure 14 : Étapes du test de DPPH selon Kumer *et al*, (2013)

(Photographies originales, 2020)

En parallèle, la solution éthanolique d'un antioxydant de référence a été préparée avec la même procédure et dans les mêmes conditions. Dans ce travail on a utilisé le BHT¹⁶.

II.5.3 Expression des résultats :

II.5.3.1 Calcul des pourcentages d'inhibition :

Le pourcentage d'inhibition du DPPH (%DPPH) est calculé par la formule suivante :

$$\%DPPH = \frac{\text{Abs T} - \text{Abs E}}{\text{Abs T}} \times 100$$

Avec :

% DPPH : Taux du DPPH piégé

Abs T : Absorbance du témoin (solution de DPPH à blanc)

Abs E : Absorbance de l'échantillon.

II.5.3.2 Calcul d'IC50 :

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante.

¹⁶Butylhydroxytoluène, est une substance liposoluble reconnue pour ses puissantes propriétés antioxydantes.

IC50 est calculé graphiquement par l'équation de la régression linéaire ($y = ax + b$) du pourcentage d'inhibitions en fonction de la concentration des extraits ou du standard.

II.6 Détermination de l'activité antibactérienne :

II.6.1 Principe :

La sensibilité des souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) à l'extrait hydroéthanolique du costus se traduit par la formation des zones d'inhibition aux tours des disques chargés d'extrait. La Lecture des résultats se fait après 24 heures d'incubation.

II.6.2 Mode opératoire : d'après le protocole de (Neggaz, 2002).

L'extrait hydroéthanolique de *Saussurea lappa* a été appliqué dans ce test sur deux souches bactériennes photogènes par la méthode des disques basé sur la technique de diffusion des extraits en milieu gélosé. Les milieux de Mueller Hinton ont étéensemencés par la méthode de strie à l'aide de pipettes Pasteur.

II.6.2.1 Préparation de l'extrait :

Une série de dilutions a été réalisée à partir de l'extrait hydroéthanolique du Costus. (Tableau 11)

Tableau 11 : préparation des dilutions

Dilutions	Préparations	Concentration
C1 (200%)	1,2g d'extrait hydroéthanolique de costus dilué dans 10 ml d'éthanol	120mg/ml
C2 (150%)	7,5 ml de la concentration 200% ajusté à 10 ml avec de l'éthanol	80mg/ml
C3 (100%)	6,66 ml de la concentration 150% ajusté à 10 ml avec de l'éthanol	60mg/ml
C4 (50%)	5 ml de la concentration 100% ajusté à 10 ml avec de l'éthanol	30mg/ml

II.6.2.2 Préparation de pré-culture bactérienne :

Cette étude nécessite des conditions aseptiques autours de bec bunsen et avec des boites de Pétri et des instruments stériles. Le milieu sélectif fondue a été mis après refroidissement dans des boites de Pétri stériles et laisser gélifiée. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on a prélever un à deux colonies et ensemencer a la surface du milieu de culture puis incubé dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

1. Revivification des souches bactériennes :

Consiste à ensemencer et revivifier chaque souche bactérienne dans des boites de Pétri contenant le milieu sélectif puis laisser incubé pendant 24h à l'étuve à 37°C.

2. Préparation de la suspension bactérienne inoculum :

Consiste à prélever 2 à 3 colonies à l'aide d'une anse stérile, et les mettre en suspension dans un tube contenant 10 ml de l'eau physiologique. Après agitation, une bonne homogénéisation est assurée à l'aide d'un vortex. L'absorbance (D.O) de chaque suspension bactérienne a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm. La densité de suspension bactérienne doit être comprise entre 0.2 et 0.3.

II.6.2.3 Ensemencement :

Cette étape nécessite l'ensemencement des souches bactériennes de 24h dans des boites de Pétri contenant le milieu Muller Hinton. Pour cela, la suspension microbienne à densité 0,2 à 0,3 a été ensemencé par la méthode de strié à l'aide d'un coton tige où pipettes Pasteur.

II.6.2.4 Préparation des disques :

A l'aide d'une pince stérile, 3 disques de 9 mm de diamètre préalablement stérilisés, sont imbibés par 50 µl d'extrait de *Saussurea lappa* à différentes concentrations ont été par la suite aseptiquement déposés sur la surface de milieu de culture.

II.6.2.5 Incubation :

Les cultures bactériennes exposées à l'extrait de *Saussurea lappa* sont mis au frais à 4°C pendant deux heure pour assure une bonne imprégnation des extraits dans la gélose. Ensuite, elles sont incubées à l'obscurité pendant 18 à 24 h dans l'étuve à 37°.

II.6.2.6 Lecteur des résultats :

A l'aide d'une règle, des mesures de diamètres des zones d'inhibitions autour des disques chargés d'extrait ont été réalisé. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité (Pouce et al, 2003) :

Souches résistantes (Diamètre < 7mm)

Souches sensibles (8mm <Diamètre <14mm)

Souches très sensibles (15mm<Diamètre<19)

III. Partie

Résultats et discussion

III.1 Méthodes d'extraction et le rendement du costus (*Saussurea lappa*)

Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect similaires. Ils sont de couleur marron orangé et une texture gluante.

- Extraction par macération (Figure 15)
- Extraction au Soxhlet (Figure 16)



Figure 15 : Extraction par macération

(Photographie originale, 2020)



Figure 16 : Extraction au Soxhlet

(Photographie originale, 2020)

- Le rendement d'extrait brut obtenu à partir des racines du costus est illustré dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Résultat du rendement d'extraction du costus

	Masse de poudre de Costus(en g)	Masse de l'extrait récupérée (g)	Le rendement en %
Extrait hydroéthanolique	200g	30,83	15,41 %
Extrait éthanolique	50g	6,04	12,08 %

Selon les résultats obtenus, il est remarqué que le rendement des extraits du costus par méthode de la macération est supérieur à celui obtenu par l'extraction au Soxhlet. En effet, des travaux sur cette même espèce végétale montrent un rendement d'extrait hydroéthanolique par macération de 16%. Le rendement de notre extrait (15,41%) est très proche de la valeur théorique. Ceci, pourrait s'expliquer par le choix de la méthode d'extraction ainsi que la région géographiques (le climat et le sol). (Tag et al, 2016). D'un autre côté et d'après les résultats d'Omer *et al* (2019), les constituants phytochimiques de l'extraction au Soxhlet des racines de costus avec de l'éthanol

sont deux fois plus élevés que l'extrait aqueux. Cette différence s'expliquerait par la capacité de l'éthanol à extraire la plus grande quantité de constituants phytochimiques.

III.2 Le criblage phytochimique de la poudre du costus :

Les tests de caractérisation phytochimique réalisés sur la poudre des racines de *Saussurea lappa* révèlent la présence de plusieurs substances actives. De ce fait, nous avons rassemblé nos résultats dans le (tableau 13).

Tableau 13 : Résultats du criblage phytochimique de la poudre de costus

Substances	Réactions	Résultats
Les saponines	formation d'une mousse	+
Les tannins	coloration verdâtre	+
Les triterpènes	coloration brunâtre	+
Les flavonoïdes	L'apparition d'une couleur jaune claire	+

Le criblage phytochimique effectué sur la poudre des racines du costus, révèle un test positif pour les saponines, les flavonoïdes, les Tanins et les triterpènes.

Une étude réalisée par Rasha *et al* (2015) sur plusieurs extraits de costus montre en plus de la présence de ces mêmes principes actifs, d'autres métabolites comme des alcaloïdes, des coumarins, des stérols et des glycosides.

On conclut que la poudre des racines du costus présente une diversité de constituants chimiques.

Les teneurs en ces constituants actifs peuvent servir comme indicateur important de la capacité antioxydante et être utilisés comme une sélection préliminaire pour n'importe quel produit comme source naturelle d'antioxydants dans les aliments fonctionnels (Viuda *et al*, 2011).

III.3 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est l'une des principales capacités recherchées dans les produits naturels. Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante de notre extrait en utilisant la méthode de réduction du DPPH.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH et comparés à un antioxydant de référence le BHT.

Pour cette étude, l'activité antioxydante du Costus a été évaluée par la mesure du taux de DPPH après l'ajout des extraits éthanoliques de *Saussurea lappa* à différentes concentrations, en comparaison avec le BHT.

Les résultats de l'activité de piégeage obtenus sont comparés à ceux du BHT (Figure 17 et 18).

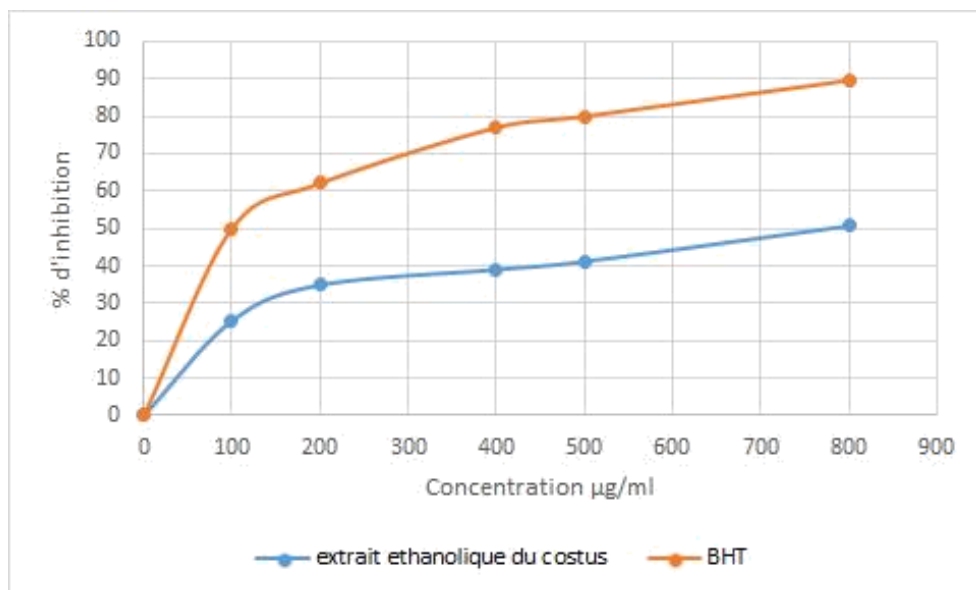


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique du costus et de BHT.

D'après les résultats représentés par la Figure 17, le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait éthanolique du costus. Il est à déduire alors que l'activité anti radicalaire est proportionnelle à la concentration de l'extrait éthanolique du costus.

III.4 La Détermination d'IC₅₀ :

L'inhibition du radical DPPH est exprimée en IC₅₀, ce paramètre est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi *et al*, 2016).

Les résultats obtenus sont représentés par les figures 19 et 20. En effet, il ressort de la figure 19, une concentration inhibitrice (IC_{50}) de l'extrait éthanolique du costus égale à 681 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est largement supérieure à celle trouvée dans le cas du BHT représentée par la figure 20 qui est de 228 $\mu\text{g/ml}$.

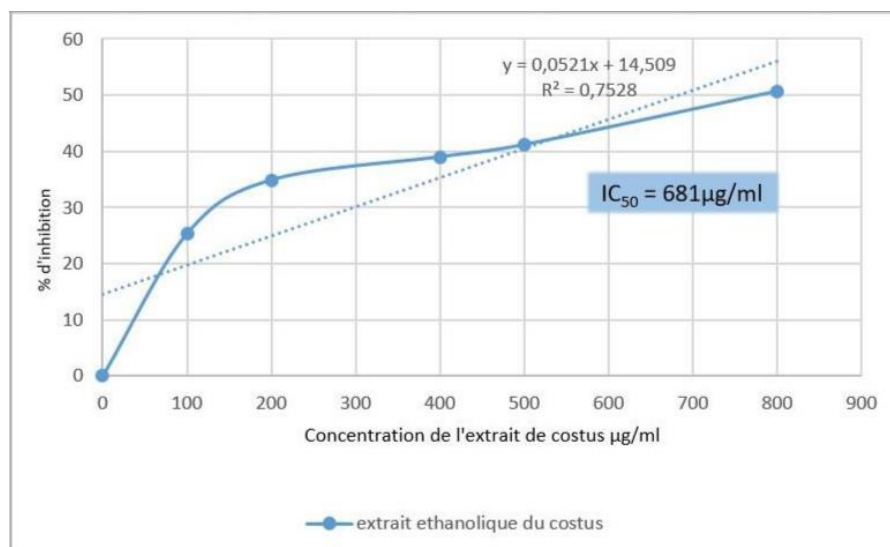


Figure 18 : Concentration inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de 50% des radicaux DPPH (IC_{50})

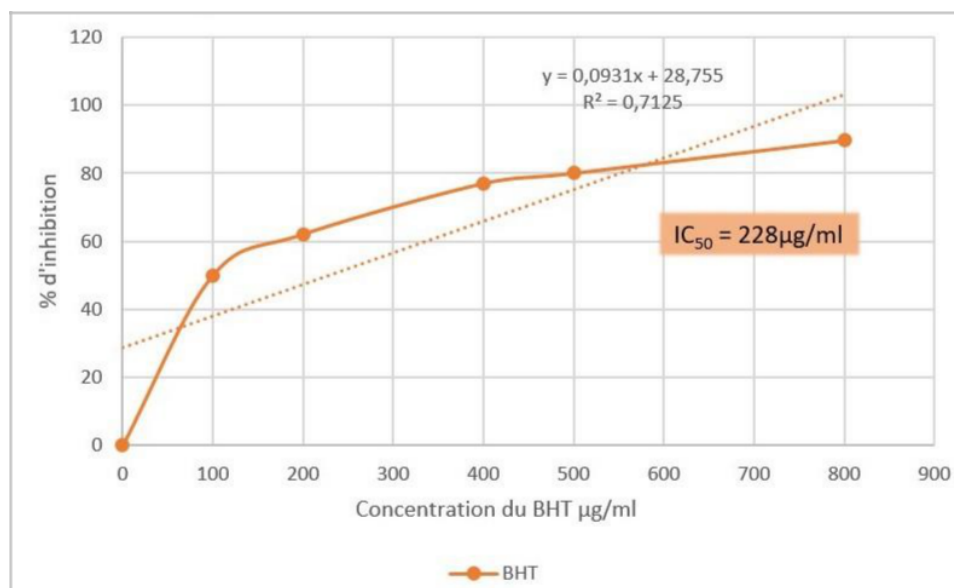


Figure 19 : Concentration inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de 50% avec du BHT

Diverses études sur l'activité antioxydante, ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres comme la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (Mohamdi, 2013).

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique¹⁷ stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres (Bougandoura, 2011).

Pour le mécanisme de piégeage de radical, la réaction entre l'antioxydant et DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Certains composés réagissent rapidement avec le DPPH, réduisant un nombre de molécules de DPPH égal au nombre de groupements hydroxyles (Bondet *et al*, 1997).

Le test de DPPH effectué sur l'extrait éthanolique du costus et sur le BHT a montré que son IC₅₀ 681µg/ml contre 228µg/ml pour le BHT. Ces résultats confirment que l'espèce *Saussurea lappa* possède une action antioxydante très intéressante.

Kumer *et al*, (2013) ont travaillé sur l'activité antioxydante de six extraits bruts de plantes médicinales in vitro en utilisant le test de DPPH. *Saussurea lappa* a montré la plus grande capacité antioxydante totale.

Par ailleurs, Une étude menée par Kyung-Mi *et al* (2012) a été réalisée pour étudier l'utilisation potentielle de *Saussurea lappa* comme source d'antioxydant. Plusieurs extraits *Saussurea lappa* de différents solvants ont été étudiés. La capacité inhibitrice résultante de chaque échantillon était dans l'ordre suivant : n-butanol (95,71%), chloroforme (85,60%), éthanol (76,04±4,91%) et l'hexane (15,42±0,82) à une concentration de 500 µg/ml, l'extrait n-butanol a montré l'activité la plus forte. À une concentration de 1000µg/ml, l'extrait d'éthanol et l'extrait n-butanol ont montré les activités les plus fortes. La conclusion de cette étude montre que *Saussurea lappa* pourrait aider à prévenir le stress oxydatif.

Pour le mécanisme de piégeage du radical, la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Certains composés réagissent rapidement avec le DPPH, réduisant un nombre de molécules de DPPH égal au nombre de groupements hydroxyles (Bondet *et al*, 1997).

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. L'effet antioxydant des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxy¹⁸ et à la molécule radicalaire rendue stable. Le radical aroxy subira par la suite un réarrangement structural permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxy (Javanovic *et al*, 1994).

¹⁷ Une molécule qui ne comporte que des électrons appariés (en doublets)

¹⁸ Le radical aroxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde.

III.5 Evaluation de l'activité antibactérienne :

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique sont exprimés dans le (tableau 14), montrant des degrés de sensibilités différentes de la souche bactérienne staphylococcus aureus (gram positif) vis-à-vis les extraits étudiés. L'extrait du costus n'a eu aucun effet sur la souche bactérienne Escherichia coli (gram négatif). (Figure 22)

Tableau 14 : diamètre des zones d'inhibition (en millimètre) de l'extrait hydro-éthanolique du costus sur la croissance de la souche staphylococcus aureus

Concentration de l'extrait	Diamètre d'inhibition	Degrés de sensibilité
200% (120mg/ml)	15,58 mm	Très sensible
150% (80mg/ml)	14,10 mm	Sensible
100% (60mg/ml)	13,02 mm	Sensible
50% (30mg/ml)	12,14 mm	Sensible

D'après le tableau 14 et la figure 21, les résultats montrent clairement un effet antibactérien remarquable de l'extrait hydroéthanolique sur les staphylococcus aureus.

Les résultats révèlent que le plus haut niveau d'activité antibactérien est observé a la concentration 120mg/ml. Le diamètre d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration (80mg/ml, 60mg/ml, 30mg/ml).

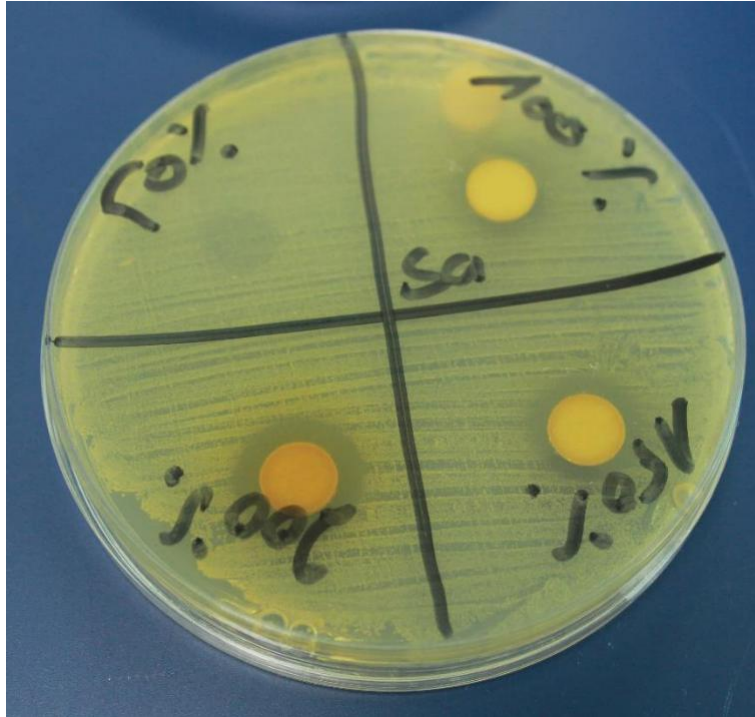


Figure 20: les résultats de l'antibiogramme de staphylococcus aureus



Figure 21 : les résultats de l'antibiogramme d'Escherichia coli

L'activité antibactérienne de l'extrait du costus est due aux différents agents chimiques présents dans cet extrait, y compris les flavonoïdes, les tanins et les terpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Dorman *et al*, 2000).

Une étude a été réalisée par (Kuniyal *et al*, 2013) sur l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *Saussurea lappa*, a été évaluée afin de comparer les effets des principes actifs contre les bactéries gram positives et négatives. Elle a été déterminée par une méthode de diffusion en puits. *Saussurea lappa* a montré un effet inhibiteur sur les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*¹⁹, *Enterococcus faecalis*²⁰, *Staphylococcus aureus*. Il a été observé que les échantillons *Saussurea lappa* contenant les teneurs les plus élevées en costunolide et en déhydrocostus lactone présentaient l'activité antibactérienne la plus élevée.

D'après (Omer *et al*, 2019), les résultats de l'activité antimicrobienne contre des souches de *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et de *Salmonella sp* (Gram négatif) révèlent que l'extrait d'éthanol a une activité antimicrobienne significative contre l'isolat de *Staphylococcus aureus*, avec une zone d'inhibition de 18-20 mm, alors qu'aucun effet n'a été observé contre *Salmonella sp*. Avec des analyses chromatographiques ils ont conclu que l'extrait d'éthanol contient des métabolites secondaires actifs qui peuvent avoir une activité spécifique susceptible d'avoir des effets de synergie avec d'autres métabolites contre les bactéries Gram positif, mais pas contre les bactéries Gram négatif.

(Hasson *et al*, 2013) ont étudié l'activité antimicrobienne de l'extrait d'éthanol de *Saussurea lappa* pour vérifier son utilisation médicinale dans le traitement des infections microbiennes. Les résultats ont démontré que l'extrait éthanolique brut de *Saussurea lappa* a un large spectre d'activité, suggérant qu'il pourrait être utile dans le traitement des infections causées par les isolats (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*²¹, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*²², Bêta-lactamases²³, *Acinetobacter baumannii* cliniques²⁴).

¹⁹ Une espèce de bactéries à Gram négatif anaérobies facultatives de la famille des Enterobacteriaceae.

²⁰ *Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains.

²¹ *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie gram-négative, elle est responsable d'infections multiples de l'organisme : urinaires, cutanées, pulmonaires, ophtalmologiques...

²² *Klebsiella pneumoniae* est à la fois une bactérie commensale de l'organisme, et un agent pathogène responsable d'infections variées. Elle est présente naturellement dans le tube digestif et les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux.

²³ Les β-lactamases sont une famille d'enzymes responsables de la résistance de certaines bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques

²⁴ *Acinetobacter baumannii* est un bacille à Gram-négatif, responsable d'infections multiples, présentant souvent une multi-résistance aux antibiotiques

Conclusion

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, différents aspects de *Saussurea lappa* ont été étudiés : quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits bruts.

L'extraction des racines de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction de la méthode d'extraction utilisées.

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Saussurea lappa* a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. L'activité anti radicalaire est élevée dans l'extrait éthanolique.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur deux souches bactériennes, selon la méthode de diffusion par disque, Les résultats indiquent que l'extrait hydroéthanolique possède une activité antimicrobienne sur staphylococcus aureus mais pas sur Escherichia coli.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de cette plante.

Références bibliographiques

- Azhar R, Saima P, Tonghui M. Costunolide: A novel anticancer sesquiterpene lactone. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2012 ; 7:6-13.
- Ambavade S, Mhetre N, Muthal A, Bodhanka S. Pharmacological evaluation of anticonvulsant activity of root extract of *Saussurea lappa* in mice. *European Journal of Integrative Medicine*. 2009 ; 1(3) :131-137.
- Bapalal, G., 1998. Nighantu Adarsh, vol. I. Chaukhambha Bharti Academy, Varanasi, pp.744–745.
- Bremer, K., 1994. Asteraceae-Ladistic and Classification. Timber Press, Portland, Oregon, U.S.A.
- Bate-Smith E.C. 1954. Astringency in foods. *Food* 23, 419-429.
- Berg, A., 2004. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoterapia* 75, 718–723.
- Charles, N.S., Peter, A.W., Derek, W.G. (2010). *Fundamentals of Inflammation Cambridge University Press: p 2-3.*
- Chandur, U., Shashidhar, S., Chandrasek, S. B., Bhanumathy, M., & Midhun, T. (2011). Phytochemical Evaluation and Anti-Arthritic Activity of Root of *Saussurea lappa*. *Pharmacologia*, 2(9), 265-267.
- Chen, S.F., Li, Y.Q., He, F.Y., 1994. Effect of *Saussurea lappa* on gastric functions *Zhongguo Zhong xi yi Jie He Za Zhi* 14, 406–408.
- Cho, J.Y., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Jung, J.H., Lee, J., Park, M.H., 1998 Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophage like cells. *Planta Medica* 64, 594–597.
- Cho, J.Y., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Jung, J.H., Lee, J., Park, M.H., 1999. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.3 cells. *Natural Product Science* 5, 12–19.
- Cho, J.Y., Baik, K.U., Jung, J.H., Park, M.H., 2000. In vitro anti-inflammatory effect of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *European Journal of Pharmacology* 398, 399–407.
- Choi EM, Kim GH, Lee YS (2009a) Protective effects of dehydrocostus lactone against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Toxicol Vitro* 23:862–86
- Chopra, R.N., Nayar, S.L., Chopra, I.C., 1956. *Glossary of Indian Medicinal Plants*. Publication and Information Directorate, CSIR, New Delhi, India
- Dhar, G.H., Virjee, P., Kachroo, P., Buth, G.M., 1984. Ethnobotany of Kashmir—I. Sind valley. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 5, 668–675.
- Ibrahim, M., Kainulainen, P., & Aflatuni, A. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity, and phytotoxicity of essential oils; with special reference to limonene and its suitability for control insect pest. *Agricultural and food science in Finland*, 10, 243-259.
- Igor Passi L.B. (2002). Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloides*, lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie. Bamako : p 133
- Jeong SJ, Itokawa T, Shibuya M, Kuwano M, Ono M, Higuchi R, Miyamoto T (2002) Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. *Cancer Lett* 187:129–133
- Jin, M., Lee, H.J., Ryu, J.H., Chung, K.S., 2000. Inhibition of LPS-induced NO Production and NF-kappa B activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa*. *Archives of Pharmacological Research* 23, 54–58.

- Jain, S.P., 1984. Ethnobotany of Morni and Kalesar (Ambala, Haryana). *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 5, 809–813.
- Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppositifolia* et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées- Burkina Faso : p34-42.
- Kang, J.S., Yoon, Y.D., Lee, K.H., Park, S.K., Kim, H.M., 2004. Costunolide inhibits interleukin-1 β expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 171–177.
- Kim, R.M., Jeon, S.E., Choi, Y., 1991. *EuiBangRuChui* (6). Yeokang Publications, Seoul, p. 385.
- Ko SG, Kim HP, Jin DH, Bae HS, Kim SH, Park CH et al. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Letters* 2005; (220):11-19.
- Kala, C.P., Manjekar, N., 1999. Ethnomedicobotany of Indian Trans Himalaya. A case study from Spiti. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 23, 177–183.
- Kapoor, L.D., 2001. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC Press, Washington, D.C, pp. 299–300.
- Kaul, S.C., 1941. Some wild flowers of Kashmir and their indigenous use. *Journal of Bombay Natural History Society* 42, 452–454.
- Kritiker KR, Basu BD (1987) Indian medicinal plants In: Compositae, 2nd Vol. International book distributors, Dehradun, pp 1420–1423.
- Kumar, N., Kumar, A., 1989. Durlabh hoti chamatkaric aushadhi-Kuth. *Sachitra Ayurveda* 1, 25–29.
- Kuniyal, C. P., et al. (2019). "Is cultivation of *Saussurea costus* (Asterales: Asteraceae) sustaining its conservation?" *Journal of Threatened Taxa* 11(13): 14745-14752.
- Lee, S.D., 1986. *Donguei Bogam* (2). Yeokang Publications, Seoul, p. 773. Lirussi, D., Li, J. Prieto, J.M., Gennari, M., Buschiazzi, H., Ríos, J.L., Zaiden-
- Lee, H.J., Kim, N.Y., Jang, M.K., Son, H.J., Kim, K.M., Sohn, D.H., Lee, S.H., Ryu, J.H., 1999. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. *Planta Medica* 65, 104–108.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M., & Croteau, R. (1990). Defense mechanisms of conifers differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology*, 96,44-49.
- Lhuillier, A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : p 214
- Middleton JR. E, Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK : Chapman and Hall ; 1993.
- Miller, B., & al. (2005). Insect-Induced Conifer Defense. White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis, de Novo Formed Volatile Emissions, and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce. *Plant Physiology*, 137.
- Mitra, S.K., Gopumadhavan, S., Hemavathi, T.S., Muralidhar, T.S., Venkataranganna, M.V. 1996. Protective effect of UL-409, an herbal formulation against physical and chemical factor induced gastric and duodenal ulcers in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 165–169.
- Moon S, Yun S, Kook J, Kim H, Choi M, Park B et al. Anticancer activity of *Saussurea lappa* extract by apoptotic pathway in KB human oral cancer cells. *Pharmaceutical Biology*. 2013; 51(11):1372-1377.

- Muhammad S, Bashir S, Muhammad N, Malik R. Cardiotoxic activity of methanolic extract of *Saussurea lappa* Linn roots. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013 ; 26(6) :1197-1201.
- Madhuri, K., Elango, K., & Ponnusankar, S. (2011). *Saussurea lappa* (Kuth root): review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 12(1), 1-9.
- Mittre, V., 1981. Wild plants in Indian folk life a historical perspective. In: Jain, S.K. (Ed.), *Glimpses of Indian Ethnobotany*. Oxford & IBH, New Delhi, India, pp. 37–58.
- Mohammad Mansoob Khan, Nurin Hayatus Saadah, Mohammad Ehtisham Khan, Mohammad Hilnin Harunsani, Ai Ling Tan, Moo Hwan Cho, *Materials Science in Semiconductor Processing* 91 (2019) 194–200.
- Nautiyal, S., Maikuri, R.K., Rao, K.S., Saxena, K.G., 2003. Ethnobotany of the Tolcha Bhotia tribe of the buffer zone villages in Nanda Devi Biosphere Reserve India. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 27, 119–142.
- Nourshargh, S., Fritz, K., et Elisabetta, D. (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology* ; 80 : p 714-718.
- Oh, G.S., Pae, H.O., Chung, H.T., Kwon, J.W., Lee, J.H., Kwon, T.O., Kwon, S.Y., Chon, B.H., Yun, Y.G., 2004. Dehydrocostus lactone enhances tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 26, 163–175.
- Rajender Kumar Sharma *, Shashi Sharma, Shanti S. Sharma, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1 (2014) 92–97.
- Rao, R.R., Chawdhery, H.J., Hajra, P.K., Kumar, S., Pant, P.C., Naithani, B.D., Uniyal, B.P., Mathur, R., Mangain, S.K., 1988. *Flora Indicae Enumeratio-Asteraceae*. BSI, Calcutta.
- Rao RN, Raju SS, Babu KS, Vadaparthi PRR. HPLC determination of costunolide as a marker of *Saussurea lappa* and its herbal formulations. *Int J Biochem* 2013; 3(1): 99-107.
- Rawat, G.S., Pangtey, Y.P.S., 1987. A contribution to the ethnobotany of Alpine regions of Kumaon. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 11, 139–148.
- Rasha Mohamed Hussein Ayoub. Saad, Mohamed Osman Alaagib. (2015). on the chemical composition and antibacterial activity of *Saussurea lappa* (Asteraceae). *The Pharma Innovation Journal*, 73-76.
- Singh. Chahal. Singla, Ravinder. KK. N. (2017). Chemical composition and pharmacological activities of *Saussurea lappa*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1298-1308.
- Sunkara Y, Robinson A, Suresh B, Naidu K, Vishnuvardhan M, Ramakrishna M et al. Anti-inflammatory and cytotoxic activity of chloroform extract of roots of *Saussurea lappa*. *Journal of Pharmacy Research*. 2010; 3(8):1775-1778.
- Shah, N.C., 1982. Herbal folk medicines in northern India. *Journal of Ethnopharmacology* 6, 293–301.
- Singh, G., 1999. Ethnobotanical study of useful plants of Kullu districts in northwestern Himalayas, India. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 23, 185–198.
- Taniguchi, M., Kataoka, T., Suzuki, H., Uramoto, M., Ando, M., Arai, K., Magae, J., Nishimura, T., Otake, N., Nagai, K., 1995. Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 2064–2067.
- Tsarong, T., 1994. *Tibetan Medicinal Plants*. Tibetan Medical Publications, India.

- Upadhyay, O.P., Ojha, J.K., Bajpai, H.S., 1994. Experimental study on hypolipidaemic activity of kustha (*Saussurea lappa* Clarke). *Journal of Research in Ayurveda and Siddha* 15, 52–63.
- Venkataranganna, M.V., Gopumadhavan, S., Sundaram, R., Mitra, S.K., 1998. Evaluation of possible mechanism of antiulcerogenic activity of UL-409 an herbal preparation. *Journal of Ethnopharmacology* 63, 187–192
- Yaesh S, Jamal Q, Shah AJ, Gilani AH (2010) Antihepatotoxic activity of *Saussurea lappa* extract on D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatitis in mice. *Phytother Res* 24:229–232
- Yamahara, J., Kobayashi, M., Miki, K., Kozuka, M., Sawada, T., Fujimura, H., 1985. Cholagogic and antiulcer effect of *Saussurea radix* and its components. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33, 1285–1288.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant.Food Human.Nutrition*; 59: p 113-122.
- Yang, Li, Chen, Xu, Qiang, Zhang, Jun, Yan, Liu S Ren, Xiang, Tan, 2005. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 329–333.
- Yoshikawa, M., Hatakeyama, S., Inoue, Y., Yamahara, J., 1993. Saussureamines A, B, C, D and E, new anti-ulcer principles from Chinese *Saussurea radix*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 41, 214–216.
- Youn K, Sung G, Sang M, Yee J, Jeakyung J, Wooyoung K et al. *Saussurea lappa* Clarke-derived costunolide prevents TNF -induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- B activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. Article ID 936257: 10.
- Yu, H.-H., Lee, J.-S., Lee, K.-H., Kim, K.-Y., You, Y.-O., 2006. *Saussurealappa* inhibits the growth, acid production, adhesion, and water-insolubleglucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, doi:10.1016/j.jep.2006.12.008.
- Yuuya, S., Hagiwara, H., Suzuki, T., Ando, M., Yamada, A., Suda, K., Kataoka, T., Nagai, K., 1999. Guaianolides as immunomodulators, synthesis and biological activities of dehydrocostus lactone, mokko lactone, eremanthin, and their derivatives. *Journal of Natural Product* 62, 22–30.
- ZERBATO Mélina, Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie. (2010, janvier) thèse de doctorat.
- Zahara, K., Tabassum, S., Sabir, S., Arshad, M., Qureshi, R., Amjad, M. S., & Chaudhari, S. K. (2014). A review of therapeutic potential of *Saussurea lappa*-An endangered plant from Himalaya, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.