

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences Nature et vie

Département de Biologie physiologique et cellulaire

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} cycle

En Sciences Biologiques

Option : Biologie et santé

**ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES D'UNE
PLANTE : *Cestrum parqui***

Par

Selma NAKKAB

Devant le jury composé de :

D. GUETARNI	Professeur, USD de Blida 1	Président
F. HAMAI	Professeur, USD de Blida 1	Examineur
H. CHADER	Maître de conférences A, Faculté de médecine, U. d' Alger	Examineur
G. TAIL	Professeur, USD de Blida 1	Promoteur
F.Z. KARA	Professeur, USD de Blida 1	Co-Promoteur

Blida, 01/10/2019

DEDICACES

À la mémoire de ...

Mes grands-parents ; MALLEM Belkacem, CHAIB Aicha,

NAKKAB Ali, et ZAIDI Zohra.

Mes beaux-parents ; DJELLATOU Mostapha, et RABAH Rokea.

*À mes chers parents ; Boudjemaâ et Hafida, que ce travail soit le témoin de
vos sacrifices,*

À Sabah, Amina, Zakaria, et Yahia,

*À mes tantes et mes oncles ; Zohra, Selma, Fatma, Hamida, Mohamed Taher,
Othmane, et Ahmed,*

À Mon mari DJELLATOU Redha,

À mes chers enfants ; Mohamed Mostapha et Narimane.

Selma

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

الحمد لله الذي أعانني على إنهاء هذا العمل و سخر ل القوة لإتمامه فكل توفيق منه وحده و كل سهو أو خطأ فمني و من الشيطان .

C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse, et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie qui se tourne.

Je tiens tout d'abord à remercier Professeur SAIDI F. pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et son laboratoire et pour ses conseils toujours très avisés. Merci pour toutes les discussions autour de mon sujet de thèse. Consciente de vos nombreuses responsabilités, je suis particulièrement touchée du temps que vous m'avez accordé.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de thèse ; Professeur TAIL G. d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Ainsi, que pour sa gentillesse, ses conseils constructifs, son attention, et la grande autonomie qu'elle m'a accordée. J'espère être à la hauteur de sa confiance et de ses espérances. A ma co-directrice ; Professeur KARA F/Z. je vous adresse mes plus vifs remerciements d'avoir accepté de me co-encadrer. Je tiens également à exprimer à mes deux directrices mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Je tiens vivement à remercier, Mme AZINE K., Mr CHADER H., Mme EDDEIKRA N., Mr HMIDA A/N., et Mr TAFABI D. de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, de leurs confiances, et pour leurs encadrements exemplaires.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants, ingénieurs, techniciens, et administrateurs du département de Biologie. Université de Blida1.

Je veux exprimer mes vifs remerciements à Pr. GUETARNI D. pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je suis également très reconnaissant à Mme HAMAIDI F. qui a gentiment accepté de juger et de siéger dans le jury de ma thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr CHADER H. pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger.

Ma gratitude va également à l'égard du Mr BELAID S., Mr BOUZIFI E., Mme NIRI A., et Melle ISAAD N.

Que vous direz mes chers parents ? Vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute..... Tous les mots ne suffiraient pas....sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien, votre amour et pour avoir cru à moi, merci à mes proches notamment mes sœurs ; Sabah et Amina, mes frères ; Zakaria et Yahia, et mes chères tantes : Selma et Hamida.

Une pensée très spéciale pour mon mari ; Redha, qui m'a toujours encouragé, son soutien qui a été si précieux pour moi, et son aide surtout aux moments où j'ai senti que je n'y arriverais jamais. Cette thèse est la tienne aussi....

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse. Que ceux qui ne sont pas nommés ici me pardonnent, s'ils ont été oubliés, ce n'est que par l'écrit.....

RESUME

C*estrum parqui* ; appelée communément "Mesk elile" est une plante de la famille des *Solanaceae* ; une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées dans l'alimentation et par les thérapeutes traditionnels.

L'enquête ethnobotanique menée sur terrain auprès de certaines personnes, phytothérapeutes, et herboristes , nous ont permis de collecter des informations très importantes sur cette plante.

La détermination préliminaire de la composition phytochimique des extraits de feuilles de polarité croissante (L'extrait éthanolique (EE-F), l'extrait étheropétrolique (EEP-F), et l'extrait aqueux (EA-F)) a permis de mettre en évidence la présence principalement des alcaloïdes, des polyphénols, des saponines, et des terpénoïdes.

En outre, l'étude préliminaire de la toxicité aigüe *in vivo*, a montré que les trois extraits de feuilles ne sont pas toxiques, et aucun signe de toxicité évidente n'a été noté dans tous les lots suivis.

L'évaluation pharmacologique *in vivo* a démontré que ces extraits possèdent des propriétés anti-inflammatoires importantes sur l'œdème des pattes des souris. L'EE-F à 400 ug/ml s'est révélé l'extrait le plus actif avec un taux de réduction important de 78.247% de l'œdème par rapport à l'EEP-E et l'EA-F.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des extraits de feuilles a été réalisée par deux méthodes, à savoir : Le piégeage du radical DPPH, et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). Ainsi, l'EA-F est le meilleur extrait qui a donné des CI50 de 0.967 et de 1.218 mg/ml pour la méthode de réduction de DPPH et celle de FRAP respectivement.

Ces différents extraits ont été également soumis à un test *in vitro* pour leur éventuelle activité antibactérienne et antifongique. L'EEP-F est l'extrait

antibactérien le plus actif principalement sur les bactéries à Gram négatif. En revanche, l'EA-F s'est révélé l'extrait antifongique le plus efficace spécialement sur *Candida albicans* et *Penicillium chrysogenum*.

Les résultats obtenus par l'étude de cytotoxicité prouvent que les extraits de feuilles sont faiblement cytotoxiques sur la lignée cellulaire monocyttaire d'origine leucémiques ; les *Thp1* ; avec des CC50 supérieures à 400 ug/ml par deux méthodes; l'EEP-F s'est montré d'une efficacité remarquable, et il a démontré des CC50 moins inférieures comparativement aux d'autres extraits (417.71 ug/ml par la méthode de l'inclusion au bleu de Trypan à 0.4%, et 432.11 ug/ml par la méthode colorimétrique du MTT).

En fin, l'étude du pouvoir antileishmanien des extraits de feuilles par les tests de bleu de Trypan, et de MTT, a montré que l'EEP-F est beaucoup plus antileishmanien que l'EE-F avec des CI50 inférieures à 25 ug/ml, tandis que l'EA-F s'est révélé inactif sur la forme promastigote des deux souches testées (*L. major*, et *L. infantum*).

Mots clés : *Cestrum parqui*, Extraits de feuilles, Enquête ethnobotanique, Composition phytochimique, Toxicité aigüe, Activité antiinflammatoire, Activité antibactérienne et antifongique, Activité antioxydante, Activité cytotoxique, et activité antileishmanienne.

ABSTRACT

C *estrum parqui*; commonly called " Mesk elile " is a plant of the family of *Solanaceae*; one of the most important families in the Algerian flora and the most used in the diet and by the traditional therapists, our work in this thesis aims at a contribution of the valorization of this plant.

The ethnobotanical survey conducted in the field with certain people, herbalists and herbalists allowed us to collect very important information about this plant.

Preliminary determination of the phytochemical composition of leaf extracts of increasing polarity (Ethanol extract (EE-F), ether-petroleum extract (EEP-F), and aqueous extract (EA-F)) made it possible to highlighting the presence mainly of alkaloids, polyphenols, saponins, and terpenoids.

In addition, the introductory study of acute toxicity *in vivo*, showed that all three extracts of leaf were non-toxic, and no evidence of obvious toxicity was noted in all batches monitored.

A pharmacological evaluation *In vivo* has shown that these extracts have pronounced anti-inflammatory properties on the edema of the legs of the mice. EE-F at 400 µg / ml was the most active extract with a significant reduction in edema (78.247%) compared with EEP-E and EA-F.

The *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of extracts of leafs was carried out by two methods, namely: DPPH radical scavenging, and the ferric ion reducing power (FRAP). Thus, EA-F is the best extract that gave IC₅₀s of 0.967 and 1.218 mg / ml for the DPPH and FRAP reduction methods respectively.

These different extracts were also screened for their possible antibacterial and antifungal activity. EEP-F is the most active antibacterial extract mainly on Gram-negative bacteria. In contrast, EA-F was the most effective antifungal extract especially on *Candida albicans* and *Penicillium chrysogenum*.

The results obtained by the cytotoxicity study prove that leaf extracts are weakly cytotoxic on the leukemic cell monocyte cell line; Thp1; with CC50s greater than 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ by two methods; EEP-F was remarkably effective, and demonstrated lower levels of CC50 compared to other extracts (417.71 $\mu\text{g} / \text{ml}$ by 0.4% Trypan blue inclusion method), and 432.11 $\mu\text{g} / \text{ml}$ by the colorimetric method of MTT).

Finally, the study of the antileishmanial potency of leaf extracts by Trypan Blue and MTT tests, showed that EEP-F is much more antileishmanian than EE-F with IC50 values below 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, while EA-F was inactive on the promastigote form of both strains tested (*L. major*, and *L. infantum*).

Key words: *Cestrum parqui*, extracts of leaves, Ethnobotanical survey, Phytochemical composition, Acute toxicity, Anti-inflammatory activity, Antibacterial and antifungal activity, Antioxidant activity, Cytotoxicity study, and antileishmanian potency.

ملخص

Cestrum parqui ويسمى عادة " مسك الليل " " هو نبات من أسرة *Solanaceae* ؛ واحدة من أهم العائلات في النباتات الجزائرية والأكثر استخدامًا في النظام الغذائي و من طرف المعالجين التقليديين ، يهدف عملنا في هذه الرسالة إلى المساهمة في تثمين هذا المصنع.

وقد أتاح لنا المسح الإحصائي الباثولوجي الذي أجري في هذا المجال مع أشخاص معينين ، وأعشاب ، وأعشاب ، جمع معلومات مهمة جدًا عن هذه النبة.

بيّن التقرير الاولي للتكوين الكيميائي النباتي لمستخلصات الاوراق (مستخلص الكحولي(EE-F) ، مستخلص الايتروبتول(EEP-F) ، والمستخلص المائي (EA-F) على وجود بشكل رئيسي *polyphénols* ، *alcaloïdes* ، *saponins* و *terpenoids*

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسة التمهيدية للسمية الحادة في الجسم الحي أن جميع مستخلصات الأوراق الثلاثة غير سامة، ولم يلاحظ أي علامات على سمية واضحة في جميع الدفعات التي تم رصدها.

وقد أظهرت التقييم الدوائي على اختبار ضد انتفاخ اقدم الفئران أن هذه المستخلصات لها خصائص المضادات للالتهابات. كان EE-F عند 400 ميكروجرام / مل اكثر المستخلصات تأثيرا بنسبة 78.247% مقارنة مع EEP-E و EA-F

اما في ما يخص اختبار قدرة المستخلصات كمضادات الاكسدة، فقد تم بطريقتين، و هما؛ طريقة ارجاع "DPPH" و طريقة ارجاع ايونات الحديد "FRAP" و بالتالي فإن المستخلص EA-F هو أفضل مستخلص الذي اعطى قيمة تركيزات تثبيط 50 % من 0.967 و 1.218 ميكروجرام / مل لطريقة DPPH و FRAP على التوالي.

كما تم فحص هذه المستخلصات المختلفة لنشاطها المضاد للبكتيريا و للفطريات حيث ان EEP-F هو أكثر مستخلصات فعالية على البكتيريا سالبة الجرام في المقام الأول، في المقابل ، كان EA-F أكثر مستخلصات فعالية على الفطريات خاصة على *Candida albicans* و *Penicillium chrysogenum*

النتائج التي تم الحصول عليها من خلال دراسة السمية الخلوية تثبت أن مستخلصات الأوراق ضعيفة السمية على خلية الوحيدات اللمفاوية "THP1" مع قيم التراكيز التي اوقفت التكاثر الخلوي لهذه الخلايا أكبر من 400 ميكروغرام / مل ؛ و كان EEP-F فعال بشكل ملحوظ ، وأظهر فعالية ملحوظة مقارنة بالمستخرجات الأخرى (417.71 ميكروغرام / مل بواسطة طريقة التريبان الأزرق 0.4% ، و 432.11 ميكروغرام / مل بالطريقة اللونية ل-MTT) .

في الاخير, اظهرت دراسة قدرة المستخلصات الثلاثة ضد اللشمانيا بطريقة التريبان الازرق و الطريقة اللونية ل MTT, حيث ان EEP-F اظهر قدرة ضد طفيليات اللشمانيا اكثر من EE-F مع تراكيز التثبيط اصغر من 25 ميكروغرام/مل, بينما EA-F اظهر القدرة الاضعف على كلتا العينتين المدروستين (*L. major*, et *L. infantum*).

كلمات البحث: *Cestrum parqui*, مستخلصات الاوراق, المسح اثنونباتية, التركيب الكيميائي, السمية الحادة, اختبار ضد انتفاخ, مضاد للجراثيم ومضاد للفطريات, مضاد للأكسدة, دراسة السمية الخلوية, و اختبار ضد الليشمانيات.

TABLE DES MATIERES

	Page
Remerciements	
Dédicaces	
Appendices	
Résumé	
Introduction	20
PARTIE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Généralités sur la phytothérapie et la toxicité des plantes médicinales.	22
1.2. Généralités sur la plante étudiée : <i>Cestrum parqui</i> .	32
1.3. Généralités sur les leishmanioses et les agents antileishmanien.	38
1.4. Généralités sur la leucémie aiguë et les lignées cellulaires humaines.	45
1.5. Généralités sur les infections bactériennes et fongiques et les agents antimicrobiens.	51
1.6. Généralités sur le stress oxydatif et les antioxydants.	56
1.7. Généralités sur l'inflammation et les agents antiinflammatoires.	61
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	
2.1. Récolte et séchage du matériel végétal.	94
2.2. Identification botanique de <i>C.parqui</i> .	95
2.3. Traitement et préparation de la poudre végétale.	95
2.4. Enquête ethnobotanique et socio-économique.	95
2.5. Etude botanique de la plante.	96
2.6. Analyses phytochimique.	97
2.6.1. Détermination de la teneur en eau.	97
2.6.2. Détermination de l'humidité.	98
2.6.3. Détermination de la teneur en cendres.	98
2.6.4. Extraction des composés actifs de feuilles de <i>Cestrum parqui</i> .	99
2.6.5. Contrôle de la réussite des extractions des trois extraits.	101
2.6.6. Screening triphytochimique des extraits de feuilles de <i>Cestrum parqui</i> ; l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F.	102
2.7. Analyses biologiques.	105
2.7.1. Contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de <i>C.parqui</i> .	105
2.7.2. Etude de toxicité aiguë de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles <i>C.parqui in vivo</i> .	107
2.7.3. Activité antileishmanienne <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C. parqui</i> sur <i>Leishmania infantum</i> et <i>Leishmania major</i> .	114

2.7.4. Test de cytotoxicité <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire leucémique ; <i>Thp1</i> .	119
2.7.5. Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	121
2.7.6. Activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	126
2.7.7. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	130

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique.	141
3.2. Résultats de l'étude macroscopique.	153
3.3. Résultats de l'étude microscopique de la feuille.	156
3.4. Résultats d'analyses phytochimiques.	157
3.4.1. Détermination de la teneur en eau.	157
3.4.2. Détermination de taux d'humidité.	158
3.4.3. Détermination de la teneur en cendres.	158
3.4.4. Résultats de l'extraction des composés actifs de feuilles de <i>Cestrum parqui</i> .	159
3.4.5. Résultats de l'analyse des extraits par spectrophotométrie.	160
3.4.6. Résultats du screening triphytochimique des extraits.	175
3.5. Résultats d'analyses biologiques.	177
3.5.1. Contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de <i>C.parqui</i> .	177
3.5.2. Résultats de l'étude de toxicité aiguë <i>in vivo</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles <i>C.parqui</i> .	179
3.5.3. Résultats de l'activité antileishmanienne <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	189
3.5.4. Résultats de test de cytotoxicité <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire d'origine leucocytaire ; les <i>Thp1</i> .	200
3.5.5. Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	207
3.5.6. Résultats de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	219
3.5.7. Résultats de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> .	227
Conclusion	234
Annexes	
Références	

LISTE DES TABLEAUX

Titre de tableau	Page
Tableau 1.1 : Moments de récolte des différentes parties des plantes.	23
Tableau 1.2 : Modes d'obtention des tisanes.	23
Tableau 1.3 : Différentes classes des composés phénoliques.	24
Tableau 1.4 : Quelques modifications au cours de cycle de vie de <i>C.parqui</i> .	34
Tableau 1.5 : Systématique de genre <i>Leishmania</i>	38
Tableau 1.6 : Taxonomie des leishmanies.	39
Tableau 1.7 : Quatre grands types des agents antimoraux.	46
Tableau 1.8 : Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme.	54
Tableau 1.9 : Classe des antifongiques.	54
Tableau 1.10 : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques.	57
Tableau 1.11 : Exemples de maladies liées à l'inflammation.	66
Tableau 1.12 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.	67
Tableau 1.13 : Les principaux AIS.	67
Tableau 2.1 : Récolte de matériel végétal	68
Tableau 2.2 : Animaux et conditions contrôlées de l'animalerie.	82
Tableau 2.3 : Evaluation de charge parasitaire.	89
Tableau 2.4 : Différentes concentration des produits testés et solutions de dilutions.	91
Tableau 2.5: Souches microbiennes testées et leurs provenances.	96
Tableau 2.6 : Répartition des doses des différents produits testés.	99
Tableau 2.7: Concentrations des différents produits et nature des solutions de dilutions.	101
Tableau 2.8 : Animaux et conditions contrôlées de l'animalerie.	104
Tableau 2.9 : Répartitions des doses des produits testés entres les différents lots.	106
Tableau 3.1 : Préparations traditionnelles des différentes parties de <i>C.parqui</i>	118
Tableau 3.2 : Teneur en cendre de <i>C.parqui</i> .	126
Tableau 3.3 : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait éthanolique de feuilles (EE-F) de <i>C.parqui</i> .	128
Tableau 3.4 : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait étheropétrolique de feuilles de <i>C.parqui</i> .	129
Tableau 3.5 : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait aqueux de feuilles de <i>C.parqui</i> .	130
Tableau 3.6 : Pics majoritaires détectés des trois extraits (EE-F, EEP-F, et EA-F) par l'infrarouge (IR)	138
Tableau 3.7 : Résultats du screening phytochimique de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F.	142
Tableau 3.8 : Résultats du contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de <i>C.parqui</i> .	145
Tableau 3.9 : Résultat du test préliminaire à 300 mg/kg <i>p.c.</i> et à 2000 mg/kg <i>p.c.</i>	147
Tableau 3.10 : Résultat de l'étude principale à 2000 mg/kg <i>p.c.</i>	148
Tableau 3.11 : Observation clinique des lots traités.	149
Tableau 3.12 : Effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération parasitaire par la méthode de BT.	156

Tableau 3.13 : Résultats des CI50 des différents produits par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan 0.4%.	159
Tableau 3.14 : Effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération parasitaire des deux souches par la méthode de MTT.	161
Tableau 3.15 : Résultats des CI50 des différents produits par la méthode de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT.	163
Tableau 3.16 : Index de sélectivité (IS) des extraits de feuilles de <i>C.parqui</i> par les deux méthodes.	165
Tableau 3.17 : Effet de DMSO à 0.5% sur la croissance des <i>Thp1</i> .	168
Tableau 3.18 : Effet cytotoxique des extraits de feuilles de <i>C.parqui</i> par les deux méthodes.	172
Tableau 3.19 : Résultats de la capacité antioxydante et les CI50 des différents produits par la méthode de réduction de DPPH.	188
Tableau 3.20 : Pouvoir réducteur des ions ferriques et les CE50 des trois extraits et des témoins positifs.	190
Tableau 3.21 : Comparaison de pourcentage de formation de l'œdème de patte entre les produits témoins.	195

LISTE DES FIGURES

Titre de figure	page
Figure 1.1 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes.	24
Figure 1.2 : Exemple des phénols simples.	25
Figure 1.3 : Structure chimique de quelques coumarines.	26
Figure 1.4 : Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane, et des lignanes.	26
Figure 1.5 : Structure chimique de quelques anthocyanidines.	27
Figure 1.6 : Structure chimique de quelques tannoïdes.	27
Figure 1.7 : Squelette moléculaire d'un Flavan-3-ol.	28
Figure 1.8 : Quelques motifs quinoliques.	28
Figure 1.9 : Exemples des monoterpènes.	29
Figure 1.10 : Quelques exemples de sesquiterpènes.	29
Figure 1.11 : Exemples de structures terpénoïdiques.	29
Figure 1.12 : Exemple de structures alcaloïdiques.	30
Figure 1.13 : A et B : Vues générales de <i>Cestrum parqui</i> .	33
Figure 1.14 : Différentes parties de <i>Cestrum parqui</i> .	34
Figure 1.15 : Diterpénoïde de type kaurane (Carboxyparquine).	35
Figure 1.16 : Solasonine.	35
Figure 1.17 : Structure chimique d'un néolignane, un sesquinéolignane, et un norlignane.	36
Figure 1.18 : Différentiation au niveau de tube digestif chez le vecteur.	40
Figure 1.19: Enfant atteint de leishmaniose viscérale.	41
Figure 1.20 : Lésions ulcératives de la leishmaniose cutanée.	42
Figure 1.21 : Structures des différents médicaments utilisés actuellement.	43
Figure 1.22: Aspect des agrégats cellulaire d'une culture des <i>Thp1</i> .	49
Figure 1.23: Observation en microscopie à contraste de phase de la différenciation des monocytes <i>THP1</i> en macrophages.	50
Figure 2.1 : Carte géographique d'Alger, zone de récolte	68
Photo 2.2 : Herbar de <i>C. parqui</i> conservé à l'INSA-EL HARRACH	69
Figure 2.3: Différentes étapes de la réalisation des coupes histologiques	71
Photo 2.4 : Appareil de Soxhlet.	73
Photo 2.6 : Pastilles KBr des trois extraits.	76
Photo 2.7 : Administrations orale par la sonde de gavage	85
Figure 2.8 : Etapes du test de toxicité aiguë des extraits de feuilles de <i>C.parqui</i> selon la ligne directrice N°420.	86
Photo 2.9: Dissection des souris et prélèvements des organes.	88
Figure 2.10 : Etapes du test de toxicité aiguë de l'EE-F, l'EFP-F, et l'EA-F de feuilles de <i>C.parqui</i> selon la méthode de test limite- OCDE N°423.	88
Figure 2.11 : A : Milieu NNN, B : Milieu RPMI 1640	89
Figure 2.12 : Etapes de préparation des solutions mères des deux souches de <i>Leishmania</i> .	90
Photo 2.13 : Lecture des microplaques	93
Photo 2.14 : <i>Thp1</i> cultivées après 48 h	93

Photo 2.15: Coloration des puits par le bleu de Trypan à 0.4%	94
Photo 2.16 : Densitomètre	98
Photo 2.17 : A : solutions mères des extraits, B, C : Dépôt des disques sur la gélose	
Figure 2.18: Formes réduite et oxydée de DPPH	100
Figure 2.19 : Forme réduite et oxydée de Fer ferrique	103
Photo 2.20 : Gavage des souris et formation de l'œdème de patte	107
Figure 2.21: Schéma détaillant les différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire.	107
Figure 3.1 : Pourcentage de répartition des personnes : A : Selon le sexe, B : Selon l'âge.	108
Figure 3.2 : Pourcentage de répartition des personnes : A : Selon le niveau scolaire, B : Selon la région.	109
Figure 3.3 : Pourcentages des répartitions des personnes selon la situation familiale (A), et selon le niveau socio-économique (B).	109
Figure 3.4 : Connaissance de la phytothérapie.	110
Figure 3.5 : Utilisation des remèdes traditionnels ; A : la nature de maitre soignant, B : l'association ou non avec les médicaments conventionnels.	111
Figure 3.6 : Type de générations d'âge.	111
Figure 3.7: Pourcentage de répartition des réponses selon la nature des plantes récoltée (A) et les conditions de récolte (B).	112
Figure 3.8 : Pourcentage de répartition des réponses selon les parties utilisées de la plante.	112
Figure 3.9 : Pourcentage de répartition des réponses selon la recommandation du séchage (A) et de broyage (B).	112
Figure 3.10 : Pourcentage de répartition des réponses sur la durée de conservation des plantes.	113
Figure 3.11 : Modes (A) et solvants(B) utilisés lors de la préparation des remèdes.	114
Figure 3.12 : Résultats du traitement traditionnel : A : Effet secondaire, B : Degrés de l'efficacité du traitement traditionnel.	114
Figure 3.13 : Connaissances sur le <i>Cestrum parqui</i> .	115
Figure 3.14 : Période de récolte de <i>C.parqui</i> .	115
Figure 3.15 : Parties utilisées de <i>C.parqui</i> .	115
Figure 3.16. : Utilisation traditionnelle de <i>C.parqui</i> .	116
Figure 3.17 : Maladies traitées par le <i>C.parqui</i> .	116
Figure 3.18 : Effets secondaires de <i>C.parqui</i> .	117
Photo 3.19 : Rameaux (A) et position de feuillage (B) (Gx2.5).	121
Photo 3.20 : Taille de feuille (A) et nervures (B) (Gx4.5).	121
Photo 3.21 : Position des fleurs par rapport aux rameaux (A), et taille de fleur (B).	121
Photo 3.22 : Fleur vue du dos (A), et de profil (B) (Gx4.5).	122
Photo 3.23 : (A) : Fleur fermée, B : vue de profil de calice (Gx4.5).	122
Photo 3.24 : (A) : Position des étamines par rapport au style, (B et C) : Style (Gx4.5).	122
Photo 3.25 : (A) : Coupe transversale de l'ovaire, (B) vue de profil de l'ovaire (Gx4.5).	122
Photo 3.26 : Coupe transversale de la nervure principale de la feuille (En haut Gx10) (En bas Gx40).	123
Photo 3.27 : Coupe transversale de feuille (Gx10).	124

Photo 3.28 : Stromas au niveau de feuilles (G×40).	124
Figure 3.29 : Teneur en eau (%).	125
Figure 3.30 : Taux d'humidité (%).	125
Figure 3.31 : Rendement de l'extraction solide-liquide.	126
Figure 3.32 : Spectre d'analyse par la spectrophotométrie à l'UV-Visible de l'EE-F.	127
Figure 3.33 : Spectre d'analyse par la spectrophotométrie UV-Visible de l'EEP-F.	129
Figure 3.34: Spectre d'analyse par la spectrophotométrie à l'UV-Visible de l'EA-F.	130
Figure 3.35 : Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EE-F.	133
Figure 3.36: Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EEP-F.	134
Figure 3.37: Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EA-F.	137
Photo 3.38 : Indice de mousse de l'EA-F (Méthode de dosage)	143
Photo 3.39 : Quelques résultats de screening chimique de l'EA-F	144
Figure 3.40 : Comparaison intragroupe de poids des souris traitées.	150
Figure 3.41 : Comparaison globale intergroupe entre les moyennes de poids des souris.	151
Photo 3.42 : Souris disséquée (Gauche) et organes prélevés (Droite).	152
Figure 3.43 : Comparaison intragroupe des poids des rates des lots traités par rapport aux lots témoins.	152
Figure 3.44 : Comparaison intragroupe des poids des foies des lots traités par rapport aux lots témoins.	153
Figure 3.45 : Comparaison intragroupe des poids des reins des lots traités par rapport aux lots témoins.	153
Figure 3.46 : Comparaison intragroupe des poids des cerveaux des lots traités par rapport aux lots témoins.	154
Figure 3.47 : Comparaison intragroupe des poids des cœurs des lots traités par rapport aux lots témoins.	154
Figure 3.48 : Comparaison intragroupe des poids des poumons des lots traités par rapport aux lots témoins.	155
Figure 3.49 : Effet antileishmanien de l'EE-F, l'EEP-F, l'EA-F, et le SBIII sur la vitalité de la LIPA 100/09 et la LIPA 15/05 par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan (BT) 0.4%.	158
Figure 3.50 : Résultats de comparaison intergroupe de pourcentage de vitalité (%) de LIPA 100/09 et LIPA 15/05 vis-à-vis les produits testés par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan 0.4%.	160
Figure 3.51 : Effet antileishmanien de l'EE-F, l'EEP-F, l'EA-F, et le SBIII sur le % de l'inhibition de la LIPA 100/09 et la LIPA 15/05 par la méthode de réduction des sels de tétrazolium ; MTT.	162
Figure 3.52: Résultats de comparaison intergroupe de pourcentage de vitalité (%) de LIPA 100/09 et LIPA 15/05 vis-à-vis les produits testés par la méthode de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT.	164
Photo 3.53 : Effet de DMSO à 0.5% sur les <i>Thp1</i> (20×0,4).	168
Photo 3.54 : Coloration au bleu de Trypan à 0.4% des différents puits des <i>Thp1</i> misent en contact avec les différentes concentrations des trois extraits et observés sous microscope inversé (20×0,4).	170
Figure 3.55 : Effet cytotoxique des extraits de feuilles <i>C.parqui</i> sur les <i>Thp1A</i> : EE-F, B : EEP-F, C : EA-F.	171
Figure 3.56 : Effet antibactérien des témoins positifs : A : Ciprofloxacine 2	175

mg/ml, B : Céfazoline 10 mg/ml.	
Figure 3.57 : Effet de la Ciprofloxacine 0.1mg/dis. et la Céfazoline 0.5 mg/dis sur quelques souches bactériennes testées	176
Figure 3.58 : Effet antibactérien de l'EE-F à 100 mg/ml.	177
Figure 3.59 : Effet antibactérien de l'EEP-F à 100 mg/ml.	178
Figure 3.60 : Effet antibactérien de l'EA-F : A : EA-F à 10%, B : EA-F à 20%.	179
Figure 3.61 : Effet de l'EE-F et l'EEP-F à 100 mg/ml sur quelques souches.	180
Figure 3.62 : Effet antifongique de tous les produits testés.	183
Photo 3.63 : Effet de l'Amphotéricine B 0.5 mg, (A et C) et le Métronidazole 0.25mg (B et D) sur <i>Aspergillus niger</i> (Haut), et <i>Candida albicans</i> (En bas).	184
Photo 3.64 : Effet de l'EE-F et l'EEP-F de 20 mg/ml de <i>C.parqui</i> sur <i>Candida albicans</i> (gauche) et <i>Aspergillus niger</i> (Droite).	184
Figure 3.65 : Pourcentages d'inhibition (%) de DPPH des trois extraits et les témoins positifs.	187
Figure 3.66 : Comparaison intergroupe globale de pouvoir antioxydant sur le DPPH des différentes concentrations des différents produits testés.	189
Figure 3.67 : Pouvoir réducteur des ions ferriques des trois extraits et les témoins positifs (Absorbance à 700 nm).	192
Figure 3.68 : Comparaison intergroupe globale de pouvoir antioxydant sur les ions ferriques des différentes concentrations des différents produits testés	193
Photo 3.69 : Œdème de la patte gauche de souris.	194
Figure 3.70 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème des pattes des souris de l'EE-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits.	195
Figure 3.71 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris de l'EEP-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits.	196
Figure 3.72 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris de l'EA-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits.	197
Figure 3.73 : Comparaison intergroupe de pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris entre les différentes concentrations des différents lots.	198

APPENDICES

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

g / kg : Gramme par kilogramme.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

HCL : Acide chlorhydrique.

IFN : interféron.

IL : Interleukine.

IPA : Institut de Pasteur d'Algérie.

LDL : Low density lipoprotein en anglais.

MGG : May-GrünwaldGiemsa.

P.c. : Poids corporel.

SbV : Antimoine pentavalent.

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise.

INTRODUCTION

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie [01]. Actuellement l'organisation mondiale de la santé 'OMS' estime qu'environ 80% des habitants du monde ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soin de santé primaire [02].

Une des singularités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, ils synthétisent également une foule importante d'autres métabolites essentiels à la vie des plantes, dits « métabolites secondaires » comme les polyphénols et les alcaloïdes [03]. D'un point de vue applicatif, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales, l'évaluation de leurs valeurs thérapeutiques ayant fait l'objet de nombreuses recherches et amené à l'identification des principaux éléments actifs des plantes. On estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une substance végétale [04].

L'Algérie, grâce à sa situation géographique particulière ; bénéficie d'une gamme très variée de climats et de sols, favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les zones côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes, et représentées par 3000 espèces [05], [06], [07]. Les objectifs actuels fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmaceutique des plantes médicinales algériennes dans le double

but de valoriser, de rationaliser leur usage traditionnel, et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel [08].

Le laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Faculté des sciences nature et vie, Université de Blida 1 est parmi les peu nombreux laboratoires de recherche qui ont pris en charge la valorisation des plantes médicinales algériennes. C'est dans ce contexte que ce travail s'est consacré à l'étude de d'une plante très connu en Algérie; c'est le *Cestrum parqui* L'Hérit. ; Qu'on la retrouve soit cultivée dans les espaces verts et les maisons ; soit comme plante spontanée, ce qui explique la large disponibilité de cet arbrisseau.

Le choix de *C. parqui* a été basé d'une part sur les indications d'usage médicinal traditionnel en Algérie et au monde entier principalement comme plante antiinflammatoire, antimicrobienne, et comme bioinsecticide [09], et d'autre part, du fait que *C.parqui* de l'Algérie n'a pas fait l'objet d'investigations chimiques et biologiques antérieures . Notre objectif vise à justifier et confirmer scientifiquement l'utilisation traditionnelle de *Cestrum parqui* ; et de raccorder nos résultats avec ceux qui ont été prouvé dans d'autres pays.

En effet, pour élargir le domaine de connaissance sur cette plante ; nous avons adopté des actions pluridisciplinaires sur le plan ethnobotanique, chimique et surtout biologique. Notre stratégie expérimentale comporte essentiellement les axes suivants :

- Etude ethnobotanique de la plante,
- Extractions à base des feuilles : Extraction liquide-solide, et extraction à chaud (infusé), et tests de contrôle de la réussite des extractions,
- Screening phytochimique des métabolites secondaires,
- Toxicité aigüe *in vivo* des extraits de feuilles par deux méthodes,
- Activité antiinflammatoire *in vivo* des extraits de feuilles,
- Activité antibactérienne, et antifongique *in vitro* des extraits de feuilles,
- Activité antioxydante *in vitro* des extraits de feuilles, par deux méthodes,
- Activité antiparasitaire *in vitro* des extraits de feuilles par deux méthodes,
- Etude de cytotoxicité *in vitro* des extraits de feuilles, par deux méthodes.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. GENERALITES SUR LA PHYTOTHERAPIE ET LA TOXICITE DES PLANTES MEDICINALES

1.1.1. Définition

Le terme « Phytothérapie », provient du grec « phyton » qui signifie « plante » et «therapein» qui signifie « soigner » , La phytothérapie est définie comme étant le « traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes» [10].

1.1.2. Phytothérapie en Algérie

En Algérie, l'utilisation des plantes médicinales est vieille d'un millier d'années. Les premières écritures sur les plantes médicinales en Algérie remontent au 9^{ème} siècle [11]. Même pendant le colonialisme Français, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales, et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie qu'était publié en 1942 par Fourment et Roques [12], [13].

1.1.3. Production des plantes médicinales

Les plantes médicinales peuvent être soit récoltées à l'état sauvage dans la nature, soit cultivées. Les principaux pays producteurs de plantes médicinales sont l'Europe de l'Est, les pays Méditerranéens, la Chine, l'Inde, l'Afrique, les Etats-Unis, et le Mexique. Concernant le moment de la récolte des plantes sauvages ou cultivées, il faut respecter certaines règles car le métabolisme des plantes varie en fonction des saisons (Tableau 1.1), et même parfois au cours de la journée [14].

Après la récolte, il faut procéder au séchage des plantes, de façon à inhiber les réactions enzymatiques, ce qui permet une bonne conservation [15].

Tableau 1.1 : Moments de récolte des différentes parties des plantes

Parties de plantes	Moment de récolte
Racines et organes souterrains	Automne et hiver, pendant le repos végétatif.
Feuilles	En général juste avant la floraison
Ecorces	A la montée de la sève, avant la floraison
Partie aérienne	En général au moment de la floraison.
Fleurs	Au moment de leur plein épanouissement, ou parfois en bouton.
Graines	A maturité.

1.1.4. Formes d'utilisation des plantes médicinales

Le mode de préparation peut avoir un effet sur la quantité du principe actif présent. En phytothérapie, les plantes médicinales peuvent être utilisées en vrac ou sous forme de préparations galéniques (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Modes d'obtention des tisanes [16]

Préparation	Mode opératoire
Infusion	Recouvrir la drogue sèche d'eau bouillante pendant 5 à 15 minutes.
Décoction*	Recouvrir la drogue d'eau froide et porter le tout à l'ébullition pendant 15 à 30 minutes.
Macération	Recouvrir la drogue d'eau froide et laisser en contact à température ambiante pendant 30 minutes à 4 heures.
Digestion	Recouvrir la drogue d'eau froide et porter le tout à une température supérieure à la température ambiante, mais sans attendre l'ébullition, et ce pendant 1 à 5 heures.

* : La décoction est privilégiée lorsqu'il s'agit d'extraire les principes actifs de parties de la plante plus fibreuses où l'eau a du mal à pénétrer : racines, écorces, tige, graines ou baies.

1.1.5. Principaux éléments actifs des plantes médicinales

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) [17]. Ils sont regroupés en trois classes chimiques sur la base de leurs origines biosynthétiques et caractéristiques structurales [18], [19] et [20].

1.1.5.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont fortement répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce [21].

Les composés phénoliques sont des dérivés non azotés qui dérivent du phénol C_6H_5OH ; possédant au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside) (Tableau 1.3) [21].

Tableau 1.3 : Différentes classes des composés phénoliques [22] :

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C_6	Phénols simples et benzoquinones
C_6-C_1	Acides phénoliques
C_6-C_2	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C_6-C_3	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, Chromons
C_6-C_4	Naphthoquinones
$C_6-C_1-C_6$	Xanthones
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes et anthraquinones
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
$(C_6-C_1)_2$	Tannins hydrolysables
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes et néolignanes
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoïdes
$(C_6-C_3)_n$	Lignines
$(C_6)_n$	Catéchols
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tannins condensés

1.1.5.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [23]. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C_{15} , caractérisée par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés une unité de trois carbones [24] (Figure 1.1). Dans la nature, les flavonoïdes sont généralement glycosylés, ces sucres ainsi que les groupes hydroxyles augmentent leur solubilité dans l'eau, d'autres substitutions telles les méthyles et isopentyles, rendent les flavonoïdes lipophiles [25].

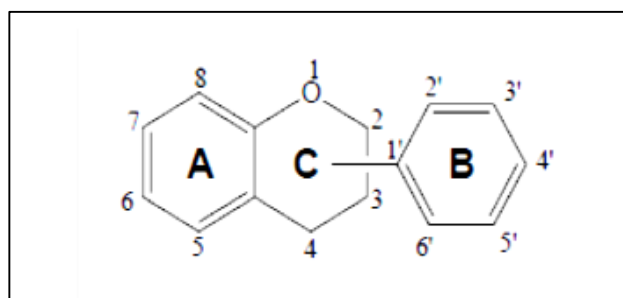


Figure 1.1 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes [26].

Les flavonoïdes comprennent les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes [27].

Les flavonoïdes sont capables d'exercer des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, antiulcérogènes [28], antidiabétiques [29]. Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur [30], et anticancéreux [31], [32].

1.1.5.1.2. Phénols et acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [33].

Phénols simples : Les phénols simples (catéchol, phloroglucinol) (Figure 1.2) sont plutôt rares à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae*, *Rosaceae*) [34].

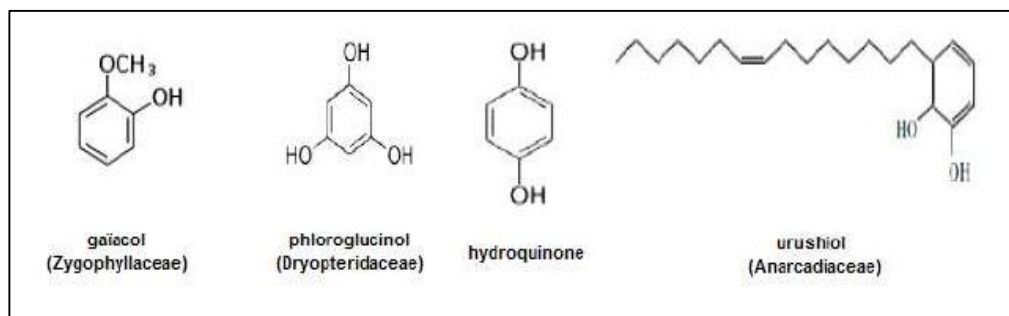


Figure 1.2 : Exemple des phénols simples [23].

Acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque : Les acides-phénols en C₆-C₁ dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside [35].

Acides-phénols dérivés de l'acide cinnamique : Les acides hydroxy cinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique [36], [37]. Ils peuvent également être amidifiés (dérivés de la spermidine, de la tyramine), ou combinés avec des sucres [33].

1.1.5.1.3. Coumarines

Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Figure 1.3) [33]. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique, ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-coagulants [38].

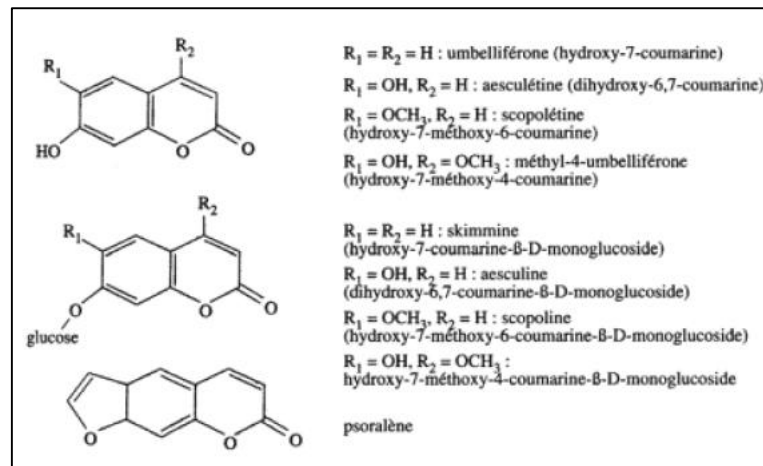


Figure 1.3 : Structure chimique de quelques coumarines [38].

1.1.5.1.4. Lignanes, néolignanes et composés apparentés

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques. Quatre groupes peuvent être considérés : Les lignanes, les néolignanes, les oligomères, et enfin les norlignanes (Figure 1.4) [39]. Principalement les lignanes ont des propriétés antiinflammatoires, et analgésiques [40].

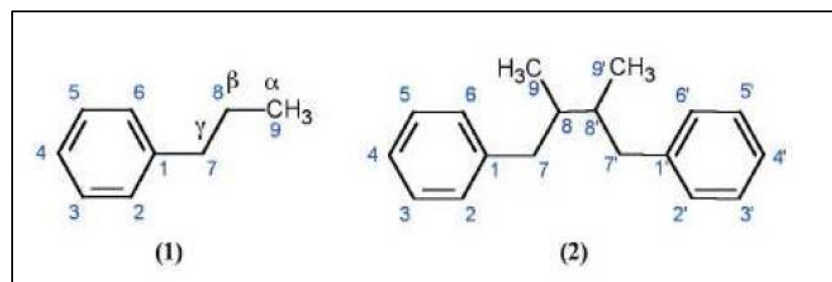


Figure 1.4 : Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) [41].

1.1.5.1.5. Anthocyanosides

Ces pigments sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleu, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides (Figure 1.5) [42]. Ces puissants antioxydants maintiennent une bonne circulation sanguine [43].

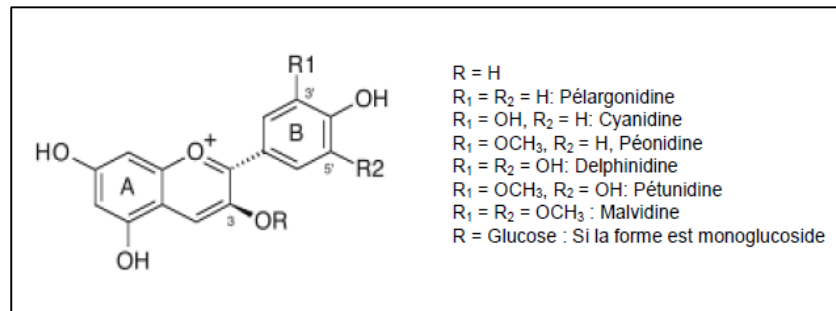


Figure 1.5 : Structure chimique de quelques anthocyanidines [44].

1.1.5.1.6. Tanins

Les tanins ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines, alcaloïdes...), et des liaisons entre les fibres de collagènes [45]. Ils sont localisés dans les vacuoles [42]. Il existe deux catégories de tanins : [45].

Tanins hydrolysables (Tannoïdes): Ce sont des esters d'oses et d'acides phénols (acide gallique ou ellagique) (Figure 1.6) [33].

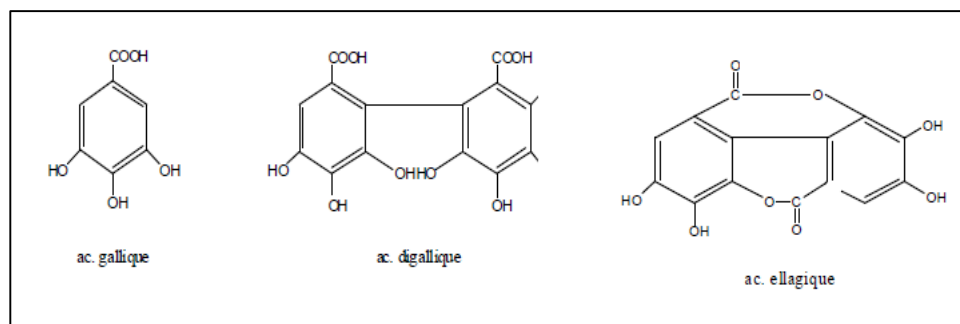


Figure 1.6 : Structure chimique de quelques tannoïdes [33].

Tanins condensés (catéchiques): Ce sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent C₄-C₈ ou C₄-C₆ tel la catéchine ou l'épicatéchine (Figure 1.7).

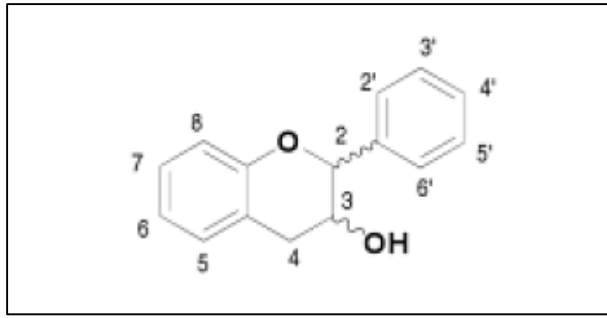


Figure 1.7 : Squelette moléculaire d'un Flavan-3-ol [33].

L'association des tanins avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale (Herpès, SIDA....) [46], [47].

1.1.5.1.7 Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés (Figure 1.8) [39]. Ils ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin. Elles provoquent la contraction des parois intestinales et stimulent le péristaltisme intestinal [48].

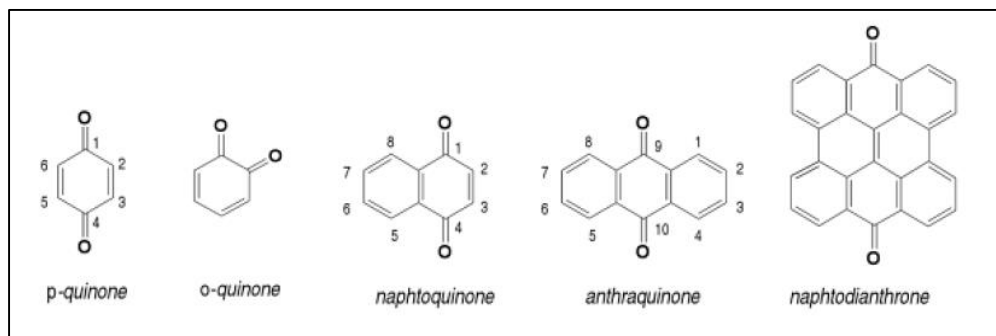


Figure 1.8 : Quelques motifs quinoniques [33].

1.1.5.2. Terpénoïdes et stéroïdes

Les terpénoïdes et les stéroïdes résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique [49]. On distingue les monoterpènes réguliers, et irréguliers, les sesquiterpènes (lactones sesquiterpéniques). Les monoterpènes (Figure 1.9) et les sesquiterpènes (Figure 1.10) sont les constituants principaux des huiles essentielles, qui sont utilisées en phytothérapie [33].

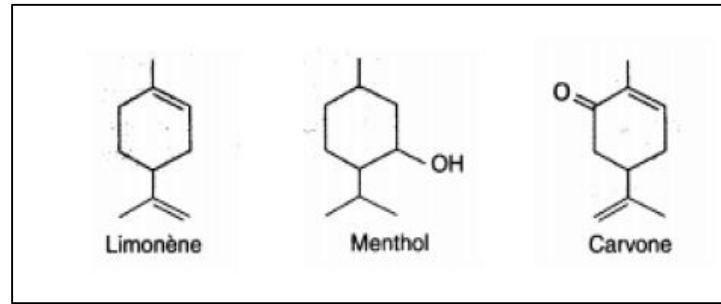


Figure 1.9 : Exemple de monoterpènes [50].

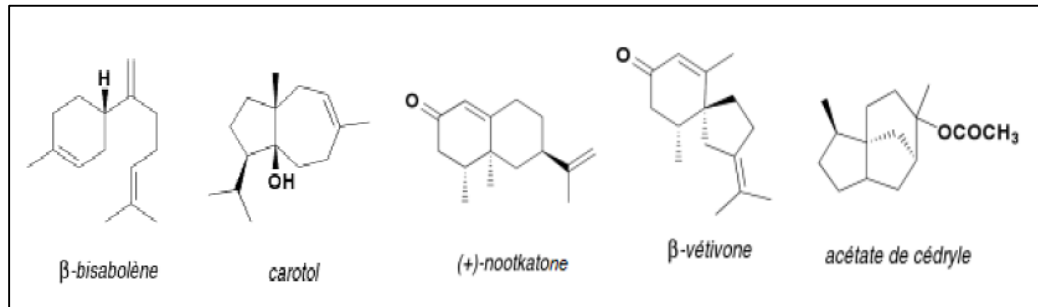


Figure 1.10 : Quelques exemples de sesquiterpènes [33].

On distingue aussi les diterpènes (20 carbones), les triterpènes (30 carbones), et les stéroïdes (saponosides, hétérosides cardiotoniques, phytostérols, triterpènes modifiés), et les cardénolides. Ces composés sont très répandus et ils ont une importance systématique (Figure 1.11).

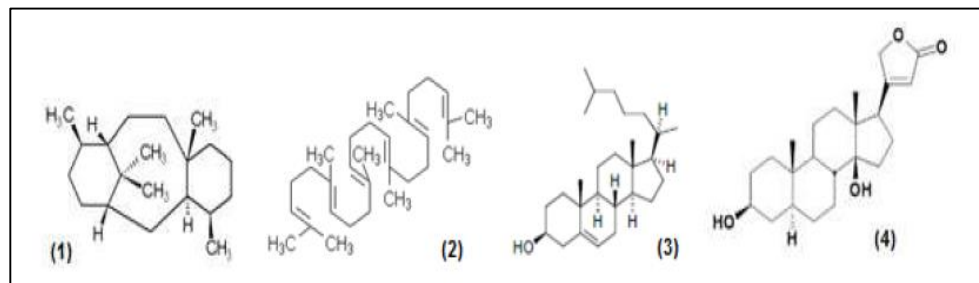


Figure 1.11 : Exemples de structures : (1) : Taxane (Diterpène), (2) : Squalène (Triterpène), (3) : Cholestérol (Stérol), (4) : Cardénolides [33].

1.1.5.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome (Figure 1.12) [51]. Ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires [52], [53].

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques, certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (la morphine), dans le cadre de

protocoles de sédation (anesthésie, atropine), souvent accompagnés comme agent hypnotiques, ou comme agent antipaludéens (quinine), ou agent anticancéreux (taxol).

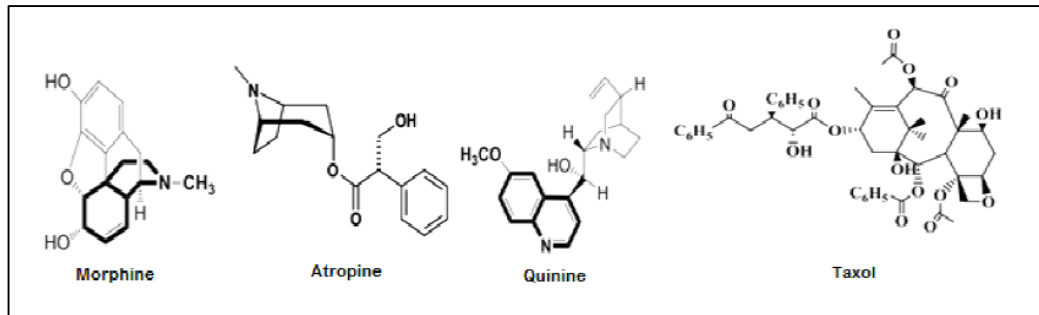


Figure 1.12 : Exemple de structures alcaloïdiques [54].

1.1.6. Toxicité des plantes médicinales

1.1.6.1. Définition

C'est un caractère des substances chimiques qui, au contact ou après pénétration dans un organisme, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique [55]. De nombreuses espèces végétales possèdent une toxicité propre, directe (hépatotoxicité par exemple) ou indirecte (photosensibilisation), qu'il est nécessaire de connaître avant toute commercialisation [56].

C'est avec les pratiques millénaires de chasse et de guerre des populations amérindiennes qu'est née la notion de toxicité des plantes, mot forgé sur la racine grecque 'TOCOV' [57].

1.1.6.2. Principales causes de toxicité par les plantes

La consommation de la plante à l'état brute, induit la consommation en plus des principes actifs, d'autres produits et ne permettant pas ainsi de connaître la dose exacte du principe actif ingéré, entraînant un risque de sous-dosage ou de surdosage [58]. Beaucoup de plantes médicinales sont thérapeutiques à une certaine dose et toxiques à une autre [59].

Les intoxications sont de plus en plus rapportées avec parfois la contamination par les métaux lourds, les pesticides, et les microorganismes [60].

La composition d'une plante peut varier d'un spécimen à un autre, dépendant du terrain, des conditions de croissance, d'humidité, de température, d'ensoleillement. De même, il ne faut pas utiliser des plantes d'origine douteuse, puisque les facteurs de pollution, la cueillette et les méthodes de conservation et de stockage... peuvent altérer leurs propriétés [61].

Les faux savoirs traditionnels importés par des « guérisseurs », peuvent être aussi à l'origine d'effets secondaires inattendus [62].

1.1.6.3. Symptômes de l'intoxication par les plantes

Les accidents relatés dans la littérature scientifique suite à la prise de produits naturels ont parfois des conséquences dramatiques [63],[64]. Les cas de toxicité liées à l'ingestion de produits d'origine végétale sont souvent causés par des réactions allergiques, pouvant avoir de graves conséquences, avec des défaillances multi-organiques, une rhabdomyolyse, une insuffisance rénale aiguë, une hépatite aiguë, et des conséquences graves sur le système digestif, cardiovasculaire et neurologique (angio-oedème) [65],[66].

1.2. GENERALITES SUR LA PLANTE ETUDIEE : *Cestrum parqui*

1.2.1. Généralités sur le genre *Cestrum*

Le *Cestrum* est cultivé dans le monde entier pour ses grappes de fleurs fréquemment parfumées. Ces noms communs (Jessamine et le Jasmin) sont utilisés pour certaines de ses espèces [67], [68].

Ce genre est réuni dans la seconde section de la famille des *Solanaceae* avec les *Mandragores*, les *Belladones*, les *Alkekenges*, les *Morelles*, les *Lycium* et les autres genres de la famille qui ont comme eux le fruit charnu. Quelques *Cestrum* s'élèvent en arbre, mais la plupart sont des arbrisseaux [69].

150 espèces du genre *Cestrum* sont distribuées dans les régions tropicales et subtropicales à travers le monde, dont les principales espèces sont : *C. aurantiacum* Lindl., *C. diurnum* L., *C. elegans* (Brongn.) Schltld., *C. fasciculatum* (Schltld.) Miers, *C. nocturnum* L., et *C. parqui* L 'Hérit. Il existe plusieurs applications des plantes *Cestrum* en médecine traditionnelle. Plusieurs travaux de ce genre ont été documentés et même pour la toxicité des différentes espèces sur les êtres humains et le bétail a été signalée [70], [71], [72], et [73].

1.2.2. Systématique de *Cestrum parqui*

D'après [43] et [68] la classification qu'occupe *Cestrum parqui* (Photo 1.13) est la suivante :

Règne :	Plantae
Branche :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Solanales
Famille :	Solanaceae
Genre :	<i>Cestrum</i>
Espèce :	<i>C. Parqui</i>



Photo 1.13 : A et B : Vues générales de *Cestrum parqui* (Originale).

1.2.3. Description botanique

Le *Cestrum parqui* est un arbrisseau de 2 à 3 m de longueur avec des tiges droites, ligneuses, hautes de six à huit pieds, divisées en rameaux nombreux, effilés, garnis de feuilles alternes [69].

Les feuilles sont alternes, lancéolées, glabres, d'un vert foncé en dessus, plus pâles en dessous, munies à leur base de petites stipules caduques, ces feuilles sont regroupées en terminal de 80 à 100 mm de longueur et de 20 à 30 mm de largeur, à forme pointue à chaque extrémité, produisent une odeur piquante et crue lorsqu'elles sont écrasées, avec un feuillage qui dure toutes l'année.

Les fleurs d'un jaune un peu verdâtre, sont hermaphrodites (20 à 30 mm), apparaissent à la fin du printemps à l'automne (Tableau 1.4), produisent un parfum désagréable pendant la journée et très sucré le soir. Ces fleurs sont regroupées en terminal avec une inflorescence axillaire, contenant chacune six à 25 tubulures jaunes. Les jeunes plantes prenant deux ans ou plus pour fleurir et mettre en graine ; par contre les plantes matures fleurissent et ensemencent chaque année.

Pour les grains ; elles se retrouvent le plus souvent en grappe de couleur brun-violet de 10 mm de diamètre, ces graines peuvent rester dormantes dans le sol pendant de nombreuses années (Photo 1.14) [74],[75],[76], et [77].

Tableau 1.4 : Quelques modifications au cours de cycle de vie de *C.parqui* [78].

	JA	FE	MA	AV	MAI	JN	JT	AO	SE	OC	NO	DE
<i>Floraison</i>	✿	✿	✿	✿	✿	-	-	-	-	-	-	✿
<i>Germination</i>	-	-	🌱	🌱	🌱	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dormance</i>	-	-	-	-	-	🌙	🌙	🌙	-	-	-	-
<i>Traitement chimique</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	👤	👤	👤	👤

JA : Janvier, FE : Février, MA : Mars, AV : Avril, MAI : Mai, JN : Juin, JT : Juillet, AO : Aout, SE : Septembre, OC : Octobre, NO : Novembre, DE : Décembre.

Photo 1.14 : Différentes parties de *Cestrum parqui* (Originale)

A : Feuilles, B : Fleures, C : Grains, D : Rameaux.

1.2.4. Appellations

Cestrum parqui possède plusieurs autres appellations données par différents auteurs à travers le monde : [09], [79], [80], [81].

- Mesk el lil (Algérie),
- Cestrum vert, Jasmin de nuit (En Français),
- Green Cestrum, Willow leaf jessamine (En Anglais),
- Duraznillo Negro, Hediondilla (Espagnol, Argentine, Portugal),
- Palqui (Chili),
- Yerba santa (Catalogne), Hierba santa (Peru),
- Chilenischer Hammerstrauch (Allemand),
- Paipalquen (Inde).

1.2.5. Répartition

Le *Cestrum parqui* est une plante ubiquitaire ; on la retrouve aussi bien en Australie qu'en Afrique du Nord [74], au sud européen et en Amérique latine [82], [81], il est largement distribué dans la région méditerranéenne [81]. Cet arbrisseau est très répandu en Algérie, il orne de nombreux parcs, jardins et espaces verts [09].

La dissémination des graines est facilitée par les oiseaux qui en consomment les fruits et rejettent des graines viables et par une caulogénèse rapide à partir de morceaux de racines qui subsistent dans le sol. D'autre part, les graines dormantes ont une très grande longévité [83]. La propagation de cette plante est assurée par le développement des graines dans les zones humides et ombragées ; ce qui explique principalement pourquoi le *Cestrum parqui* pousse sous les arbres et dans les zones couvertes [84].

1.2.6. Composition chimique

Les métabolites secondaires de la plupart des plantes du genre *Cestrum* ont été étudiés [85]. De nombreux chercheurs ont démontré que les feuilles de *C. parqui* sont riches en métabolites secondaires ; tel que les saponines stéroïdiques de types digitogénine, gitogénine, tigogénine et gitoxigénine qui sont les composés les plus étudiés de la plante [86], [87], [88], [81], [89], [90], [91], et [92], les alcaloïdes de type stéroïdique tels que la solasonine (Figure 1.16), la solasodine, et la parquine et son homologue ; le carboxyparquine (Figure 1.15) [93], [94], [84] ; [89]; [95]; , [92], et [96].

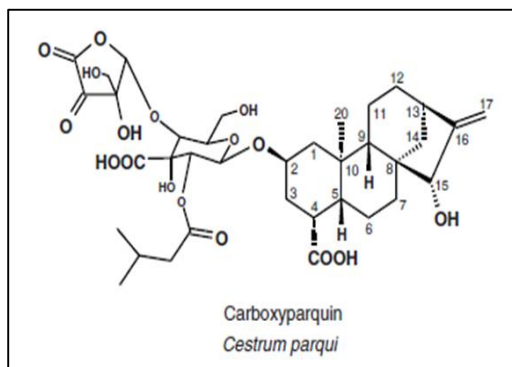


Figure 1.15 : Diterpénoïde[97].

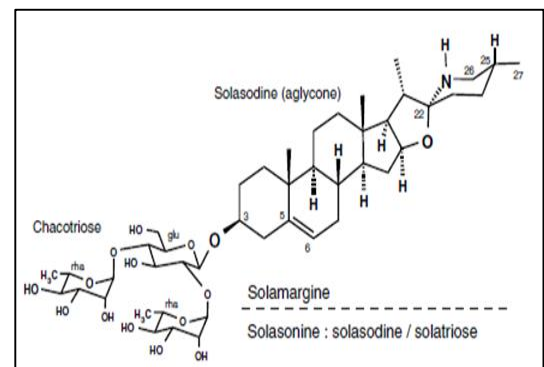


Figure 1.16 : Solasonine [97].

La présence des autres composés a été signalée tels que les flavonoïdes [98], et [92], les tanins [99] et [92], les terpènes et stérols [98], [89], et [92], les phénols et lignanes (néolignanes, sesquinéolignanes) [100] (Figure 1.17), et de la vitamine D [101].

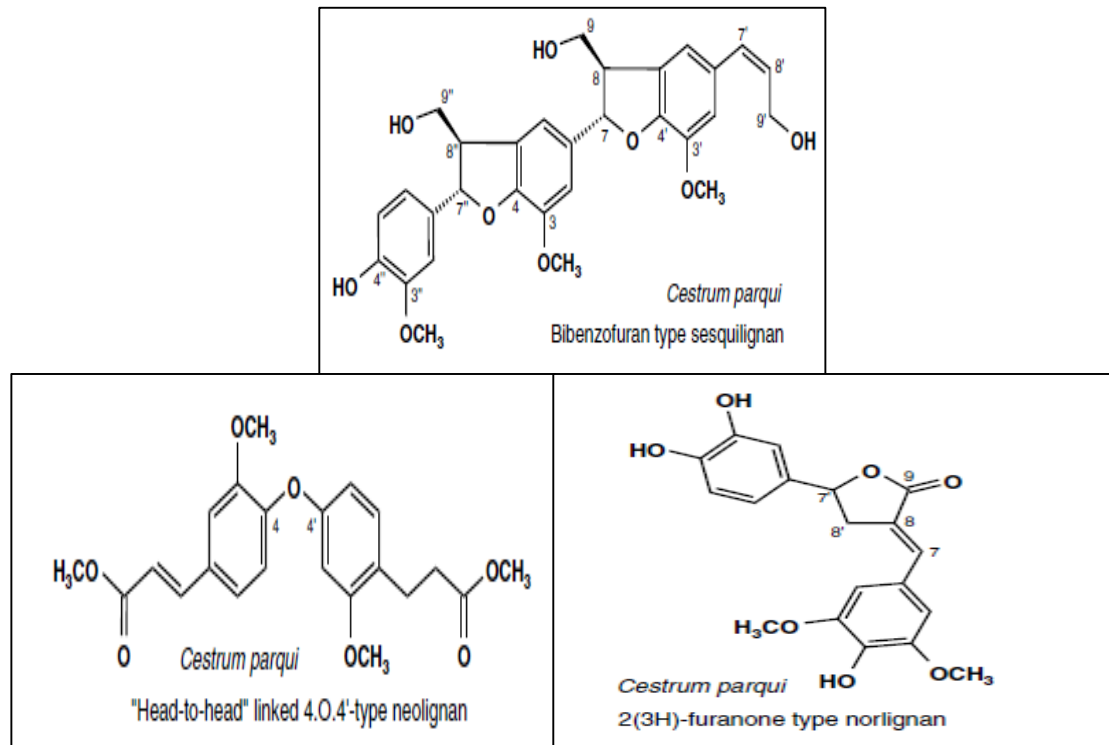


Figure 1.17 : Structure chimique d'un néolignane, un sesquinéolignane, et un norlignane [100].

Des autres études phytochimiques plus poussées et plus détaillées ont été réalisées ; L'équipe de [98] ont pu récemment caractériser chimiquement neuf composés (09) polyhydroxylés terpéniques, il s'agit de : cinq composés C13 norisoprénoides, deux composés sesquiterpéniques, un composé spirostanique, et un pseudosapogénine.

L'acide coumarique, l'acide caféique, le caféate de méthyle, le férulate de méthyle, l'acide benzoïque, le benzoate de méthyle, et les benzaldéhydes (substituants: 3-OH; 3-OCH₃; 4-OH; 4-OH + 3-OCH₃; 4-OH + 3,5-di-O-C-H₃) sont isolés et identifiés à partir des feuilles de *Cestrum parqui* [100].

1.2.7. Toxicité

Pour [102], [103], et [104], les fruits de *C.parqui* sont plus toxiques que les feuilles. En plus [105] suggèrent aussi que l'intoxication est plus commune à l'automne parce que les premières gelées provoquent la chute des feuilles qui sont consommées par le bétail en pâturage. De plus [106] a montré que la partie verte de la plante (fraîche) est aussi active que la forme séchée, et le macérât est plus toxique que la décoction.

Cestrum parqui a été responsable, en Australie, de l'intoxication d'un troupeau de vaches ; l'intensité de l'intoxication est selon la quantité et la durée de la consommation de *Cestrum parqui*. Il a été confirmé que la parquine et le carboxyparquine provoquent une nécrose hépatique et hémorragie intestinale constatée chez le bétail qui en consomme [09], [106], [107],et [108], cette hépatotoxicité peut être due aussi aux saponines (gitogénine et digitogénine) [87], [88], et [96].

La dose létale pour les bovins est de 20 à 30 g/kg du corps corporelle [109]. Un veau est mort 48 heures après ingestion de 30 g de poids humide de la plante par kg de poids corporel. Des doses de 11 et 17 g / kg ont causé seulement une légère intoxication, avec une faiblesse et une anorexie qui dure 2 jours au maximum [110].

Autrement ; des glycosides de vitamine D des feuilles provoquent l'absorption anormale du calcium, la claudication et la perte de poids [101].

1.3. GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES ET LES AGENTS ANTILEISHMANIENS

1.3.1. Définition

C'est une parasitose, qui est provoquée par un Protiste appartenant à la famille des *Trypanosomatidae*, ce parasite hétéroxène (deux hôtes différents) est transmis par des insectes hématophages ; les phlébotomes [111]. La leishmaniose est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde [112].

1.3.2. Parasites

Les critères biochimiques, immunologiques et de biologie moléculaire ont permis d'arriver à un consensus pour classer les *Leishmania* et leurs espèces (Tableau 1.5).

Les parasites présentant une multiplication au niveau de l'intestin moyen et antérieur, sont caractérisés comme le sous-genre *Leishmania*, tandis que les parasites se multipliant dans la partie postérieure puis remontant dans la partie antérieure sont nommés *Viannia*.(Tableau 1.6) [113], [114].

Tableau 1.5 : Systématique de genre *Leishmania*

RÈGNE :	<i>Excavata</i>
EMBRANCHEMENT :	<i>Euglenozoa</i>
CLASSE :	<i>Kinetoplastida</i>
ORDRE :	<i>Trypanosomatida</i>
FAMILLE :	<i>Trypanosomatidae</i>
GENRE :	<i>Leishmania</i>
SOUS GENRE :	<i>Leishmania (L.) et Viannia (V.)</i>

Tableau 1.6 : Taxonomie des leishmanies [112].

Sous-genre	<i>Leishmania</i>	Espèces
Complexe	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> ; <i>L. donovani</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. chagasi</i>
Complexe	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> ; <i>L. killicki</i>
Complexe	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
Complexe	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
Complexe	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. pifanoi</i> ; <i>L. garhami</i> ; <i>L. venezuelensis</i>
Non pathogène pour l'homme		
Ancien Monde		<i>L. gerbilli</i> ; <i>L. arabica</i>
Nouveau Monde		<i>L. aristidesi</i> ; <i>L. enrietti</i> ; <i>L. hertigi</i> ; <i>L. deanei</i>
Sous-genre	<i>Vianna</i>	Espèces
Complexe	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. peruviana</i>
Complexe	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i>
Classement non définitif		
		<i>L. lainsoni</i>

1.3.3. Vecteurs

Les phlébotomes (Figure 1.22) sont des insectes qui ont une activité maximale crépusculaire [115]. Le genre *Phlebotomus* est responsable de la transmission des *Leishmania* de l'Ancien Monde. Ces sont les femelles qui transmettent les parasites lors de leurs repas sanguins [116], [117].

1.3.4. Hôtes

Les Leishmanioses sont majoritairement des zoonoses. Les mammifères sauvages (rongeurs, marsupiaux, paresseux, primates ou canidés) sont des réservoirs primaires. Les mammifères domestiques (canidés) sont des réservoirs secondaires. Quand, par ses activités, l'Homme se met en contact avec le cycle primaire de transmission animal vecteur, il devient un hôte accidentel [117].

1.3.5. Dimorphisme des *Leishmania*

Les Leishmanies présentent deux formes morphologiques caractéristiques au cours de leur cycle de vie : une forme dite promastigote et une forme dite amastigote [118].

1.3.5.1. Formes promastigotes

Cette forme est extracellulaire et fusiforme, prolongée par un flagelle. Lors de son repas sanguin, la femelle peut ingérer des parasites présents dans des macrophages infectés. Les macrophages seront lysés au niveau du tractus digestif du vecteur et les amastigotes ainsi libérés vont pouvoir se différencier en promastigote au bout de 24 heures (Figure 1.18) [119].

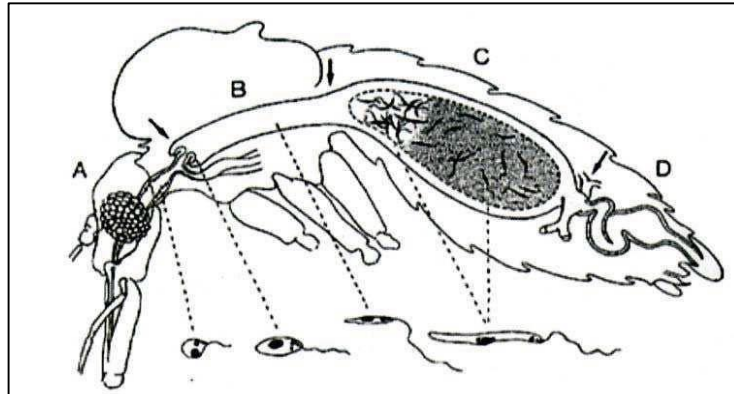


Figure 1.18 : Différenciation au niveau de tube digestif chez le vecteur [120]

Le sang (zone grise en C) (1 : Promastigote nectomonade, 2 : promastigote métacyclique) est entouré par la membrane péritrophique.

1.3.5. 2. Formes amastigotes

Cette forme est sphérique, est la forme intracellulaire que l'on retrouve chez l'hôte mammifère. Lors de l'introduction des promastigotes métacycliques, ceux-ci vont être phagocytés par les macrophages dermiques. Cette internalisation du parasite et, les changements environnementaux qu'il subit (passage d'un milieu aérobie à anaérobie, d'un pH physiologique à un pH acide) vont induire la différenciation au stade amastigote [118], [121].

1.3.6. Formes clinique de la maladie en Algérie

Deux groupes de manifestations symptomatiques peuvent être décrits, l'un présentant la leishmaniose viscérale et l'autre regroupant les formes tégumentaires dans lesquelles le parasite reste localisé au niveau de la peau [118].

La leishmaniose constitue en Algérie un réel problème de santé publique [122]. D'après [123],[112],[124], et [125] ; deux formes de leishmanioses sévissent en Algérie, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée [126].

1.3.6.1. Leishmaniose viscérale (LV)

Elle est appelée kala-azar ou " fièvre noire ", en absence de traitement, la LV est mortelle. Lors de la piqûre par le phlébotome, les parasites migrent via le système sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et le foie. Sa clinique se caractérise globalement par une inflammation du foie et de la rate, ce qui provoque une hépato-splénomégalie, une distension abdominale sévère, une perte de poids importante et une anémie (Figure 1.19) [127].



Figure 1.19: Enfant atteint de leishmaniose viscérale [117].

1.3.6.2. Leishmaniose cutanée (LC)

Autrefois connu comme le " Bouton d'Orient ", la LC peut provoquer des lésions cutanées présentant, sur le site de piqûre, une papule prurigineuse. S'en suit une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme qui conduit à une ulcération (Figure 1.20). Ces ulcères sont généralement circulaires avec des bords bien délimités. Ils se recouvrent d'une mince croûte et évoluent vers une forme dite " humide " ou " sèche ". Ces lésions laissent après cicatrisation, de profondes cicatrices non pigmentées [119], [128], [129], [130].



Lésion pavillon oreille



Lésion ulcérate visage

Figure 1.20: Lésions ulcératees de la leishmaniose cutanée [117].

1.3.7. Traitement des Leishmanioses

1.3.7.1. Traitement de première intention

Les traitements de premières intentions font appel à des sels d'antimoine : le N-méthyl glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostan®) (Figure 1.25). Les principaux problèmes liés à ces traitements sont le prix (de 100 à 150 US\$) et leur accès [131]. Ces produits ont une action inhibitrice sur la formation de l'ATP et nécessitent une conversion intracellulaire en SbIII (antimoine trivalent) pour être actif. Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite [132].

1.3.7.2. Traitement de seconde intention

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'Amphotéricine B, et l'amphotéricine B liposomale, ou de la Pentamidine. L'Amphotéricine B est capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux (Figure 1.25).

La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasitaire et se fixe sur l'ARN de transfert [133], et [134]. Cependant, en Inde, la pentamidine n'est plus efficace [135]. Le traitement par ces médicaments est moins toxique, mais coûte trop cher [136].

1.3.7.3. Nouveaux traitements

De nouveaux produits ont montré récemment des résultats très intéressants, notamment la Miltéfosine dont le mode d'action n'est pas encore totalement déterminé mais qui laisse supposer une action sur la biosynthèse de la

phosphatidylcholine [137]. L'avantage de ce médicament est qu'il permet un traitement oral (2,5 mg/kg/jour) avec des effets secondaires négligeables et présente des taux de réussite allant de 71% (Bolivie) jusqu'à au-delà de 90% (Colombie 94%, Inde 98%) [138], [139], et [140] (Figure 1.21). La Sitamaquine qui est un analogue de la primaquine, est administrée par voie orale. [138], [141], et [142]. L'Imiquimod est une quinoline qui induit la production d'oxyde nitrique [143]. Ce médicament a été testé topiquement en combinaison avec des sels d'antimoine et a démontré un gain de temps de cicatrisation pour les patients atteint de LC [138], [144], et [145]. La Paromomycine, un antibiotique aminoglycosidique, a démontré son efficacité en combinaison avec des antimoine par voie parentérale [146].

De plus, des formulations sous forme de crème mélangée avec la Gentamicine ont démontré un taux d'efficacité de 64% en Colombie [137].

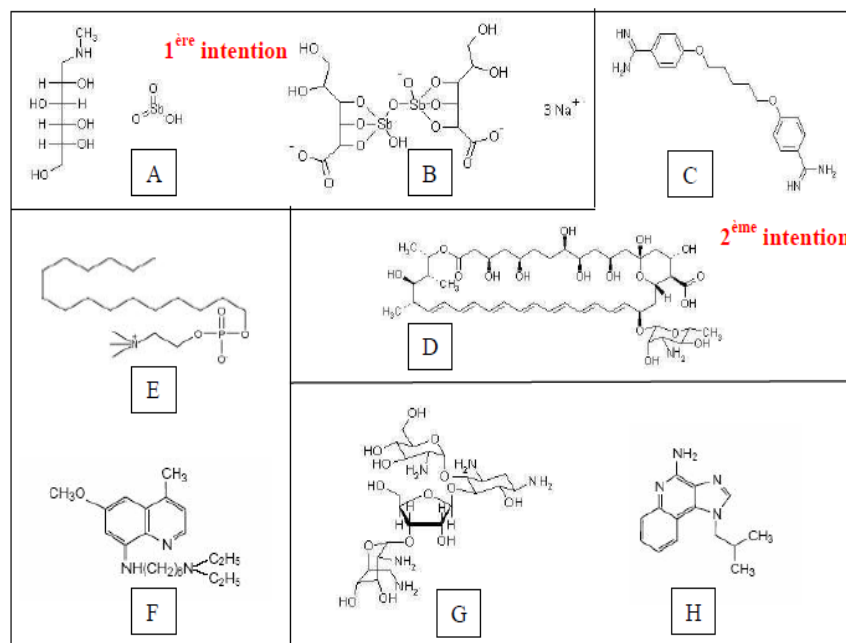


Figure 1.21: Structures des différents médicaments utilisés actuellement [117].

A : Glucantime® ; B : Stibogluconate de Sodium ; C : Pentamidine iséthionate ; D : Amphotéricine B ; E : Miltéfosine ; F : Sitamaquine ; G : Paromomycine ; H : Imiquimod.

1.3.8. Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques contre les leishmanioses

La médecine traditionnelle joue un rôle significatif dans le processus de découverte de nouvelles thérapeutiques. Les plantes offrent une source de molécules actives contre plusieurs protozoaires responsables de différentes maladies, comme par exemple le cas de la quinine, alcaloïde antipaludéen issue du genre *Cinchona*. Ensuite, nous pouvons remarquer le cas d'une lactone sesquiterpénique antipaludéenne, l'artémisinine, qui est obtenue du genre *Artemisia* ainsi que l'émetine, un alcaloïde actif contre les amibiases issu du genre *Cephaelis* [147], [148], [149].

De plus, les produits naturels nous offrent la possibilité de découvrir des structures nouvelles et originales qui sont à la fois actives et sélectives, pouvant jouer le rôle de tête de série dans un processus d'optimisation. Dans cette optique, l'hémisynthèse à partir de molécules actives issues de plantes peut permettre de baisser la toxicité et d'augmenter la biodisponibilité.

La recherche de molécules bioactives ou de métabolites secondaires commence par le screening d'extraits bruts de plantes, suivi d'un fractionnement bio-guidé, aboutissant à l'isolation et l'identification des molécules responsables de l'activité. Les évaluations antileishmaniennes préliminaires commencent par le screening sur les formes promastigotes et sur les formes amastigotes axéniques. Des tests plus poussés sur des formes intramacrophagiques sont faits sur les molécules actives isolées [147].

1.4. GENERALITES SUR LA LEUCEMIE AIGUË ET LES LIGNEE CELLULAIRE HUMAINE

1.4.1.4. Leucémie aiguë :

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des maladies hématopoïétiques clonales caractérisées par la prolifération d'un précurseur myéloïde qui s'accumule dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes et par une altération de l'hématopoïèse normale [150].

1.4.1.4.1 Facteurs étiologiques

Dans la majorité des cas, les leucémies aiguës n'ont pas de cause connue et surviennent chez des sujets jusque-là en bonne santé. Il est important de souligner que le terme de LAM regroupe un ensemble hétérogène de maladies qui diffèrent par la cause, l'âge de survenue, la clinique et le pronostic. Certains facteurs de risque sont néanmoins identifiés comme l'exposition à des rayonnements ionisants, et à des produits chimiques [151].

1.4.1.4.2. Traitement

Les options de traitements varient en fonction du type de leucémie et d'autres facteurs, tels que l'âge du patient et son état de santé général. Les principales options sont la chimiothérapie, la greffe de cellules souches ou le traitement ciblé qui repose sur l'utilisation de médicaments destinés à se lier uniquement à des protéines ou des anticorps précis des cellules cancéreuses [152].

1.4.2. Agents anti tumoraux

1.4.2.1. Généralités

Pour qu'un produit soit un bon archétype d'agent antitumoral, il faut qu'il induise une destruction des cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Les recherches sur l'étiologie du cancer n'ont pas encore permis de concevoir des modèles efficaces pour la sélection de biomolécules susceptibles d'atteindre spécifiquement les cellules tumorales [153].

1.4.2.2. Modes d'action des agents anticancéreux

La plus part des produits à activité antitumorale agissent au niveau de l'ADN [154]. Généralement, les agents antitumoraux sont classés en quatre grands groupes : les agents alkylants, les agents intercalants, les antimétabolites, et les poisons du fuseau (Tableau 1.7).

Récemment, l'identification, la caractérisation et le développement de molécules chimiothérapeutiques naturelles possédant des propriétés anticancéreuses est devenu un domaine majeur de la recherche sur le cancer [155],[156].

Tableau 1.7: Quatre grands types des agents antimoraux [157].

Type	Mode D'action	Exemples
Agents alkylants	positionnement entre deux paires de base adjacentes dans la double hélice d'ADN.	Adriamycine, Ellipticine, les quinones aromatiques, et dérivés du platine.
Antimétabolites	Se comportent comme des métabolites normales et s'insèrent dans un processus biochimique particulier, fondamental pour la vie cellulaire.	Nucléosides, 5-fluorouracile et méthothrexate.
Poisons du fuseau	S'opposent à la constitution (ou plus rarement à la disparition) du fuseau au cours des différentes phases de la division cellulaire.	Colchicine isolée du colchique ou le taxol isolé de <i>Taxus baccata</i> et <i>Taxus brevifolia</i>

1.4.3. Lignées cellulaires humaines

1.4.3.1. Généralités et définition

Ces populations de cellules sont capables d'effectuer un nombre limité ou illimité de divisions en culture et sont ainsi maintenues par repiquages successifs [158]. Cependant, des modifications génétiques peuvent conférer aux cellules la possibilité de proliférer indéfiniment. Il s'agit alors de lignées cellulaires dites « continues », qui constituent les modèles les plus maniables pour le biologiste. Ces lignées sont le plus souvent obtenues à partir de cellules d'un tissu tumoral, l'une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses étant l'immortalité [159].

1.4.3.2. Isolement des cellules souches

Les méthodes d'enrichissement ou d'isolement sont variées. Deux méthodes sont récurrentes. La première consiste à enrichir une population cellulaire en identifiant les cellules de la « Side population 'SP' ». La seconde méthode consiste à utiliser des marqueurs membranaires caractéristiques des cellules souches [160].

1.4.3.3. Culture et transformation cellulaire

La transformation d'une cellule normale en une cellule maligne implique une série de modifications, dont des modifications chromosomiques (mutationnelles ou épigénétiques).

Dans la cellule maligne, les gènes qui maintiennent l'équilibre entre prolifération et différenciation demeurent accessibles mais non fonctionnels. L'existence de lignées cellulaires immortelles de phénotype normal montre que les fonctions de prolifération et de différenciation sont génétiquement séparées.

Des études *in vitro* montrent cependant que la provocation d'un arrêt de prolifération des cellules malignes permet, en rétablissant l'équilibre normal prolifération/ différenciation, de déclencher la différenciation cellulaire. L'intérêt récent porté aux oncogènes cherche à identifier les gènes responsables de l'immortalisation, et de la maturation anormale des cellules malignes [161]. La

constitution de collections, ou banques, de cellules conservées dans l'azote liquide assure une réserve destinée à protéger les cellules contre les modifications de leur patrimoine génétique, le vieillissement *in vitro*, les risques de contamination (microbienne, fongique ou virale) ou encore des problèmes techniques de culture, et permet la récupération de l'ensemble des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles.

1.4.3.4. Environnement des cellules en culture

Il est possible de moduler l'environnement des lignées pour se rapprocher de la situation physiologique. Cette modulation peut se faire à deux niveaux, type de support sur lequel elles vont adhérer et composition du milieu de culture, et va intervenir dans les étapes essentielles de la vie cellulaire: la survie, la prolifération, la différenciation et la migration.

1.4.3.4.1. Milieu de culture

Les milieux de culture sont plus ou moins spécifiques de chaque lignée cellulaire et doivent imiter autant que possible les conditions auxquelles la cellule a été exposée *in vivo*. Ils sont préparés en suivant les recommandations des différents fournisseurs de lignées cellulaires, tel que l'American Type Culture Collection (ATCC) ou l'European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Ces milieux sont classiquement composés d'une solution saline tamponnée complexe, qui contient les nutriments et les ions nécessaires au métabolisme cellulaire, et de sérum de veau fœtale (SVF) qui permet la croissance cellulaire. On ajoute également des antibiotiques et des antifongiques [162].

1.4.3.4.2. Adhérence

Il existe deux principaux types de cellules : adhérentes ou non adhérentes. Tandis que les cellules adhérentes (cellules étalées) vont devoir adhérer au support pour se développer, les cellules non adhérentes vont se développer en suspension dans le milieu (cellules sphériques, cellules circulantes ou certaines lignées transformées).

1.4.4. Lignée cellulaires monocytaires leucocémiques ; les *Thp1*

1.4.4.1. Généralités sur les monocytes

Les monocytes appartiennent au système des phagocytes mononuclées et sont capables de se différencier en macrophages, cellules dendritiques et ostéoclastes [163], [164], et [165]. Ils sont par leur taille, les plus grandes des cellules circulantes sanguines (Figure 1.31). Les monocytes représentent en situation physiologique 2 à 7% des leucocytes humains.

Ces cellules ont un rôle majeur au cours des réponses inflammatoire [166], [164], [167], et immunitaire innée [168], elles participent également à l'homéostasie cellulaire en détruisant les cellules apoptotiques et les composés toxiques [169], et [170].

1.4.4.2. Généralités sur les cellules monocytaires de type *Thp1*

Cette lignée a été obtenue à partir du sang périphérique d'un patient porteur d'une leucémie monocyttaire aiguë. Ces cellules de petite taille avec une forme ronde en suspension poussant parfois sous la forme d'agrégats (Figure 1.22) [171]. Les *Thp1* désignent une lignée cellulaire spontanément immortalisée, représentent des outils précieux pour étudier la structure et la fonction des monocytes dans la santé et la maladie [172]. Elles sont très souvent utilisées pour l'étude du rôle des macrophages dans les réactions immunitaires, inflammatoires.

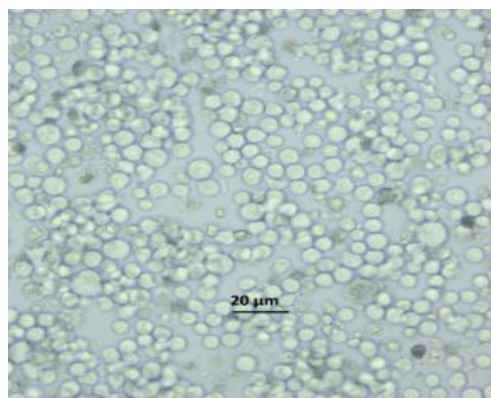


Figure 1.22 : Aspect des agrégats cellulaires d'une culture des *Thp1* [173].

1.4.4.3. Différenciation des *Thp1*

La différenciation des monocytes *Thp1* en macrophages (Figure 1.23) s'accompagne de nombreux changements sur le plan morphologique, biochimique et fonctionnel qui sont utilisés comme marqueurs de différenciation. En effet, après induction par les esters de phorbol (Phorbol 12-myristate 13acetate ou PMA) les cellules deviennent adhérentes et présentent en quelques jours des propriétés macrophagiques [174], [175], [176]. Les monocytes *Thp 1* restent en suspension dans les conditions de culture *in vitro*. Ils présentent une forme ovoïde et apparaissent très réfringents lors de leur observation en microscopie à contraste de phase. Un des premiers critères de différenciation en macrophage est l'adhésion des cellules au support plastique de la boîte de culture [177].

A partir de 48h d'incubation, on peut observer en microscopie optique à contraste de phase l'apparition dans le cytoplasme de vacuoles caractéristiques d'une activité phagocytaire et d'extensions cytoplasmiques formant de véritables pseudopodes caractéristiques des macrophages.

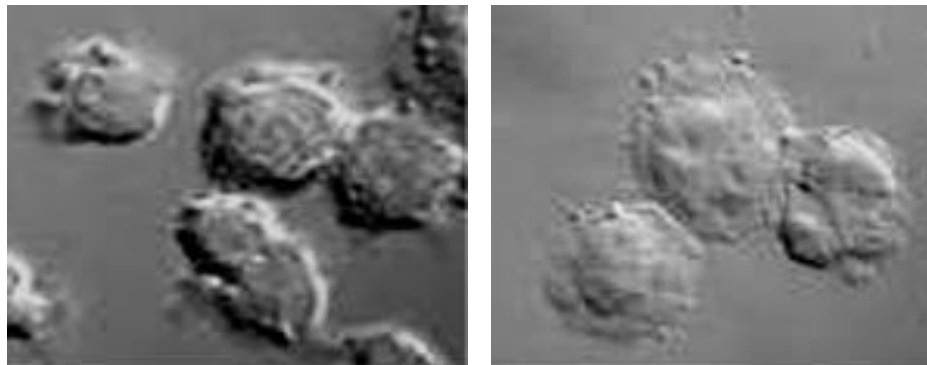


Figure 1.23 : Observation en microscopie à contraste de phase de la différenciation des monocytes *THP1* en macrophages [178].

Les cellules THP-1 sont cultivées en absence (A, gauche) ou en présence (droit) de PMA (100nM) pendant 48heures.

La différenciation des monocytes en macrophages s'accompagne de changements dans le niveau d'expression de protéines de surface cellulaire (dont des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire) [179].

1.5. GENERALITES SUR LES INFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES, ET LES AGENTS ANTIMICROBIENS

1.5.1. Infections bactériennes

Les bactéries sont des microorganismes très adaptables, à l'origine de maladies graves épidémiques comme le choléra, la peste ou bénignes comme une simple colonisation de la peau, elles sont capables de survivre et se multiplier rapidement dans leurs environnement et certaines forment des spores résistantes qui survivent pendant des décennies.

En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques [180].

1.5.2. Antibiotiques

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement des bactéries [181], dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme [182], ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier [183], mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales [184].

1.5.2.1. Modes d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolés, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes), comme les bêtalactamines, les aminosides, les polypeptides [181], et [182]. Le spectre d'action varie d'un

antibiotique à l'autre [182]. Ainsi, les antibiotiques ont été classés selon leur mode d'action en [185], et [186]:

- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses du peptidoglycane.
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.

1.5.3. Résistance bactérienne

L'utilisation intense et abusive des antibiotiques a rapidement conduit à l'apparition des deux phénomènes importants: les effets secondaires dus aux médicaments et l'acquisition d'une certaine résistance aux antibiotiques par certaines populations microbiennes [187].

En raison des résistances multiples possibles et des effets secondaires des antibiotiques synthétiques, une attention croissante a été dirigée vers les antibiotiques naturels. Le potentiel des plantes aromatiques et médicinales pourrait donc jouer un rôle important dans la lutte contre les infections microbiennes [188].

1.5.4. Multirésistance et infection nosocomiales (IN)

Du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, les bactéries sont devenues multirésistantes aux antibiotiques (BMR), et elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique [188]. Parmi les principales espèces bactériennes multirésistantes (BMR) responsables d'infection nosocomiale (IN), nous citons :

1.5.4.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des IN. Ils sont principalement impliqués dans les IN cutanées, du site opératoire, des voies urinaires et respiratoires, et les bactériémies. Les SARM, résistants à toutes les β -lactamines, sont aussi souvent très résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones [188], et [189].

1.5.4.2. Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (EBLSE)

Les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. Les EBLSE sont principalement impliquées dans les infections urinaires, symptomatiques ou non, les bactériémies et les infections de plaies ou de site opératoire [188], et [189].

1.5.4.3. *Acinetobacter baumannii* multirésistant (résistant à la ticarcilline) (ABR)

Les *Acinetobacter baumannii* représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN. Dans certains secteurs hospitaliers (Unité de soins intensifs) et sont souvent à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles est impliquée la forte contamination de l'environnement des patients porteurs. Certaines souches épidémiques résistantes à l'Imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques [188], et [189].

1.5.5. Infections fongiques

Le développement d'une pathologie fongique chez l'humain dépend souvent des facteurs prédisposant comme l'augmentation accrue des patients immunodéprimés (pathologies concomitantes (SIDA)), d'événements associés (intervention chirurgicale invasive, traitement antibiotique...) ou de facteurs environnementaux (conditions d'élevage favorisent les contacts rapprochés) [190]. Dans la pathologie fongique ou mycosique, trois types de mycoses humaines sont fréquentes et universelles : les dermatophytes, le Pityriasis versicolore et les candidoses cutanéomuqueuses. D'autres sont plus rares mais profondes et sévères [191] (Tableau 1.8).

Tableau 1.8 : Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme [219].

Type d'infection	Agent responsable	Site d'infection
Cryptococcoses	<i>Cryptococcus neoformans</i> .	Poumons, cerveau (méninges et liquide céphalorachidien).
Candidoses	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> .	Peau et muqueuses, tractus gastro-intestinal et sang.
Dermatophytoses	<i>Trychophyton</i> , <i>Microsporum</i> , et <i>Epidermophyton</i> .	Cuir chevelu ; peau et angles.
Blastomycoses	<i>Blastomyces dermatitidis</i> .	Visage, mains et pied.
Sporotrichoses	<i>Sporothrix schenckii</i> .	Peau.

1.5.6. Antifongiques

Il existe 4 classes principales d'agents antifongiques (Tableau 1.9) qui agissent soit au niveau de la paroi fongique, soit sur la membrane fongique ou soit au niveau de l'acide nucléique (Polyènes, azolés, échinocandines, griséofulvine) [193], [194].

Tableau 1.9 : Classe des antifongiques [194].

Antifongiques	Cible	Toxicité
Polyènes Amphotéricine B	Membrane fongique.	Fongicide.
Échinocandines Caspofungine	Paroi fongique.	Fongicide sur <i>Candida</i> . Fongistatique sur <i>Aspergillus</i> .
Azolés Voriconazole Itraconazole	Inhibition de la 14 α déméthylase (Ergostérol membranaire).	Fongistatique sur <i>Candida</i> Fongicide sur <i>C. krusei</i> , et <i>A. fumigatus</i>).
5-fluorocytosine.	Acide nucléique.	Fongistatique.

1.5.9. Résistance aux agents antifongiques

Le développement de certains phénomènes de résistance fongique a été observé ces dernières années en parallèle à l'utilisation croissante des antifongiques en prophylaxie et pour des traitements longs dans le cas de patients immunodéprimés [195]. La résistance peut se définir soit comme un phénomène *in vitro* lié à une augmentation de la CMI soit comme un phénomène clinique défini

comme la persistance ou la progression d'une infection en dépit d'une thérapie antimicrobienne appropriée [196], et [197].

1.5.11. Plantes source des molécules antimicrobiennes

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotiques.[198], [199].

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries à Gram positif, mais demeurent peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les levures [200]. L'action des plantes sur les souches fongiques résistantes prend jour après jour sa place dans la découverte des nouveaux agents antifongique ; pour cela les sécrétions végétales telles que les huiles essentielles sont intéressantes du point de vue leur pouvoir fongitoxique [201].

1.6. GENERALITES SUR LE STRESS OXYDATIF ET LES ANTIOXYDANTS

1.6.1. Stress oxydatif

1.6.1.1. Définition

Au cours de la respiration cellulaire et plus précisément dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, des réactions d'oxydo-réduction ont lieu ; des électrons sont transportés jusqu'à un accepteur final, l'oxygène, qui est réduit en molécule d'eau. Une partie de cet oxygène (1 à 3 %) n'est cependant pas réduite mais convertie en Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou radicaux libres (R^{*}) [162]. Dans des conditions normales, ces radicaux libres sont physiologiquement en équilibre avec des composés antioxydants [163].

Dans certaines conditions, au cours d'une inflammation ou en réponse à certains facteurs environnementaux comme les irradiations (UV ou rayons X), la production de ces radicaux libres augmente générant un déséquilibre en faveur des entités oxydantes appelé « stress oxydatif » [164].

1.6.1.2. Radicaux libres (RLs)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques instables, neutres ou chargées, qui possèdent un électron non apparié sur leur dernière couche électronique [165]. Pour retrouver un état plus stable, ils réagissent avec d'autres molécules, dans le but de récupérer un électron. Ils peuvent être classés en deux catégories : les radicaux libres primaires et les radicaux libres secondaires. Les premiers sont formés directement à partir de l'oxygène ou de l'azote et sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Espèces Réactives de l'azote (ERN) (Tableau 1.10). Les radicaux libres secondaires sont générés par action d'un radical primaire sur des composés cellulaires. Le radical hydroxyle OH^{*}, le plus toxique des radicaux libres [166], et [167].

Tableau 1.10 : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques [162].

Espèce radicalaire		Espèce non radicalaire	
Espèce réactif d'oxygène	Espèce réactif d'azote	Espèce non réactif d'oxygène	Espèce non réactif d'azote
O ₂ ^{•-} : Anion superoxide HO ₂ : Radical hydroperoxy OH [•] : Hydroxyle RO [•] : Radical alkoxyl ROO [•] : Radical alkoperoxy ROOH [•] : Radical hydroxyperoxy	NO [•] : Monoxyde d'azote NO ₂ : Dioxyde d'azote N ₃ [•] : Nitrate	ONOO [•] : Anion peroxydinitrite OONOO [•] : Anion peroxydinitrate H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène O ₂ : Oxygène singulet O ₃ : Ozone HOCl: Acide hypochloreux ROOH: Peroxides organiques	ONOO ⁻ : Anion peroxydinitrite OONOO ⁻ : Anion peroxydinitrate ONOOH: Acide peroxydinitreux ROONO: Alkyl peroxydinitrate HNO ₂ : Acide nitreux NO ⁺ : Cation NO ⁻ : Anion nitrosyle

1.6.1.3. Origine des radicaux libres

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en deux facteurs endogènes et exogènes.

1.6.1.3.1. Facteurs endogènes

Les complexes, nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome C réductase, sont d'importants complexes membranaires qui peuvent générer d'O₂^{•-} et d'H₂O₂ au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale [168], et [169].

-Les cellules phagocytaires et non phagocytaires possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication d'O₂^{•-} [170], [171], et [172].

-La xanthine oxydase (XO) utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l'O₂^{•-} [173].

-Le peroxydosome de nombreuses enzymes générant d'H₂O₂ [174], [175].

-Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, transforment l'H₂O₂ en OH[•] [176].

-Les lipooxygénases catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol pour donner des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques [177].

1.6.1.3.2. Facteurs exogènes

-Le tabagisme, poisons environnementaux, et l'alcool favorisent la génération des radicaux libres, La phase gazeuse de la fumée contient 10^{15} radicaux par bouffée ainsi que de nombreux NO [178].

-L'exposition à des radiations ionisants (UV-A) conduit à la production de ; $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot-}$ et $ONOO^{\cdot-}$ [179].

-Les métaux ont la capacité de produire les ROS, comme la production du radical hydroxyle et l' $O_2^{\cdot-}$. Le Ni et le Fe peut réagir avec H_2O_2 par différents mécanismes pour former des complexes du métal-oxygène [180].

-Différentes expositions de pesticide, y compris des organophosphates, induisent le stress oxydant dû à la génération des RLs [181].

1.6.1.4. Conséquences du stress oxydant

Dans des conditions normales, les radicaux libres sont des composés très utiles pour l'organisme mais à fortes doses, paradoxalement, ils causent des dommages cellulaires importants :

-Dommage de l'ADN : L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose [182], et [183].

-Dommage des protéines : Les protéines modifiées perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques [184], et [185].

-Dommage des lipides (peroxydation lipidique) : Les acides gras polyinsaturés présents au sein des membranes cellulaires sont les plus sensibles. En raison de leurs nombreuses doubles liaisons, ils peuvent être dégradés par un mécanisme en chaîne appelé peroxydation lipidique [186].

-Dommages des glucides : L'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhyde, H_2O_2 et OH^\cdot en présence des métaux, et entraîner également la coupure de protéine et leurs glycation par attachement du céto-aldéhyde. Il forme aussi un dérivé de produit de glycation avancé [187].

1.6.2. Antioxydants

1.6.2.1. Définition

Toute substance présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, qui est capable de retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO [188]. Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

1.6.2.2. Classification des antioxydants

1.6.2.2.1. Selon le mode d'action

D'après [189], les modes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO. Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents.

1.6.2.2.2. Selon la localisation

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle, les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles [190].

1.6.2.2.3. Selon l'origine

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories :

A -Enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme (antioxydants endogènes) ; Ce type est présent en permanence dans l'organisme mais sa quantité diminue avec l'âge. On cite principalement [191]:

-Superoxydes dismutases (SOD), Catalases (CAT), Peroxydases (POX), Peroxyredoxines (PRX), Glutathion peroxydase (GPX).

B- Nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation (antioxydants exogènes) [192], [193], [194], [195], et [196] :

- Vitamine E, Vitamine C, Caroténoïdes, Flavonoïdes, Tanins, Coumarines, Sélénium.

1.7. GENERALITES SUR L'INFLAMMATION ET LES AGENTS ANTIINFLAMMATOIRES

1.7.1. Définition

L'inflammation est une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme à une stimulation cellulaire excessive ou anormale due à une agression tissulaire [132], et [133]. La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus [134].

1.7.2. Manifestations cliniques

La réaction inflammatoire est responsable de phénomènes locaux caractérisés par quatre signes cardinaux ; qui sont la rougeur (vasodilatation et l'hyperémie), la chaleur (augmentation du débit sanguin), la douleur (stimulation de neurones nocicepteurs), et l'œdème (l'exsudation de liquide et de protéines plasmatiques dans les tissus). Les effets cliniques généraux sont une altération de l'état général, associant une asthénie, une anorexie, un amaigrissement, des troubles du sommeil et une cachexie avec fonte musculaire [135].

1.7.3. Types d'inflammation

1.7.3.1. Inflammation aigue

L'inflammation aiguë est caractérisée par sa courte durée et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. Elle est dite non-spécifique lorsque l'évènement déclencheur de la réaction inflammatoire est rencontré pour la première fois par l'organisme. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante [136].

1.7.3.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Les inflammations chroniques n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années [137].

1.7.4. Facteurs étiologiques

1.7.4.1. Agents phlogogènes exogènes

-Agents physiques: Radiation, électricité, froid, chaleur, piqûre, coupure...

-Agents chimiques: Acide, base, substances minérales diverses.

-Agents biologiques: Microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon), et certains produits comme le venin, le pollen et les toxines [133], [138].

1.7.4.2. Agents phlogogènes endogènes

Ce sont les antigènes, les auto-antigènes, les complexes immuns circulants, également les cristaux formés dans les liquides biologiques (Urates, Cholestérol...) [138].

1.7.5. Phases de l'inflammation

Classiquement, les mécanismes de l'inflammation peuvent être groupés selon la séquence et les manifestations cellulaires et tissulaires suivantes [139], [140], [141], [142], et [143].

1.7.5.1. Phase vasculaire et plasmatique

Elle est caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème, un dégagement de chaleur locale, une hyperesthésie. Il se produit une altération des micro-capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives

(histamine, prostaglandine, dérivés du complément...) entraînant l'exsudation des cellules et du plasma vers les tissus.

1.7.5.2. Phase cellulaire

La migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes, et la libération de cytokines sont à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération de médiateurs. Dès lors une succession d'évènements au sein de la lésion inflammatoire entraîne : la phagocytose d'agents extérieurs, la captation et la présentation d'antigènes, et la production de radicaux libres. Les cytokines en outre agissent au niveau systémique pour augmenter la défense de l'hôte sous forme de fièvre

1.7.5.3. Phase de régénération

Cette phase passe par une détersion de l'agent causal et des débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire de façon interne (phagocytose, pinocytose) ; et externe par les orifices naturels ou par formation d'abcès.

1.7.6. Cellules et médiateurs de l'inflammation

Les lésions tissulaires et l'inflammation engendrent la production d'un grand nombre de médiateurs qui, directement ou indirectement, contribuent à la sensibilisation des fibres afférentes périphériques.

1.7.6.1. Cellules

a- Polynucléaires neutrophiles: Elles libèrent des protéases, des protéines cationiques, et des éicosanoïdes. Ils présentent des récepteurs membranaires responsables de leurs adhérences, de chimiotactisme, de migration, endocytose et phagocytose [144].

b- Phagocytes mononuclées : Ils ont des rôles d'adsorption et de lyse d'agents pathogènes, ils assurent également la présentation des antigènes aux lymphocytes, la résorption de substances étrangères, et de débris, ils sécrètent des cytokines, et participent à l'agression tissulaire par la libération de métabolites

de l'oxygène, de protéase. Enfin ils participent à la fibrinogénèse et au remodelage cellulaire par l'apport de collagénase [144].

c- Lymphocytes : Ils sont de deux types : les lymphocytes B qui par différenciation donnent naissance aux plasmocytes, producteurs d'immunoglobulines, et les lymphocytes T responsables de l'immunité à médiation cellulaire [144].

d- Polynucléaires éosinophiles : Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites. Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T [145].

e- Mastocytes : Elles se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs inflammatoires comme la sérotonine, l'histamine, l'héparine et des cytokines [146], [147].

f- Cellules endothéliales : Elles sécrètent les cytokines, leur multiplication et leur différenciation sont indispensables à l'angiogénèse, facteur clé de réparation tissulaire. Les cellules endothéliales sont capables de participer aux phénomènes de réparation post inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases [148].

i- Fibroblastes : Elles interviennent dans la production de la matrice extracellulaire qui offre une résistance mécanique aux cellules. Ils produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice : collagénases, gélatinase, stromélysine, cathepsines,...etc. Ils participent aussi aux phénomènes de cicatrisation [149].

j- Plaquettes : Elles sont indispensables à l'hémostase primaire. Elles libèrent de nombreux médiateurs comme le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine [150].

1.7.6.2. Médiateurs

1.7.6.2.1. Médiateurs cellulaires

a. Amines vasoactives :

*Sérotonine : Elle stimule les fibres lisses vasculaires et la disjonction des cellules endothéliales.

*Histamine : Elle se trouve stockée sous forme de complexes protéiques inactifs car liée à l'héparine, elle est libérée lors de la dégranulation des cellules phagocytaires [142].

b- Cytokines : Jouant un rôle essentiel dans les communications intercellulaires. Les cytokines pro-inflammatoires sont essentiellement l'interleukine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 et le tumor necrosis factor (TNF alpha) [142].

c- Leucotriènes et prostaglandines : Ils augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimio-attractivité sur les polynucléaires. Les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire, de plus, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine [151].

d- Facteurs d'activation plaquettaire 'PAF' : Ils jouent un rôle dans la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule l'agrégation des plaquettes, induit la production des ROS, et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages [152].

1.7.6.2.2. Médiateurs plasmatiques

a-Kinines : Elles sont vasodilatatrices et augmentent la perméabilité vasculaire. Elles favorisent la libération des prostaglandines [153].

b-Système du complément : Il entraîne la fixation sur la particule cible de C3 responsable de l'opsonisation et de C5, C6, C7 et C8 responsables de la lyse avec libération de fragments peptidiques, les anaphylatoxines provoquant une inflammation locale [151].

c- Facteurs de la coagulation : la fibrine qui sédimente dans le site de l'inflammation à la phase aiguë est le résultat de l'activation de la fibrinogénèse [142], [140].

1.7.7. Implications pathologiques de l'inflammation

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires, comme les maladies auto-immunes systémiques et localisées, et les maladies auto-inflammatoires [137]. Quelques exemples sont rapportés dans le tableau 1.11.

Tableau 1.11 : Exemples de maladies liées à l'inflammation [154].

Origine	Origine
Désordres dans lesquelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation.	-Artériosclérose Arthrose -Asthme Polyarthrite rhumatoïde -Eczéma Maladie de Crohn (MC) -Goutte Thyroïdite d'Hashimoto -Maladie d'Alzheimer -Lupus érythémateux disséminé
Maladies d'origine infectieuse dans lesquelles l'inflammation contribue dans la pathologie.	-Hépatite C Tuberculose -Tuberculose Dysenterie bactérienne
Maladies d'origines divers dans lesquelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale de la pathologie.	-Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique -Fibrose pulmonaire idiopathique Bilharziose.

1.3.8. Anti-inflammatoires conventionnels

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), ce sont des médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves [155].

1.7.8.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Ils caractérisent tous par leurs propriétés antalgique, anti-inflammatoire et anti-agrégante plaquettaire (Tableau 1.12). Ils inhibent principalement le métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase. Les effets secondaires sont d'ordre digestif (ulcère), rénal, hépatique, cutané-muqueux, hématologique (cytopénie, atteinte médullaire), et allergique [156].

Tableau 1.12 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens [158].

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
Salicylates	Acétylsalicylique Diflusal	Aspirine® Dolobid®
Dérivés d'acide propénoïque	Ibuprofène Fénopropène calcium Flurbiprofène Ketoprofène	Ibuprofène® Nalfon® Ansaid® Nalfon®
Dérivés d'acide acétique	Diclofénac	Voltarene®
Indoles	Indométacine Tolmétine Sulindac	Indocine® Tolectine® Clinoril®

1.7.8.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques (Tableau 1.13) [159]. Ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique. En outre, ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les ions superoxydes. L'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables, le risque d'apparition de ces effets s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement. Conduisant à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et l'ulcères gastro-duodénaux [160], et [161].

Tableau 1.13: Les principaux AIS [160].

Glucocorticoïde	Nom commercial
Cortisol (Hydrocortisone)	Hydrocortone®, Solu-Cortef®
Cortisone	Cortison CIBA®
Prédnisone	Prednison Streuli®
Prédnisolone	Spiracor®, Ultracorten®
Méthylprédnisolone	Urbason®, Solu-Medrol®
Triamcinolone	Kenacort®, Ledercort®
Bétaméthasone	Celestene®, Diprostene®
Déxaméthasone	Fortecortin®, Decadron®

PARTIE 2 : EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSE

2.1. Récolte et séchage du matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté au mois d'Avril 2013, 2014, et 2015 au Jardin d'essai EL-HAMMA (Belouizdad) (Figure 2.1) (Tableau 2.1). Le prélèvement a été effectué très soigneusement sur des spécimens cultivés au stade de floraison, les feuilles récoltées sont rincées à l'eau distillée stérile, et directement séchées dans des conditions ambiantes d'humidité, de température, et à l'abri de la lumière. Des échantillons ont été conservés à l'état frais pour la confirmation de la plante et l'étude botanique, et afin de déterminer la teneur en eau de la plante.



Figure 2.1 : Carte géographique d'Alger, zone de récolte (cercle rouge) [266].

Tableau 2.1: Récolte de matériel végétal

N° récolte	Date	Heure	Lieu	Temps	Duré du séchage	But
1 ^{ère} récolte	09/04/2013	10 :40	Alger-Belouizdad	Ensoleillé	20 jours	Identification de la plante
2 ^{ème} récolte	17/04/2013	11.45	Alger-Belouizdad	Ensoleillé	20 jours	Calcul du rendement (extraits)
3 ^{ème} récolte	01/04/2014	10 :30	Alger-Belouizdad	Ensoleillé	20 jours	Analyses multiples

2.2. Identification Botanique de *C.parqui*

L'identification botanique a été faite par la paysagiste Mme BELAIDI Naima (Jardin d'essais el HAMMA–Alger), et Mr. METTTAI (Département d'agronomie de l'université de BLIDA 1), et confirmée par l'équipe du laboratoire d'arbrier de l'Institut National Supérieur d'Agronomie (INSA) EL HARRACH -ALGER ; où est conservé un échantillon d'herbier (Figure 2.2).

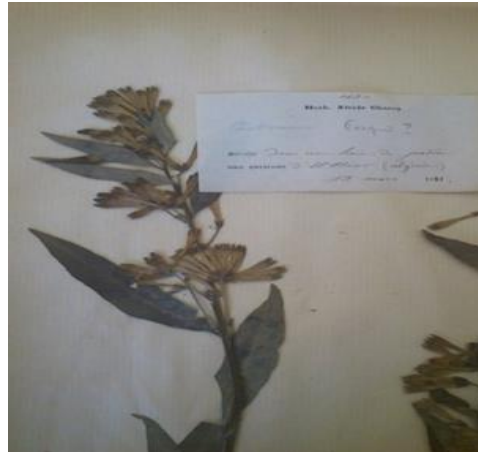


Photo 2.2 : Herbier de *C. parqui* conservé à l'INSA-EL HARRACH (Originale)

2.3. Traitement et préparation de la poudre végétale

La matière végétale sèche a été broyée à l'aide d'un broyeur (moulin à café) jusqu'à l'obtention d'une poudre de granulométrie compatible avec une extraction optimale. La poudre est ensuite conservée dans des flacons, en verre hermétiquement fermés à basse température (4°C) en vue de procéder aux différentes manipulations.

2.4. Enquête ethnobotanique et socio-économique

L'enquête ethnobotanique est un travail de terrain qui consiste à aller à la rencontre des praticiens traditionnels et des personnes différentes pour s'enquérir de leur connaissance et leur méthode de traitement des maladies. Cette enquête est indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de cibler certains tests biologiques.

L'enquête est en deux parties ; la première est sous forme d'un questionnaire de 32 questions (ANNEXE 01); et la deuxième est sous forme d'une recherche bibliographique sur des supports référenciers (livres, thèses, bases de données : Springer, Elsevier, Willy, Scopus, EM consulte...).

2.5. Étude botanique de la plante

Pour chercher des spécificités morphologiques et anatomiques de la plante, une étude de l'aspect macroscopique (observation des différents organes de la plante) et microscopique a été réalisée.

2.5.1. Etude macroscopique

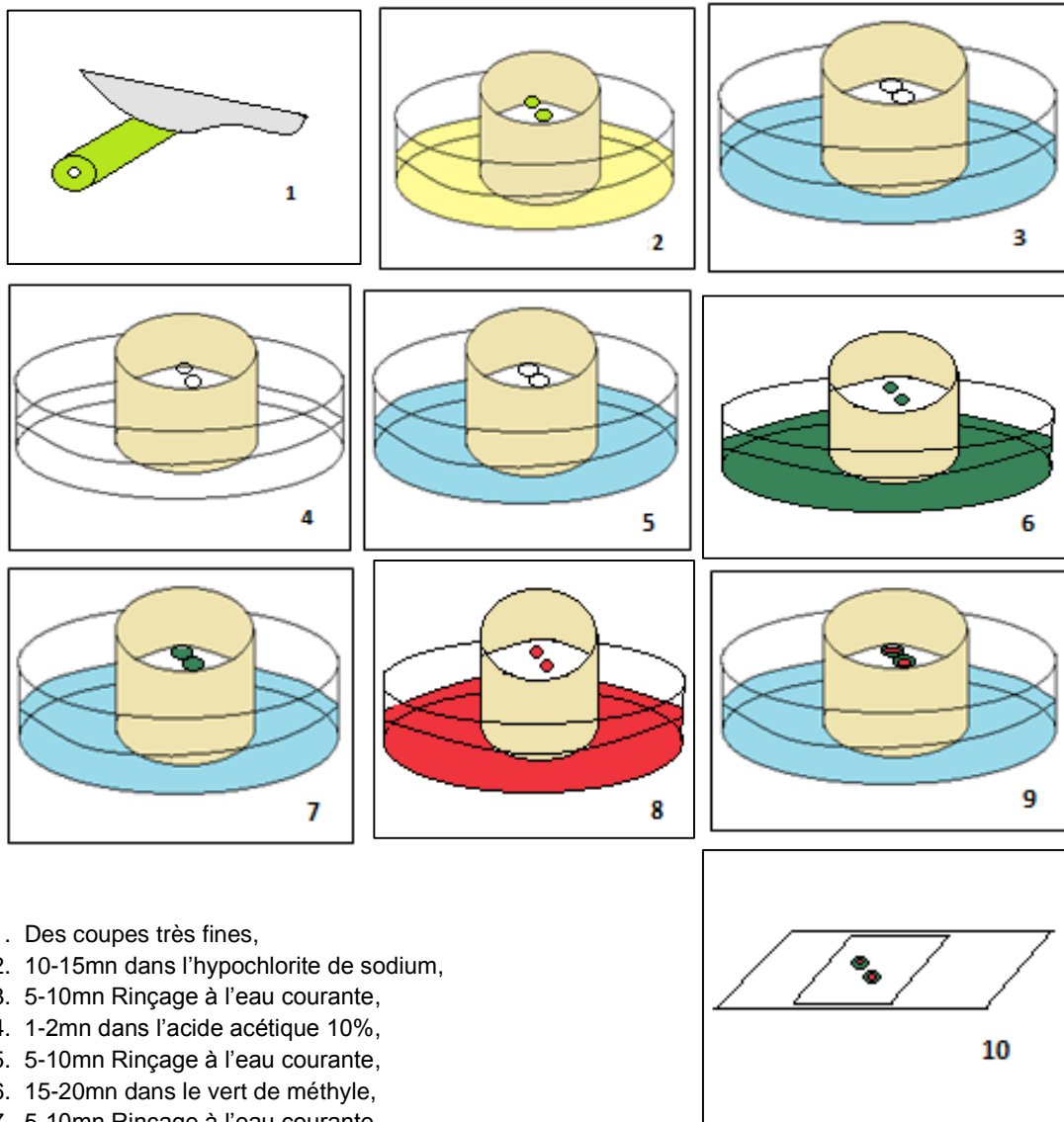
L'observation macroscopique est réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire à un grossissement de 0.8 et 2.5.

2.5.2. Eude microscopique

Cette étude a porté sur la réalisation des coupes histologiques très fines au niveau la feuille avec une double coloration au vert de méthyle et au rouge Congo (Figure 2.3).

La coloration est réalisée selon le protocole décrit par [267], selon les étapes suivantes :

- Les coupes sont plongées dans hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules,
- Après rinçage à l'eau courante de 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique à 10% pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion des colorants,
- Ces coupes sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante de 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min,
- Après lavage à l'eau courante, elles sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.



1. Des coupes très fines,
2. 10-15mn dans l'hypochlorite de sodium,
3. 5-10mn Rinçage à l'eau courante,
4. 1-2mn dans l'acide acétique 10%,
5. 5-10mn Rinçage à l'eau courante,
6. 15-20mn dans le vert de méthyle,
7. 5-10mn Rinçage à l'eau courante,
8. 15-20mn dans le rouge de Congo,
9. 15-20mn dans l'eau courante,
10. Observer entre lame et lamelle sous microscope x40.

Figure 2.3: Différentes étapes de la réalisation des coupes histologiques.

[267].

2.6. Analyses phytochimiques

2.6.1. Détermination de la teneur en eau

Selon [268] ; la teneur en eau de la plante a été déterminée par le procédé de séchage des échantillons de poids déterminés (2g) dans une étuve ventilée à 75°C. Les pesés ont eu lieu, toutes les 24 H jusqu'à obtention d'un poids constant. Ainsi, la teneur en eau de la plante a pu être déterminée. La teneur en eau (T) exprimée en % de poids frais.

La teneur en eau a été calculée comme suit :

$$T = (P1 - P2) / P1 \times 100$$

P1 poids de l'échantillon «plante fraîche».

P2 poids de l'échantillon «plante sèche».

2.6.2. Détermination de l'humidité

L'humidité est une perte de masse lors de séchage de la matière végétale. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant les 15%. Le contenu en humidité de la poudre a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à une température réglée à 105°C pendant 2 h jusqu'à l'obtention d'un poids constant [269].

Le pourcentage d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (M - M1) / M \times 100$$

M : Masse d'échantillon frais en g, M1 : Masse d'échantillon après le séchage en g

2.6.3. Détermination de la teneur en cendres

La prise d'essai **P1** (2 g) séchée a été introduite au four et calcinée au rouge entre 500-550 °C pendant 4 heures au moins (jusqu'à disparition de toute tache noire).

Nous avons procédé ensuite au refroidissement de la capsule pendant 24h.

La capsule a été mise au dessiccateur pendant 15 min. avant de peser. Soit **P2** le poids des cendres contenues dans la capsule. Le taux des cendres (TC) est calculé selon la formule suivante [270].

$$TC = P2 / P1 \times 100$$

(% /g. poids sec)

2.6.4. Extraction des composés actifs de feuilles de *Cestrum parqui*

2.6.4.1. Extraction des composés polaires et apolaires par la méthode de Soxhlet

a- Principe

L'extraction solide-liquide est réalisée par un appareil spécial ; le Soxhlet. (Figure 2.4). L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute.

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération. 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.

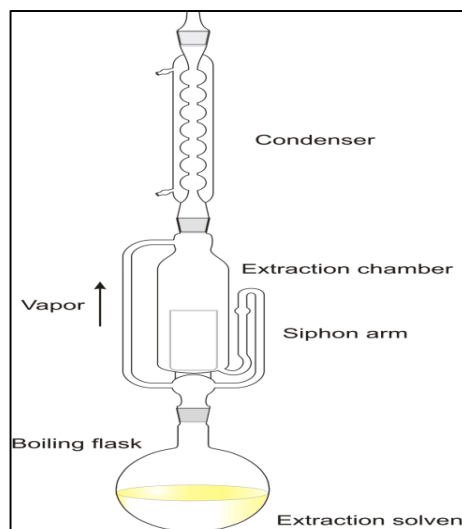


Figure 2.4: Appareil de Soxhlet [271]

b- Mode opératoire

Trente grammes (30g) de la poudre végétale sèche, est enveloppée dans une cartouche en papier filtre afin, la cartouche sera placée dans le Soxhlet surmonté d'un réfrigérant. 300 ml d'éther de pétrole sont introduits dans un ballon à fond plat. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec la

cartouche. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction (Figure 2.5).

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons dans le ballon le solvant enrichi en substances solubles. Après concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C nous obtenons l'extrait apolaire ou lipidique de feuilles (extrait étheropétrolique ; EEP-F), Le marc dégraissé par l'éther de pétrole est repris par 300 ml de l'éthanol selon le même protocole pour récupérer la fraction polaire (extrait éthanolique de feuilles ; EE-F).

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions selon la formule suivante [272]:

$$\%R = P'/P'' \times 100$$

R : rendement de l'extraction, *P''* : poids de poudre, *P'* : Poids de l'extrait sec.

Les résidus obtenu sont regroupés, pesés, et conservés à 4°C ± 2 pour les tests phytochimiques et biologiques ultérieurs.

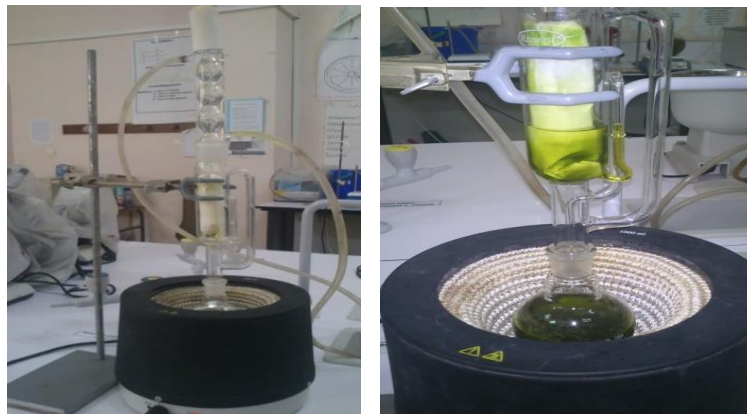


Photo 2.5: Extraction solide –liquide par la méthode de Soxhlet (Originale)

2.6.4.2. Extraction à chaud de l'extrait aqueux ou l'infuse a 20% ; (EA-F)

Selon [273] ; 10 g de poudre de feuilles sèche sont dissous dans 50 ml de l'eau distillée stérile chaude portée au bain marie (80°C), le mélange est laissé sous agitation pendant 15 mn, et il est filtré et stérilisé par la suite à travers un microfiltre

de 0.20 μm , et conservé à $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Des dilutions de 5 et 10% sont préparées à partir de l'infusé à 20% au fur à mesure des tests.

2.6.5. Contrôle de la réussite des extractions des trois extraits

Une bonne extraction peut se contrôler par des tests révélateurs de la richesse et la diversité des extraits par la présence de groupements fonctionnels actifs; pour cela on a analysé les extraits obtenus par deux méthodes : la spectrométrie balayage à l'UV-Visible, et la spectrophotométrie à l'infrarouge qui sont des méthodes quantitatives et qualitatives.

2.6.5.1. Spectrophotométrie à balayage ultraviolet-visible

La solubilisation de chaque extrait (1mg) est réalisée avec le solvant approprié (1ml) : Les échantillons en solution sont placés dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm à un volume de 3 ml dans chaque cuve ; et ils sont soumis à un balayage en spectrophotométrie entre 220 et 800 nm par un spectrophotomètre UV-1800 SHIMADZU ; on étalant l'appareil à chaque analyse de l'extrait [274].

2.6.5.2. Spectrophotométrie infrarouge

Un milligramme (01mg) de chaque extrait sont mélangés avec 10 mg de bromure de potassium finement pulvérisé et desséché. Le mélange Extrait/ poudre KBr est soigneusement broyé, étendu uniformément dans une matrice spéciale et soumis à une haute pression, pour obtenir une pastille adéquate (Figure 2.6) [275]. Les différentes pastilles sont mises aux rayonnements infrarouges par un spectrophotomètre FT/IR-4100 JASCO. Les spectres obtenus sont traités interprétés par le logiciel Essential FTIR.



Photo 2.6 : Pastilles KBr des trois extraits (Originale).

2.6.6. Screening triphytochimique des extraits de feuilles de *Cestrum parqui* ; l'EE-F, l'EEP-f, et l'EA-F

2.6.6.1. Recherche des alcaloïdes aglycones

A. Recherche des alcaloïdes sels

Évaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en trois parties égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer, la seconde avec le réactif de BOUCHARDAT, et la troisième avec le réactif DRAGENDORFF (La positivité d'un seul test confirme la présence des alcaloïdes).

Prendre 25 ml de l'extrait aqueux, ajouter 15 ml d'HCL10%, porter l'ensemble à reflux pendant 30 mn, refroidir le mélange et l'extraire 3 fois avec l'éther diéthylique. Décanter et effectuer les tests sur les deux phases avec le réactif de Mayer, BOUCHARDAT, et DRAGENDROFF [276].

B. Recherche des alcaloïdes basiques

20 ml de l'EEP-F (10/100) sont évaporés à sec, le résidu obtenu est dissout dans 3 ml de HCL 2%, quelques gouttes de réactif de MAYER, BOUCHARDAT, et DRAGENDROFF sont rajoutés à chaque 1 ml de la solution.

Un précipité blanc jaunâtre, brun, et virage au couleur rouge-orangé des tubes confirme respectivement la positivité des tests [276].

2.6.6.2. Recherche des anthocyanes

5 ml de chaque extrait à 10% sont mélangés avec 15 ml de H₂SO₄ à 10%, et par la suite par 5 ml de NH₄OH dilué au demi. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique ; la présence des anthocyanes est confirmée [277], [278].

2.6.6.3. Recherche des composés réducteurs

1 ml de chaque extrait sont dilués par 2 ml d'eau distillée stérile, 20 gouttes de liqueur de Fehling sont rajoutés, les mélanges sont chauffés à 50°C. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs [278].

2.6.6.4. Recherche des coumarines

Au résidu sec de chaque extrait à 10 %, 2 ml d'eau distillée chaude ont été ajoutés. Après refroidissement, 0,5 ml d'ammoniaque ont été ajoutés à chaque tube. L'apparition d'une fluorescence intense bleu verdâtre ou violette sous la lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ et $\lambda = 366 \text{ nm}$) indique la présence de coumarines [279].

2.6.6.5. Recherche des flavonoïdes (Réaction à Cyanidine)

2 ml de chaque extrait à 10% sont mélangés avec 5 ml de l'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°+ eau distillée + acide chlorhydrique concentré (V/V/V : 5ml)), quelques copeaux de Magnésium et 1 ml de l'alcool isoamylique sont rajoutés après aux mélanges. Le virage de couleur au rose orangé, ou rose violacé, ou rouge indique la présence des flavones, ou flavonones, ou flavonol respectivement [279], [278].

2.6.6.6. Recherche d'huiles volatiles et acides gras

10 ml de l'EE-F et l'EEP-F sont évaporées à sec, les résidus sont dissout dans 3 ml de l'éthanol, les solutions alcooliques sont concentrées à sec ; la présence d'un résidu arôme confirme la positivité de la réaction. Le résidu restant de chaque extrait est repris dans 3 ml de l'éther diéthylique et 10 ml de KOH 2N, la phase étherique est évaporée à sec, la présence d'un résidu gras indique la présence des acides gras [278].

2.6.6.7. Recherche des composés cyanogénétiques

Un gramme de chaque extrait est mélangé avec 5 ml de toluène dilué (V/V), un papier picrosodé est imbibé de réactif de Guignard (2 g d'acide picrique et 20 g de carbonate de sodium dans 200ml d'eau distillée) ; une réaction positive se traduit par le virage de couleur au rouge après 24 heures [278], [279].

2.6.6.8. Recherche de mucilage

1 ml de chaque extrait à 10 % est mélangé avec 5 ml de l'éthanol absolu, le mélange ainsi obtenu est bien agité pendant 10 à 15 mn ; la formation d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage [278], [279].

2.6.6.9. Recherche des polyphénols

Une goutte de chlorure ferrique à 2% est rajoutée à 2 ml de l'EE-F et l'EA-F à 10 % ; une coloration bleu noirâtre ou verte plus au moins foncé confirme la présence des polyphénols [279], [277].

2.6.6.10. Recherche des quinones

2 ml de chaque extrait à 10 % sont évaporés à sec, les résidus obtenus sont triturés dans 5 ml de HCL au 1/5, les mélanges sont laissés dans le bain marie à 50° pendant 30mn ; les contenus des tubes sont refroidis et mélangés avec 20 ml de chloroforme et 0.5 ml de l'ammoniaque dilué 2 fois. Une coloration rouge positive le résultat [279], et [280].

2.6.6.11. Recherche des saponines

Quelque goutte d'acétate de plombe est rajoutée aux 2 ml de l'EE-F. Un précipité blanc au fond du tube indique la présence des saponines [280], [281].

a. Indice de mousse : Ce dernier est le degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées, afin de déterminer la richesse de la plante en saponines ; Une décoction est préparée à 1% avec du matériel végétal sec et broyé, La solution obtenue est filtrée et ajustée à 100ml, après refroidissement, 10 tubes sont préparés avec 1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 8, 9 et 10 ml à partir de cette décoction ; le volume final est réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le Xe tube, l'indice de mousse est alors calculé par la formule suivante [282]:

Indice de mousse = 1000/ numéro de tube à 1 cm de mousse.
--

2.6.6.12. Recherche des stérols et les terpènes

5 ml de chaque extrait sont mélangés avec 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont laissés pendant 30 mn à 21°C. L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive : Couleur vert bleu : présence des hétérosides stéroïdiques, couleur violet : présence des hétérosides triterpéniques [279], [277], et [283].

2.6.6.13. Recherche des tanins

30 ml de chaque extrait à 5% sont mélangés avec 15 ml de réactif de STIASNY (10 ml de formol 30% et 5 ml de HCL), les tubes sont chauffés au bain marie à 80°C/15 à 30mn ; la formation d'un précipité rouge dans les tubes indique la présence des tanins cathéchiques. Les préparations sont ensuite filtrées et saturées par l'acétate de sodium pulvérisé et 1 ml de FeCl₃ à 1% ; la couleur bleu noirâtre indique la présence des tanins galliques [279], [283], [284].

2.7. Analyses biologiques

2.7.1. Contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de *C.parqui*

Ce contrôle microbiologique été un passage primordiale avant la réalisation de l'extraction solide-liquide (extraction éthanolique et étheropétrolique) et l'extraction à chaud (infusé) pour éviter toute susception d'une intoxication microbienne des souris à chaque test *in vivo* (toxicité, et activité anti-inflammatoire). La poudre de feuilles a été analysé selon le décrit ministériel N°35 du 27-5-1998 [285] ; dont les germes recherchés dans le cas des végétaux séchés sont : les germes aérobies à 30°C, les coliformes fécaux, les clostridiiums sulfito-réducteurs à 46°C, les

Salmonelles, et les moisissures. L'interprétation des résultats est rapportée aux normes exigées dans le décret ministériel N°35 du 27-5-1998 (ANNEXE 02).

2.7.1.1. Préparation de la solution mère (10^{-1}), les solutions 10^{-2} , et 10^{-3}

2.5 g de poudre de feuilles de *C.parqui* sont mélangés avec 22.5 ml de bouillon TSE (Eau physiologique péptonée) dans un flacon de 250ml (IPA); cette solution est dite solution mère (SM) ou solution à 10^{-1} est mise en incubation à 37°C pour une durée de 30 minutes.

A partir de cette solution (SM) ; des dilutions décimales sont préparées afin d'obtenir des dilutions de 10^{-2} , et 10^{-3} .

2.7.1.2. Recherche des germes aérobies totaux à 30°C

1 ml de chaque dilution estensemencé par la méthode en masse dans la gélose TGEA (tryptone glucose extract agar) ; les boites sont bien agitées on faisant des mouvements de la forme de huit afin d'homogénéiser le mélange, puis incubées à 37°C pendant 48h. Des lectures des boites sont réalisées chaque 24 h d'incubation (deux lectures). Une boite de la gélose TGEA nonensemencée est incubée en parallèles avec les boites testées (témoin).

2.7.1.3. Recherche des coliformes fécaux

1 ml de chaque dilution est mis dans un tube de milieu de l'eau peptonée d'indole, les tubes ainsi préparés sont incubés à 44°C pendant 24 heures ; la réaction est révélée par l'ajout de quelques gouttes de réactif de Kovacs. Un tube en plus du milieu utilisé est incubé dans les mêmes conditions constitue le tube témoin.

2.7.1.4. Recherche des clostridiums Sulfito-réducteurs à 46°C

1 ml de la dilution 10^{-1} et 10^{-2} sont mélangés dans 15 ml de milieu viande foie (VF) additionné des additifs d'Alun de fer et sulfite de sodium, à raison de deux tubes pour chaque dilution, et sont incubés avec un tube témoin sans dilution au bain marie à 80°C pendant 10 min, les tubes ont subi un choc thermique en les introduisant rapidement dans de l'eau froide à 10°C puis incubés après à 37°C durant 48 heures avec une lecture toutes les 24 heures.

Le dénombrement des spores sulfito-réducteurs est réalisé par la formule suivante [285]:

Nombre de spores/ v (Nr × Id)

V : volume utilisé, nr : nombre de répétitions, Id : inverse de la dilution)

2.7.1.5. Recherche des salmonelles

1 ml de la dilution 10^{-1} est mélangé avec 05 ml de bouillon SFB (bouillon au sélénite acide de sodium+ cystine) additionnée avec quelques gouttes de sélénite de sodium, un tube de SFB sans dilution va servir comme témoin ; les deux tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Si la réaction est positive ; un repiquage sur le milieu Hecktoen est recommandé avec une incubation de 24 heures.

2.7.1.6. Recherche de moisissures

Quatre gouttes de chaque dilution sont mis sur les géloses OGA (Oxytétracycline glucose agar) dans des boites à pétri ; les gouttes sont étalées par la méthode en RATO et incubées à 25°C pendant 05 jours, une boite nonensemencée est lancée dans les mêmes conditions qui sert comme une boite témoin.

2.7.2. Etude de toxicité aigüe de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F de feuilles *C.parqui* *in vivo* :

2.7.2.1. Test de toxicité aigüe *in vivo* par la méthode des doses fixes : ligne directrice n°420 de l'O.C.D.E.

Le test de toxicité aigüe est réalisé sur des souris femelles dans les conditions optimales exigées par le service pharmacotoxicologie de l'LNCP (Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques) d'Alger (Tableau 2.2).

2.7.2.1.1. Matériel animal

Tableau 2.2 : Animaux et conditions contrôlées de l'animalerie

CONDITIONS DES LOCAUX	
Température	23-25°C ±3
Taux d'humidité	55 %
Eclairage	Artificiel 12/12h
ANIMAUX	
Espèce	Souris
Race	Souche couramment utilisée en laboratoire ; NMRI
Sexe	Femelles nullipares et non gravides.
Age et poids	8-10 semaines, un poids doit se situer à l'intervalle de 20% par rapport au poids moyen des animaux du même lot
Alimentation	Nourriture (ONAB : Office national d'aliment de bétail – Bejaïa), l'eau potable

2.7.2.1.2. Principe

La méthode utilisée est celle des doses prédéterminées, elle donne des résultats qui permettent le classement des substances dans le Système de classification globalement harmonisé (SGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë. Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux étape par étape. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux (ANNEXE 03).

La dose initiale dans l'étape préliminaire est sélectionnée sur la base d'une étude d'orientation, d'où les groupes d'animaux d'un seul sexe reçoivent initialement des doses fixes soit de 5, soit 50, soit 300 ou 2000 mg / kg (Figure 2.8).

D'autres groupes d'animaux perçoivent des doses plus fortes ou moins dans l'étape principale, en fonction de la présence ou de l'absence d'une toxicité évidente (signes) ou de mortalité :

- Administration de la même dose aux animaux supplémentaires,
- Administration de la dose immédiatement inférieure à un seul animal,
- Arrêt de l'essai.

2.7.2.1.3. Mode opératoire [286]

a. Nombre d'animaux et préparation des doses

Le volume maximal de liquide dépend de la taille de l'animal d'essai. Pour les rongeurs, le volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 mL/100 g de poids corporel.

Il est recommandé d'utiliser une solution (suspension/émulsion) aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans l'huile (l'huile de maïs). En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue.

Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

Dans notre étude l'extrait éthanolique et aqueux de feuilles de *C.parqui* sont dilués dans de l'eau distillée stérile, et l'extrait lipidique ou éteropétrolique de feuilles de *C.parqui* dans l'huile de maïs, les solutions sont administrés par gavage en raison de 2ml pour chaque 100 g de poids corporel de la souris.

Pour la dose initiale on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer de la mortalité des sujets traités.

Lorsque des informations sont disponibles qui suggèrent une mortalité peu probable au niveau de dose initial le plus élevé (2000 mg/kg de poids corporel), il faut procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale dans une première étape dite préliminaire qui est recommandée pour des raisons liées au bien-être des animaux est de 300 mg/kg.

Exemple : Préparation de la dose de 300mg/kg *c.p.*:

- Peser les souris de chaque lot par une balance,
- Calculer le volume de chaque produit par rapport au poids pesé des souris.

Exemple : Poids de souris est de 19 g, soit \times le volume de l'EE-F à peser

300mg-----1000g

x ----- 19g x = 5.7mg (pour une souris)

Donc on doit peser 5.7 mg de l'EE-F et la diluer dans 0.5 ml de l'E.D.S.

Remarque : toutes les concentrations préparées dans le test de toxicité *in vivo* sont calculée par cette méthode.

b. Etape préliminaire

0.5 ml des solutions à 300 mg/kg *c.p.* de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F sont préparés le jour même de l'opération et administrés par voie orale à une seule souris femelle NMRI pour chaque extrait par lot , parallèlement deux lot témoins serviront comme lot de contrôle au cours de la période de l'observation (14 jours) dont les deux souris sont gavées seulement par de l'eau distillée stérile et l'huile de maïs par le même volume (Figure 2.8).

c. Solutions de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F à 300 mg/kg *c.p.*

L'administration d'une deuxième dose à tester est basée selon l'absence ou la présence des cas de mortalité ou les symptômes de toxicité après les 14 jours d'observation de tous les lots testés ; le choix de la concentration suivante est comme suit (Figure 2.7, 2.8) :

- Si il y a une mortalité des souris gavées : la concentration testée va être diminuée à 50 mg/kg *c.p.* pour le même nombre d'animaux.
- Si il n'y a pas de mortalité mais des signes de toxicité évidente sont notés : la dose de 300 mg/kg *c.p.* est fixée pour l'étude principale avec 5 souris par lot.
- En absence de mortalité, ou de signes de toxicité remarqués : la dose sera augmentée à 2000 mg/kg *c.p.* pour une seule souris par lot.

Dans notre étude, la deuxième dose choisie est de 2000 mg/kg *c.p.* pour chaque extrait sur une seule souris, les préparations ainsi les lotions témoins sont administrées dans les mêmes conditions du premier gavage.

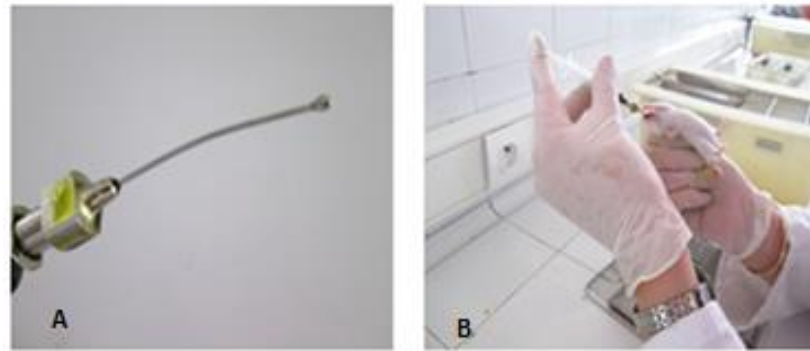


Photo 2.7 : Administrations orale par la sonde de gavage (Originale)

A : Sonde de gavage, B : gavage des souris.

d. Etude principale

Après une durée d'observation de 14 jours ; la dose utilisée dans l'étape principale sera choisie comme suit :

- En cas de mortalité des souris gavées ; la concentration testée va être diminuée à 300 mg/kg *c.p.* pour une étude principale (05 souris par lot).
- En présence des signes de toxicité mais sans mortalité ; la dose de 2000 mg/kg *c.p.* est fixée pour l'étude principale sur 05 souris pour chaque extrait.

Dans notre cas ; la dose de 2000 mg/kg *c.p.* est la dose choisie pour l'étude principale ; après le gavage de toutes les souris ; les lots sont remis sous observation pendant 14 jours. Le classement de toxicité aiguë de chaque extrait selon le système de classification globalement harmonisé S.G.H. est fait selon les observations des mortalités ou de signes de toxicité au 14^{ème} jour d'observation (ANNEXE 03) : 05 Catégories de toxicité aiguë sont classées :

01: Extrêmement toxique, 02: Fortement toxique, 03: Moyennement toxique, 04: Faiblement toxique, et 05: Non classé.

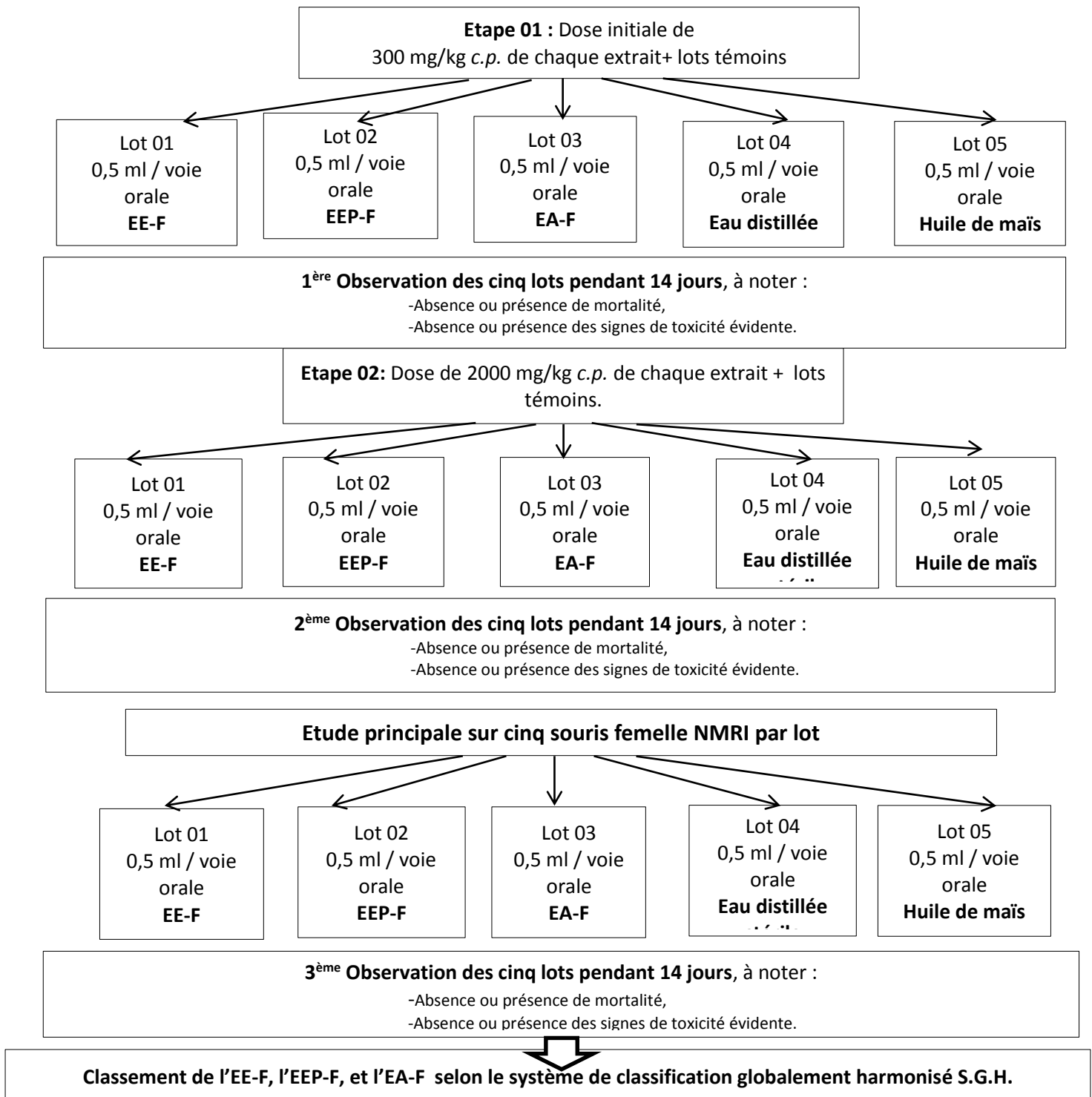


Figure 2.8 : Etapes du test de toxicité aiguë des extraits de feuilles de *C.parqui* selon la ligne directrice N°420 [286].

2.7.2.2. Test de toxicité aigue *in vivo* par le test limite selon la ligne directrice n°423

2.7.2.2.1. Principe

Afin d'assurer et confirmer les résultats obtenus dans le premier test de toxicité aigüe par la méthode des doses fixes ; le nombre des animaux testés est de 06 souris pour chaque lot.

L'essai limite est utilisé principalement lorsque des informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique sont disponibles, c.à.d. que la toxicité se situe au-dessus de la dose limite testée. La méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL50. Comme la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé, la méthode permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée létale. Une DL50 peut être déterminée seulement dans le cas où au moins deux doses donneront une mortalité supérieure à 0% et inférieure à 100% (ANNEXE 03).

2.7.2.2.2. Mode opératoire [287]

Les souris femelles de race NMRI sont placées dans des cages spéciales quelques jours avant l'expérience. Après avoir soumis les souris à un jeûne de 17 heures, six lots de six (06) souris sont répartis dans des cages, dont les deux premiers lots serviront comme lots témoins où les souris sont gavées par 0.5 ml de l'eau distillée stérile dans le lot N°01, et par 0.5 ml de l'huile de maïs dans le lot N°02).

L'extrait éthanolique de feuilles (EE-F), l'extrait lipidique ou étheropétrolique (EEP-F) à 2000 mg/kg *c.p.*, et l'extrait aqueux (EAF) à 10% et 20 % sont administré par voie orale, au volume de 0.5 ml/souris à raison de quatre lots séparés ; L'administration des extraits est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire.

Après l'administration des solutés, les animaux sont observés toutes les 30 minutes pendant 8 heures le premier jour avec une réalimentation après les deux heures qui suivent le gavage, et tous les jours pendant 15 jours, une observation du comportement général de l'animal (agitation, asthénie, aspect des yeux « lacrymaux, à moitié fermés »....) en comparaison avec les lots témoins non traités

est notée. Les souris sont pesées au début, au 7^{ème} jour, et au dernier jour de l'expérience. Afin d'observer la morphologie générale des organes une dissection générale de toutes les souris testée est réalisée (Figure 2.9 et 2.10).

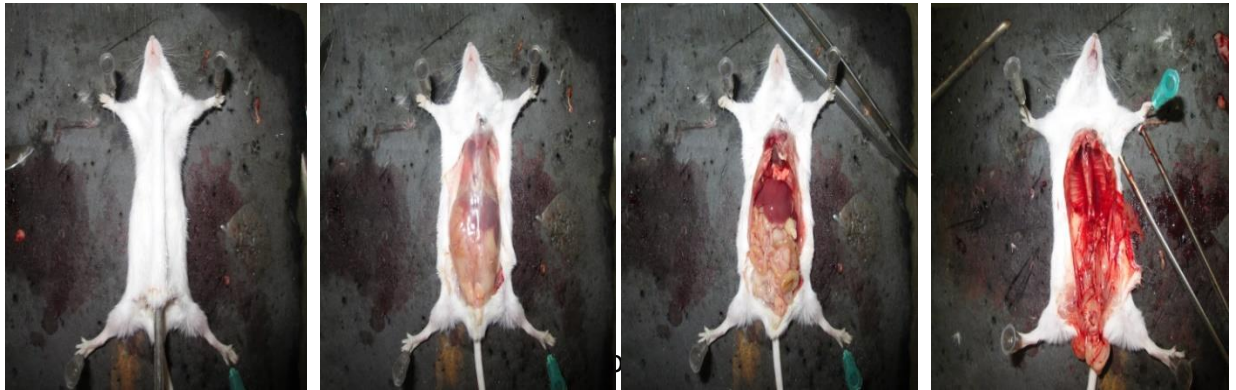


Photo 2.9: Dissection des souris et prélèvements des organes (Originale).

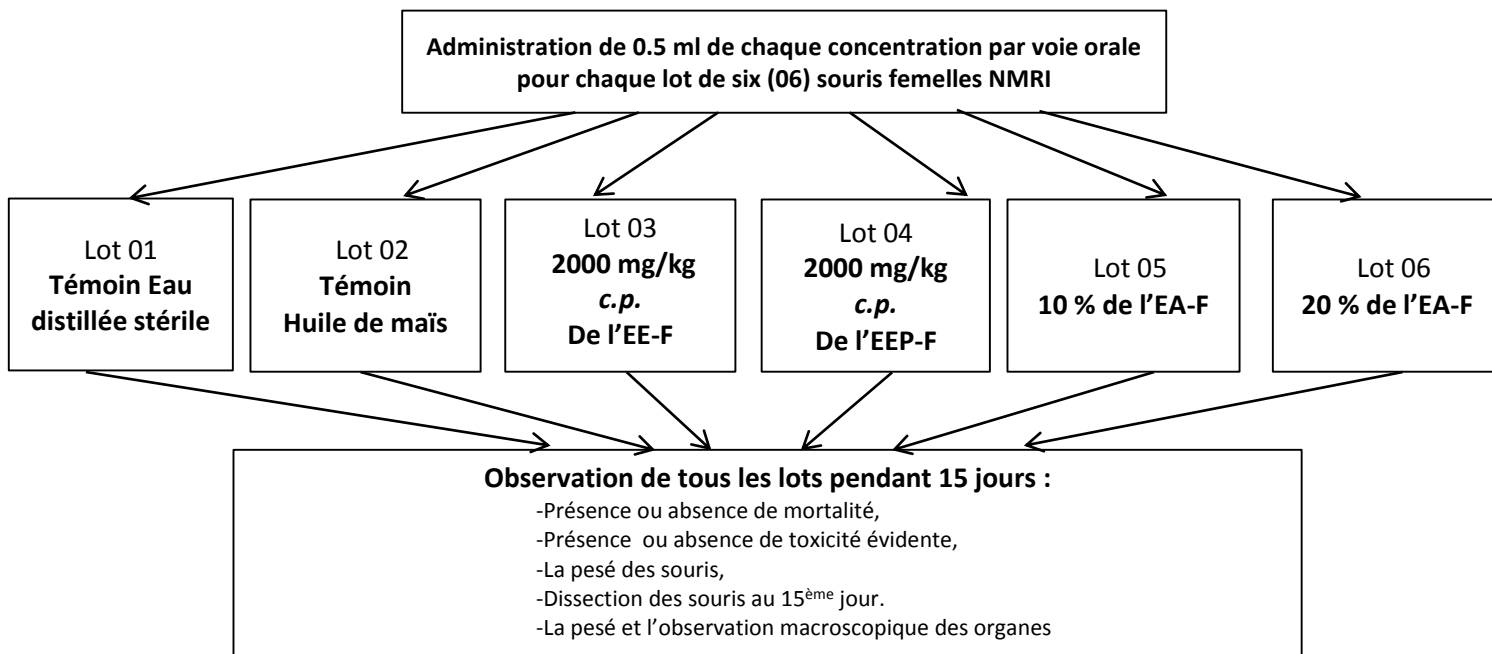


Figure 2.10 : Etapes du test de toxicité aiguë de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* selon la méthode de test limite- OCDE N°423 [287].

2.7.3. Activité antileishmanienne *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* sur *Leishmania infantum* et *Leishmania major*

2.7.3.1. Repiquage des souches parasitaire et préparation de la suspension mère (SM)

La forme promastigote des deux souches ; *Leishmania major* (LIPA 100/09), et *Leishmania infantum* (LIPA 15/05), est maintenue (ensemencement par stries)

pendant 05 jours à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ sur le milieu incliné de Novy, MacNeal, and Nicolle (NNN) (Figure 2.12) additionné d'antibiotiques (100 UL/ml de Pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de Streptomycine). Après les cinq jours d'incubation ; les cultures parasitaires dans les tubes NNN sont vérifiées (s'il y a eu des contaminations) et observées sous microscope optique ($\times 40$) ; la charge parasitaire est estimée comme suit :

Tableau 2.3 : Evaluation de charge parasitaire

Nombre Des Parasites/Champs	Evaluation	Interprétation
≤ 01	+/-	Culture faible
2 à 05	+	Culture de charge modérée
05 à 10	++	Culture positive
≥ 10	+++	Culture enrichie

L'ajustement de la culture par l'eau physiologique stérile à 0.9% est effectué si la charge parasitaire est faible ; les tubes NNN seront mis alors en culture pour quelques jours (jusqu'à 15 jours). 200 ul de chaque culture parasitaire sur NNN est repiqué dans 2 ml de milieu de culture RPMI1640 additionné de 10% de sérum de vœu foétale (SVF), de 100UI/ml Pénicilline, et de 100 ug/ml Streptomycine (Figure 2.11), et incubées encore une fois pendant 96 heures à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, un deuxième passage des deux souches de *Leishmania* dans le milieu de culture de RPMI1640 est réalisé dans les mêmes conditions, en vérifiant à chaque fois une présence d'éventuelles contaminations bactériennes ou fongiques.

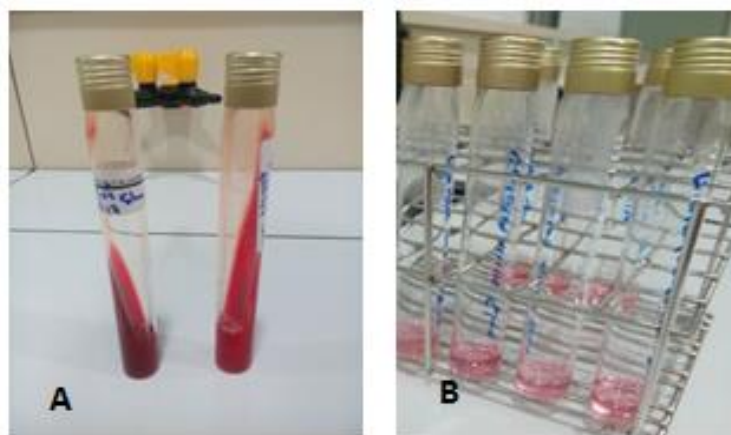


Photo 2.11 : A : Milieu NNN, B : Milieu RPMI 1640

Après les deux repiquages ; les cultures sont retirées de l'étuve, et centrifugées à raison de 2500t/10min à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$; le culot de chaque souche est récupéré,

additionné de 2 ml de RPMI1640. Les parasites de chaque suspension sont comptés sur cellule de THOMA, la concentration parasitaire de chaque souche est calculée selon la formule suivante [288]:

$$[] \text{ Parasites /ml} = \text{Nbr PC} / 6 \times 16 \times 3 \times 10^4$$

Nbr PC : Nombre des parasites comptés

Après le comptage, les cellules de forme promastigote de chaque souche sont ajustées à 10^6 parasite/ml. Cette suspension est la solution mère (SM) qui sera mis en contact avec les différents produits (extraits, témoins) (Figure 2.12).

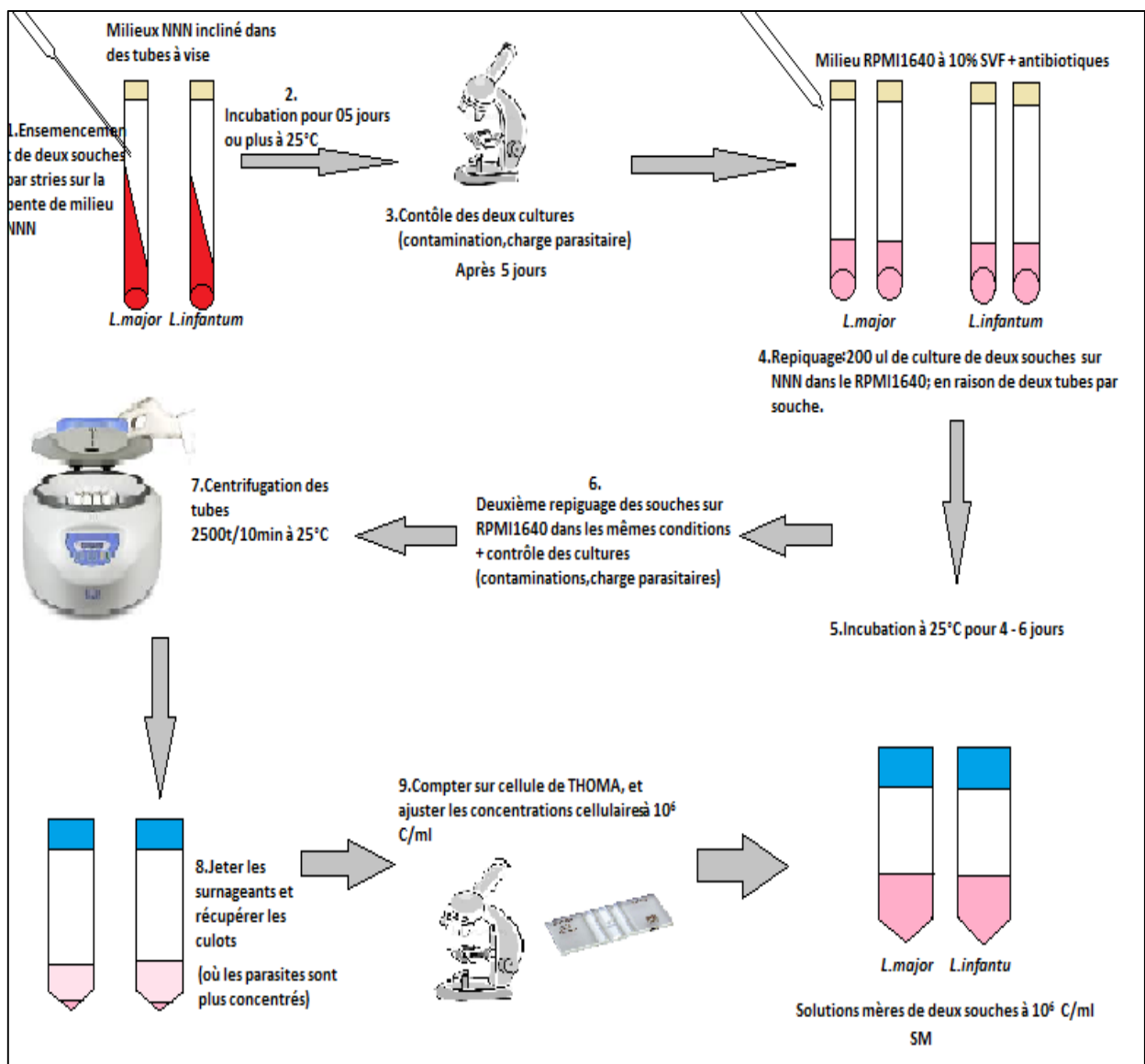


Figure 2.12 : Etapes de préparation des solutions mères des deux souches de *Leishmania* (Originale).

2.7.3.2. Contact avec les extraits et mise en culture sur des microplaques à fond plat :

Dans des microplaques à 96 puits à fond plats ; 10 ul de chaque concentrations de l'EE-F et l'EEP-F (12.5, 25, 50, et 100 ug/ml à 0.5% de DMSO), et de l'EA-F (50, 100, 200, et 400 ug/ml de l'eau distillée stérile) (Tableau 2.4) sont mis en contact avec 90ul de suspension parasitaire de chaque souche de *Leishmania* de forme promastigote (10^6 parasites/ml) à raison de quatre répétitions pour chaque concentration de chaque extrait, les microplaques fermées, étiquetées, bien agitées (8 min) , sont incubées à $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ pendant 72 h.

Les deux souches parasitaires dans le RPMI1640 à 0.5% de DMSO (test de contrôle) et ceux avec les différentes concentrations de témoin positif ; l'antimoine trivalent SBIII (100, 50, 25, et 12.5 ug/ml) (test de référence) sont incubées dans les mêmes conditions. Des puits contenant que le volume finale recommandé des extraits seuls serviront comme témoin bruit fond pour le test colorimétrique. Après les trois jours ; les microplaques sont retirées de l'étuve.

Tableau 2.4 : Différentes concentration des produits testés et solutions de dilutions :

Produits	[] ug/ml	Solution de dilution
EE-F	12.5	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	25	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	50	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	100	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
EEP-F	12.5	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	25	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	50	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	100	RPMI1640 à 0.5% de DMSO
EA-F	50	RPMI1640
	100	RPMI1640
	200	RPMI1640
	400	RPMI1640
SBIII	12.5	PBS + RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	25	PBS + RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	50	PBS + RPMI1640 à 0.5% de DMSO
	100	PBS + RPMI1640 à 0.5% de DMSO
DMSO 0.5%	/	RPMI1640
E.D.S.	/	RPMI1640

2.7.3.3. Test de l'inclusion par la coloration de bleu de TRYPAN à 0.4 %

10 ul de chaque contenu de chaque puits est mélangé avec 10 ul de formol à 10% et 10 ul de bleu de TYPAN à 0.4% ; les cellules vivantes seront être brillantes ; tandis que celles qui sont mortes incorporent du bleu de TRYPAN et deviennent bleues. Les cellules sont comptées par la cellule de THOMA (×40). La concentration parasitaire de chaque puits est calculée par la suite. Le pourcentage de viabilité des parasites est calculé par rapport au témoin négatif (à 0.5% de DMSO et l'eau distillée stérile) selon la formule suivante [288], [289] :

$$(MCP / MCP_T) \times 100$$

MCP : Moyenne de charge parasitaire/ puits, T : Témoin négatif.

2.7.3.4. Test de réduction des sels de Tétrazolium en Formazan (MTT)

Le principe de ce test est basé sur détermination de la viabilité cellulaire qui est évaluée sur la capacité des cellules à transformer le sel de tétrazolium en bleu formazan au niveau mitochondrial par la succinate déshydrogénase.

Juste après la fin d'incubation ; 50ul de solution de MTT (10mg/ml) est rajoutée à chaque puits, et les microplaques sont incubées à 37C° et de 5% de CO₂ pendant 04 heures : Le MTT (de couleur jaune) va être transformé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes en sel de Formazan (de couleur bleu). 100 ul de l'isopropanol (0.4N HCl) sont rajoutés par la suite à chaque puits pour arrêter la réaction, et laissés agir pendant 30 min à 37C°et à 5% de CO₂, après ce temps la densité optique de chaque puits est mesurée à 550 nm à l'aide d'un lecteur des microplaques (BIOTEK ELx800) (Figure 2.13). Les densités optiques des puits contenant que les extraits (bruit fond) sont ignorées ; en négligeant l'effet optique de la coloration de chaque extrait. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir de cette formule selon [290], [291]:

$$[(DOT-DOE)/DOT] 100$$

DOT : Densité optique du contrôle, DOE : Densité optique des cellules+ extrait.

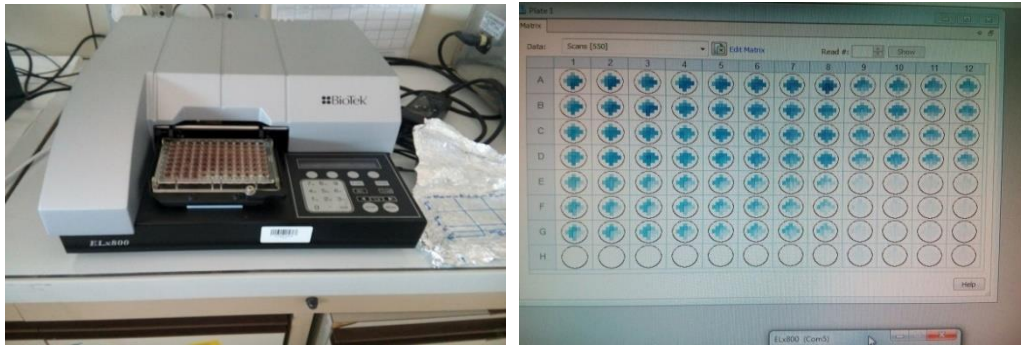


Photo 2.13 : Lecture des microplaques (Originale)

2.7.4. Test de cytotoxicité *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire leucémique ; *Thp1*

2.7.4.1. Culture des cellules, et préparation de la solution mère

Les *Thp1* (Figure 2.14) sont incubées à l'étuve à 37°C avec 5% de CO₂ dans des flacons à 25 cm² dans le milieu de culture RPMI1640, additionné de 10 % de sérum de vœu foetal inactivé (SVF), de 100 UI/ml de Pénicilline, et de 100 ug/ml de Streptomycine. Après 48 heures d'incubation, les suspensions cellulaires sont retirées et centrifugées à 20°C pour 10 min /2000trs, et les culots sont ajustés à 5.10⁵ C/ml. 20 ul de la solution enzymatique PMA/RNA later (Phorbol mérystate acetate) est rajoutée pour chaque 20ml de solution cellulaire à 5.10⁵ C/ml. 100 ul de cette suspension sont déposés par la suite dans des puits d'une microplaque à fond plats de 96 puits, et incubées dans les mêmes conditions [292].

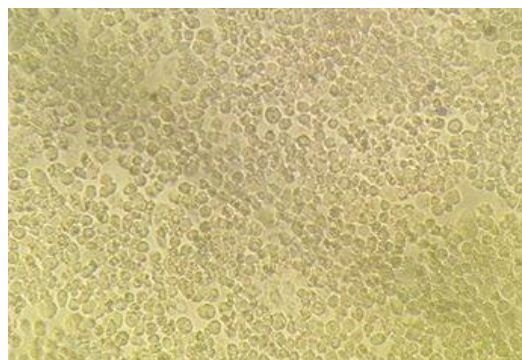


Photo 2.14 : *Thp1* cultivées après 48 h (20x 0.4) (Originale)

2.7.4.2. Préparation des doses et mise en culture

Après 48 heures d'incubation des microplaques contenant les monocytes *Thp1*, les suspensions de chaque puits sont jetées, et lavées avec 100 ul de RPMI1640. 100 ul de chaque concentration de l'EE-F, l'EEP-F (12.5, 25, 50, et 100 ug/ml à 0.5% de DMSO), et l'EA-F (50, 100, 200, 400 ug/ml) sont ensuite déposés sur les puits contenant les cellules de *Thp1* à raison de quatre répétitions pour chaque concentration de chaque extrait. Des études préliminaires de l'effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération normale des *Thp1* sont réalisées dans les mêmes conditions (Test de contrôle). Les microplaques sont incubées encore une fois à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48h. Après l'incubation les puits sont lavés par 100 ul de solution tamponnée PBS.

2.7.4.3. Test de l'inclusion par le bleu de TRYPAN à 0.4%

100 ul du PBS sont jetés, et 50 ul du colorant est rajouté au puits et laissé pendant 05 min (Figure 2.15). Dans ces conditions ; les cellules vivantes seront brillantes ; celles qui sont mortes incorporent du bleu de TRYPAN et deviennent bleu. Les puits sont lavés deux fois par 100 ul de PBS, les microplaques sont observées sous microscope inversé (20x0.4); et les cellules vivantes et morte sont comptées par le logiciel Image J 1.38 e. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule suivante [292] :

$$\frac{[\text{Nbr de CVC} - \text{Nbr CE}]}{\text{Nbr CVC}} \times 100$$

Nbr : Nombre, *CV* : Cellules vivantes, *CE* : Cellules avec extrait.

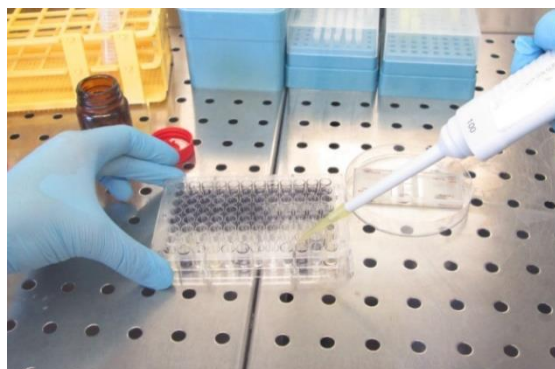


Photo 2.15: Coloration des puits par le bleu de Trypan à 0.4% (Originale).

2.7.4.4. Test de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT

100 µl du PBS sont jetés, et 10µl de MTT (10mg/ml) sont rajoutés à chaque puits; les microplaques sont bien agitées (08 min) et incubées par la suite pendant 4 heures à 37°C et 5% de CO₂. Le MTT (de couleur jaune) va être transformé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes en sel de Formazan (de couleur bleu). La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 µl d'isopropanol (0.4N HCL) à 20% de sulfate dodécyl de sodium. Une lecture par un lecteur des microplaques à 550 nm des densités optiques de tous les puits est réalisée après 30 mn d'incubation. Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante [293]:

$$\frac{[(DOT-DOE)/DOT] \times 100}{}$$

DOT : densité optique du contrôle, DOE : densité optique des cellules+ extrait.

2.7.5. Activité antimicrobienne *in vitro* de L'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

2.7.5.1. Souches microbiennes

Le support bactérien est constitué de dix souches bactériennes de référence sous forme de lots "American Type Culture Collection" ATCC et "Collection de l'institut de Pasteur Paris" CIP : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Salmonella paratyphi* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 2035, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus ceureus* ATCC 10876, *Micrococcus leuteus* ATCC 533, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et *Listeria monocytogenese* CIP 78-38.

Le support fongique est constitué de quatre souches fongiques de référence sous forme de lots "American Type Culture Collection" ATCC : *Candida albicans* ATCC 24433, *Saccharomyces sereviciae* ATCC 4226, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus flavus* ATCC 9643, et deux types de champignons isolés à partir de matière végétale : *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium digitatum* et identifiés au niveau de Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Blida.

Toutes les souches microbiennes ont été choisies par leurs fréquences élevées de contamination et leur pathogénicité dominante (Tableau 2.5).

Tableau 2.5: Souches microbiennes testées et leurs provenances :

Souches	Forme	Gram	Code	Provenance	
<i>Escherichia coli</i>	Bacille	-	ATCC 25922	Laboratoire de Contrôle Microbiologique du groupe SAIDAL-MEDEA	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacille	-	ATCC 4352		
<i>Salmonella paratyphi</i>	Bacille	-	ATCC 14028		Laboratoire Algérien de Médicament 'LAM' ; TIPAZA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	-	ATCC 27853		Laboratoire de Contrôle Microbiologique du groupe SAIDAL-MEDEA
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacille	+	ATCC 9372	Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé- Département de Biologie- Université de Blida	
<i>Bacillus ceureus</i>	Bacille	+	ATCC 10876		
<i>Micrococcus leuteus</i>	Cocci	+	ATCC 533		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	+	ATCC 6538	Laboratoire de Contrôle Microbiologique du groupe SAIDAL-MEDEA	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocci	+	ATCC 2035	Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé- Département de Biologie- Université de Blida	
<i>Listeria monocytogenese</i>	Cocci	+	CIP 78-38	Institut Pasteur d'Algérie IPA	
<i>Candida albicans</i>	Ovoïdes	/	ATCC 24433	Unité de Bactériologie de Laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Blida	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Mycélium	/	/		
<i>Penicillium digitatum</i>	Mycélium	/	/		
<i>Saccharomyces sereviciae</i>	Ovoïdes	/	ATCC 4226		
<i>Aspergillus flavus</i>	Mycélium	/	ATCC 9643		
<i>Aspergillus niger</i>	Mycélium	/	ATCC16404		
<i>Escherichia coli</i> 'BLSE'	Bacille	-	Souche hospitalière	Service de Diabétologie (EPH de Blida)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 'BLSE'	Bacille	-	Souche hospitalière		
<i>Acenitobacter baumannii</i> 'BLSE'	Coccobacille	-	Souche hospitalière		
<i>S. aureus</i> 'MRSA'	Cocci	+	Souche hospitalière		

2.7.5.2. Milieux de culture

Les géloses utilisées sont : le milieu de conservation, le milieu PGT (Bouillon glucosé tamponné), le milieu cœur cerveau, la gélose nutritive, et le saboureaud +chloramphénicol (IP d'Alger), la gélose au sang à 5% (Idéal labo- Blida), la gélose PALCAM (Bio Mérieux-France), et la gélose MULLER HINTON simple et additionnée au sang à 5% (IP d'Alger).

2.7.5.3. Enrichissement, préparation des cultures jeunes,

Les souches conservées sont enrichies dans des milieux liquides d'enrichissement, incubés à l'étuve. Après l'incubation les tubes sont retirés, repiqués sur gélose et ré incubée encore une fois à l'étuve, les cultures obtenues dites cultures jeunes seront utilisées pour les préparations d'inoculum microbien. Les conditions de l'incubation et les milieux utilisés sont appropriés pour chaque souche microbienne.

2.7.5.4. Test antimicrobien par la méthode de diffusion de disque sur gélose

L'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits de feuilles de *C.parqui* par l'aromatogramme, a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon [294]; en suivant les recommandations de [295] (National Comite For Clinical Laboratory Standard), et [296]. Les tests ont été effectués au niveau du Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Blida.

a. Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, racler 2 à 3 colonies bien isolés et identiques à partir d'une culture pure et jeunes sur milieu d'isolement,
- Diluer le contenu de la pipette dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %,
- Mesurer la densité optique de l'inoculum par un densitomètre DEN-1 (Grant-Bio) (Figure 2.16),il faut noter que l'inoculum bactérie peut être ajusté à 0.5 McFarland en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort, et il doit êtreensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.



Photo 2.16 : Densitomètre (Originale).

b. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée (inoculum).
- L'essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, à la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur périphérique de la boîte de Pétri. Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes.

c. Doses et application des disques d'antibiotiques

La technique repose principalement sur le dépôt à l'aide de micropipette de 50 µl de deux concentrations de l'EE-F et l'EEP-F (20 et 100 mg/ml) dessous dans le DMSO (SIGMA-AULDRICH-Germany), et l'EA-F à 5,10 et 20 % dessous dans l'eau distillée (Figure 2.17, Tableau 2.6) stérile sur les disques de 09mm (Biorad-France), et les déposés sur les géloses appropriées. Les essais sont répétés trois fois, avec des témoins positifs (antibiotiques et antifongiques de référence dilués dans l'eau distillée stérile) et négatifs (DMSO : Diméthylsulfoxyde, et l'eau distillée stérile ; solvants de dilutions).

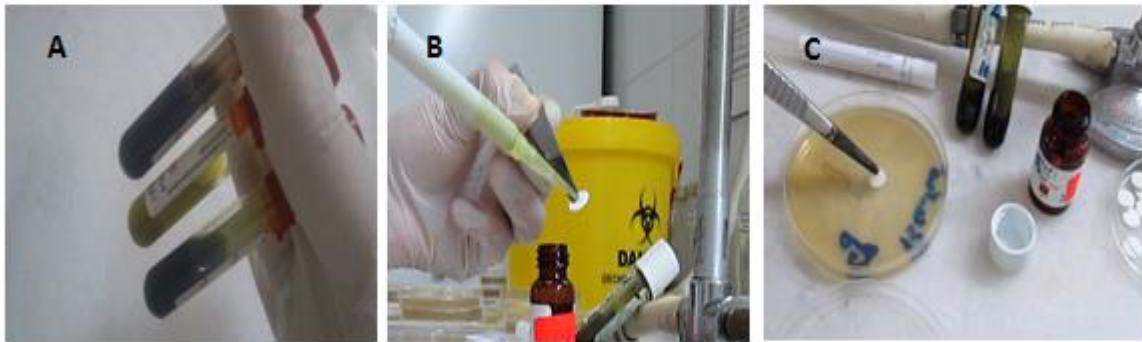


Photo 2.17 : A : solutions mères des extraits, B, C : Dépôt des disques sur la gélose (Originale).

Tableau 2.6 : Répartition des doses des différents produits testés :

Extrait/ Produit	[C] mg/ml	[C] mg/dis.	Solvant de dilution	[V] ul / dis.	Souches testées
EE-F	20	1	DMSO	50	Toutes les souches
	100	5	DMSO	50	Toutes les souches
EEP-F	20	1	DMSO	50	Toutes les souches
	100	5	DMSO	50	Toutes les souches
EA-F	50	2.5	E.D.S.	50	Toutes les souches
	100	5	E.D.S.	50	Toutes les souches
	200	10	E.D.S.	50	Toutes les souches
Ciprofloxacine	2	0.1	E.D.S.	50	Bactéries
Céfazoline	10	0.5	E.D.S.	50	Bactéries
Métronidazol	5	0.25	E.D.S.	50	Levures+ Champignons
Amphotéricine B	10	0.5	E.D.S.	50	Levures+ Champignons
DMSO	/	/	/	50	Toutes les souches
E.D.S.	/	/	/	50	Toutes les souches

d. Lecture et interprétation

Les zones d'inhibition autour des disques sont mesurés avec un pied à coulisse (en mm) ; après une incubation de 24 heures à 30°C pour la *Listeria monocytogenese* , à 37°C pour les autres bactéries, pendant 48 heures à 25°C pour les levures (*C.albicans* et *S.cereviceae*), et cinq jours à 30°C pour les moisissures (*A.niger* et *A.braziliensis*).

2.7.6. Activité antioxydante *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

2.7.6.1. Méthode de piégeage du radical libre ; le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH)

2.7.6.1.1. Principe

Le diphényle Picryl-Hydrazyle (DPPH) (Figure 2.18), un radical libre stable, en présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH [297].

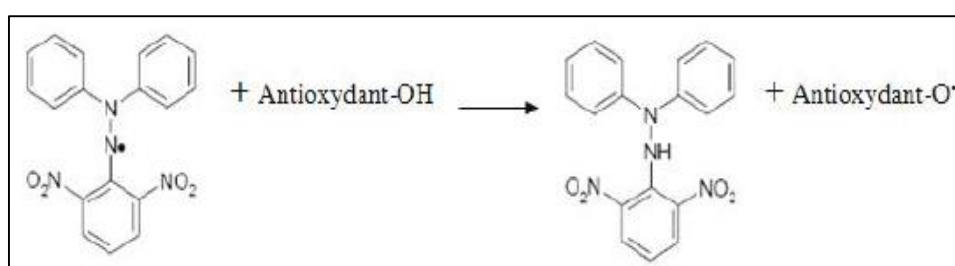


Figure 2.18: Formes réduite et oxydée de DPPH [298].

2.7.6.1.2. Préparation des solutions

a. Solution de DPPH

Nous solubilisons 3.94 mg de DPPH dans 100 ml de l'éthanol absolu pour obtenir une solution à DPPH de 0.1mM. La solution est bien mélangée et laissée pendant une heure sous agitation à température ambiante et conservée après à l'abri de la lumière [299].

b. Concentrations des extraits, et des témoins positifs

3 g de l'EE-F et l'EEP-F de feuilles de *C.parqui* sont mis dans 1 ml de l'éthanol absolu, le mélange est laissé sous agitation pendant 30 mn, à partir de cette concentration de solution mère (SM) ; six dilutions de l'ordre du ug/ml de chaque extrait sont préparées (3000,2400, 1800, 1200, 600, et 300 ug/ml). Pour l'extrait aqueux ; 2.5 g de l'EA-F sont mis en infusion dans 100 ml de l'eau distillée stérile

(SM), six concentrations de l'ordre du mg/ml de l'E.D.S. sont préparées à partir de cette solution mère (25, 10, 5, 1,0.5, 0.25 mg/ml).

Pour les témoins positifs ; 0.5 mg de la vitamine C (alpha tocophérol) et de l'acide gallique sont dilués dans 1 ml de l'éthanol absolu ; à partir de cette préparation des dilutions de l'ordre du ug/ml sont préparées (75, 50, 25, 10, 05,2.5 ug/ml) (Tableau 2.7).

Tableau 2.7: Concentrations des différents produits et nature des solutions de dilutions :

Produit	Solution de dilution	Solution mère mg/ml	[] ug/ml des dilutions
EE-F	Ethanol absolu	3000	3000
			2400
			1800
EEP-F			1200
			600
			300
EA-F	E.D.S.	25	25000
			10000
			5000
			1000
			500
			250
Tocophérol	Ethanol absolu	0.5	75
			50
			25
Acide gallique			10
			05
			2.5

2.7.6.1.3. Mise en contact avec le radical libre ; DPPH

Dans chaque tube à hémolyse sec et stérile, on introduit 1.5 ml de la solution de DPPH à laquelle on ajoute 500ul d'une concentration de l'échantillon à tester. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante de 25°C pendant 30 min d'incubation [299]. Pour chaque concentration, le test est réalisé en 3 répétitions successives.

Pour chaque série on prépare un blanc constitué de 1.5 ml de la solution de DPPH additionné de 500ul de l'éthanol. Quel que soit le témoin positif utilisé, sa

préparation et son expérimentation sont identiques à celles des autres échantillons.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

2.7.6.1.4. Expression des résultats

L'activité antioxydante est donnée par le pourcentage de l'inhibition des radicaux libres de DPPH (A%) par la formule suivante [299] :

$$A\% = [(A0 - At) / A0] 100$$

A0: L'absorbance du blanc
At: L'absorbance de l'échantillon.

La détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux appelée CI50 (concentration inhibitrice de 50 %) ou CE50 (Efficient concentration 50) est effectuée ; en traçant pour un échantillon donné la courbe (régression linéaire) A% en fonction de la concentration puis on détermine la concentration correspondant à A% = 50 [300], et [301].

2.7.6.2. Méthode de réduction de fer ferrique ; FRAP (ferric reducing antioxidant power)

2.7.6.2.1. Principe

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits de feuilles de *C.parqui* à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en Fer ferreux (Fe²⁺) (Figure 2.19). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols [302].

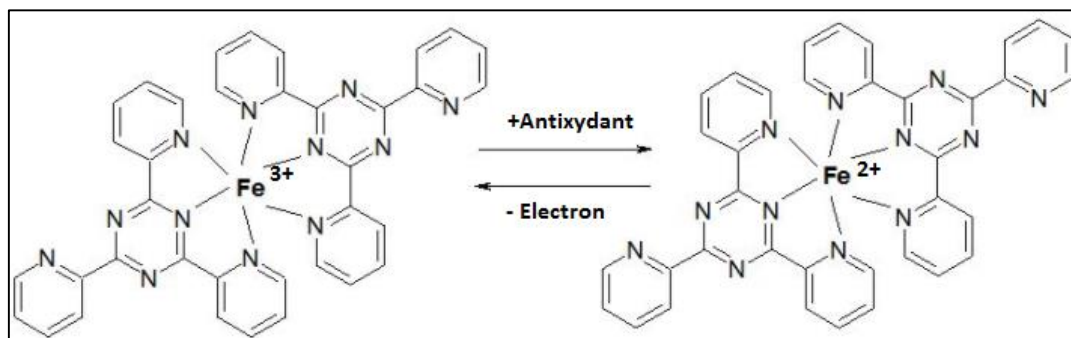


Figure 2.19 : Forme réduite et oxydée de Fer ferrique [303].

2.7.6.2.2. Préparation des solutions

2.7.6.2.2.1. Concentrations des extraits, et les témoins positifs

Les concentrations testées des trois extraits ainsi celle des témoins positifs sont les mêmes que ceux de test de piégeage de DPPH (Tableau 2.7).

2.7.6.2.2.2. Mise en contact avec les solutions réactionnelles

Cette étape consiste à mélanger 1 ml de chaque extrait à différentes concentrations avec 2.5 ml de tampon phosphate (0.2M, pH=6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1% (m/v). Le mélange ainsi obtenu est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2.5ml d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.

Le mélange est centrifugé à 3000 t/10min à température ambiante, 2.5 ml du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée stérile et 0.5 ml de chlorure de Fer ($FeCl_3$) à 0.1%.

L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm [299]. La même méthode est utilisée pour tester le pouvoir antioxydant des témoins positifs antioxydant synthétiques (Témoins positifs).

2.7.6.2.3. Expression des résultats

L'augmentation de l'absorbance mesurée à 700 nm dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. La concentration CE50 qui est définie comme étant la concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives [304].

2.7.7. Activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'EE-F, L'EEP-f, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

L'activité anti-inflammatoire est réalisée sur des souris males dans des conditions de contrôle optimales afin d'assurer une expérience conforme aux normes exigées (Tableau 2.8).

2.7.7.1. Matériel animal

Tableau 2.8 : Animaux et conditions contrôlées de l'animalerie

CONDITIONS DES LOCAUX	
Température	23-25°C ±2
Taux d'humidité	(30%-70%)
Eclairage	Artificiel 12/12h
ANIMAUX	
Espèce	Souris
Race	Souche couramment utilisée en laboratoire ; NMRI
Sexe	Males.
Age et poids	8-12 semaines, un poids doit se situer à l'intervalle de 20% par rapport au poids moyen des animaux du même lot
Alimentation	Nourriture (ONAB : Office national d'aliment de bétail – Bejaïa), l'eau potable

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (On supprime la nourriture, mais pas l'eau), pendant 3 à 4 heures. Après la période de jeune, les souris doivent être pesées puis gavés. Après l'administration de la substance, les animaux sont à nouveau privés de nourriture, pendant 1 à 2 heures.

2.7.7.2. Principe

L'activité antiinflammatoire *in vivo* sur souris par le test de *LEVY* a été évaluée selon la méthode de [305], sur la base de la réduction de l'œdème plantaire induit par la carragénine (mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue marine).

L'injection de la carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte de souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après l'administration orale des doses de l'EE-F, l'EEP-F (400 et 200 mg/kg *c.p.*), et l'EA-F (10 et 20%) et les produits de référence correspondants ; le Diclofénac sodique et l'Hydrocortisone à 3mg/kg *c.p.* et 1mg/kg *c.p.* respectivement.

2.7.7.3. Préparation et administration des doses

a. Préparation des doses

La préparation des doses de tous les produits utilisés est en fonction du poids corporel des souris juste avant l'expérimentation :

- Répartir les animaux au hasard dans les cages à raison de six souris mâles par lot,
- Peser chaque souris sur une balance, et la marquer par un numéro (queue),
- Calculer la moyenne des poids des souris de chaque lot,
- Calculer le volume de chaque produit correspond à la moyenne de poids des souris de chaque lot,
- Multiplier le volume calculé par 3ml, pour avoir la quantité suffisante pour 06 souris de chaque lot.

b. Administration des doses

Treize lots de six souris de sexe mâle ont été utilisés.

Au temps 0 : les deux premiers lots : les souris ont reçu 0.5 ml d'eau distillé stérile et l'huile de maïs comme des produits témoins négatifs, les animaux du troisième et quatrième lot ont reçu 0.5 ml des suspensions des substances antiinflammatoires de contrôle (Diclofénac de sodium à 3 mg/kg *c.p.*, et l'hydrocortisone à 1 mg/kg *c.p.*, le cinquième, le sixième, et le septième lots: les sujets ont été injectés par l'extrait aqueux à 5 % ,10 et 20%, les six derniers lots les souris sont gavées par 0.5 ml de l'EE-F et l'EEP-F à 50, 200 et 400 mg/kg *c.p.* (Tableau 2.9).

Au temps 0 + 30 mn : tous les animaux mis en expérience ont été injecté avec 0.025 ml de solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche à l'aide d'une microseringue.

Au temps 0+ 4 heures : les animaux sont sacrifiés par rupture de nuques, les pattes postérieures sont coupées à la hauteur de l'articulation et pesées sur une balance de précision (Figure 2.20 et 2.21).

Tableau 2.9 : Répartitions des doses des produits testés entres les différents lots

N° de lot	Nbr de souris	Sexe	Produit administré	Solvant de dilution	Dose de produit
01	06	Mâle	/	Eau D.S.	/
02	06	Mâle	/	Huile de maïs	/
03	06	Mâle	DIC	Eau D.S.	/
04	06	Mâle	HHC	Eau D.S.	/
05	06	Mâle	EA-F	Eau D.S.	50mg/ml
06	06	Mâle	EA-F	Eau D.S.	100mg/ml
07	06	Mâle	EA-F	Eau D.S.	200mg/ml
08	06	Mâle	EE-F	Eau D.S.	50 mg/ml
09	06	Mâle	EE-F	Eau D.S.	200mg/kg <i>c.p.</i>
10	06	Mâle	EE-F	Eau D.S.	400 mg/kg <i>c.p.</i>
11	06	Mâle	EEP-F	Huile de maïs	50 mg/kg <i>c.p.</i>
12	06	Mâle	EEP-F	Huile de maïs	200 mg/kg <i>c.p.</i>
13	06	Mâle	EEP-F	Huile de maïs	400 mg/kg <i>c.p.</i>

Après avoir calculé les moyennes arithmétiques des poids des pattes coupées gauches et droites, le pourcentage d'augmentation de poids des pattes est calculé par la formule suivante [305] :

$$\frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{Moyenne des poids de patte droite}}{\text{Moyenne des poids de patte droite}} \times 100$$

Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins est exprimé selon la formule ci-après :

$$\frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

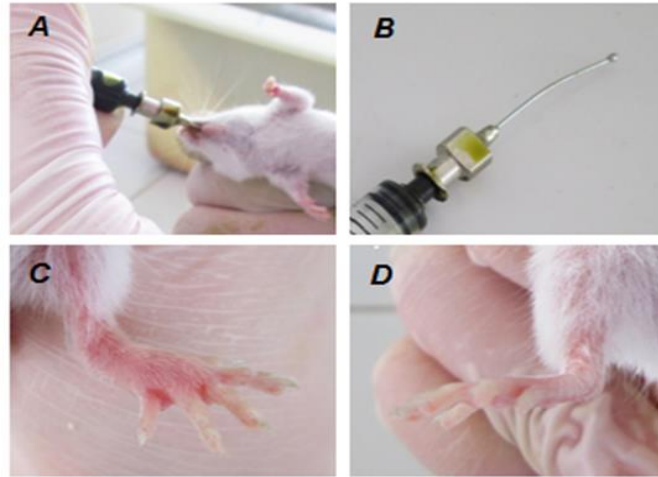


Photo 2.20 : Gavage des souris et formation de l'œdème de patte (Originale).

A : Gavage d'une souris par l'EE-F, B : Sonde de gavage placée à une seringue de 2.5 ml
C : Pattes gauche injectée par la carragénine, D : Patte droite témoin.

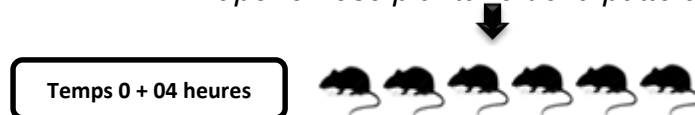
01. Six souris à jeun pesées juste avant l'expérimentation.



02. Administration orale de 0.5 ml de chaque concentration de chaque produit à analyser.



03. Injection des souris par 0.025 ml de solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche.



04. Les six souris sont sacrifiées par rupture de nuques.



05. Les pattes postérieures sont coupées à la hauteur de l'articulation et pesées sur une balance de précision.

Figure 2.21: Schéma détaillant les différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire [305].

PARTIE 03

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique

Notre enquête est répartie en trois étapes ; la première concerne les renseignements personnels de la population qui a participé à cette démarche, alors que la deuxième repose sur leurs connaissances sur la phytothérapie. La troisième partie est destinée vers la nature des informations acquises sur le *Cestrum vert*.

3.1.1. Résultats de l'enquête : Données personnelles

Cents vingt (120) personnes interrogées ont répondu à un questionnaire d'une enquête de 32 questions variées (ANNEXE 04) ; dont le choix des personnes est effectué au hasard ; et les réponses multiples pour une seule question a été autorisé. Les informations obtenues suite à cette partie sont représentées dans les figures 3.1, 3.2, et 3.3.

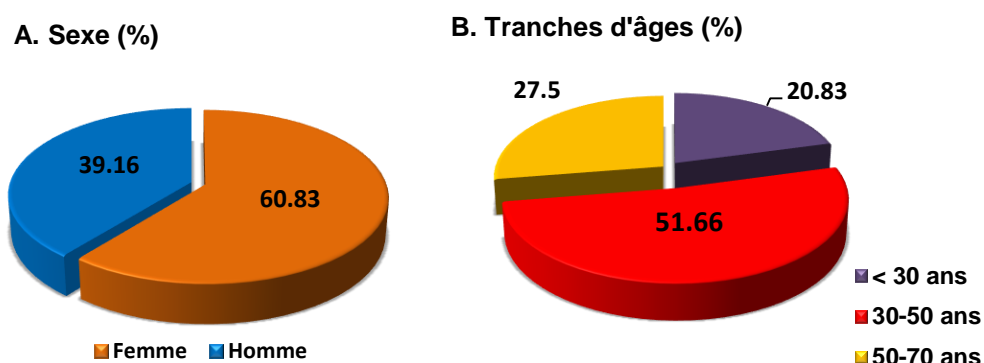


Figure 3.1 : Pourcentage de répartition des personnes : A : Selon le sexe, B : Selon l'âge.

La répartition des personnes selon le sexe a montré globalement une forte prédominance de femmes (60.83%) par rapport aux hommes (39.16%) ; alors que les personnes âgées de 30 à 50 ans sont les plus dominants avec 51.66% de l'ensemble des personnes : Les formulaires de l'enquête sont pris au sérieux par

les femmes surtout celles qui sont au foyer ; car le nombre des copies distribuée entre les deux sexes été à un nombre égale.

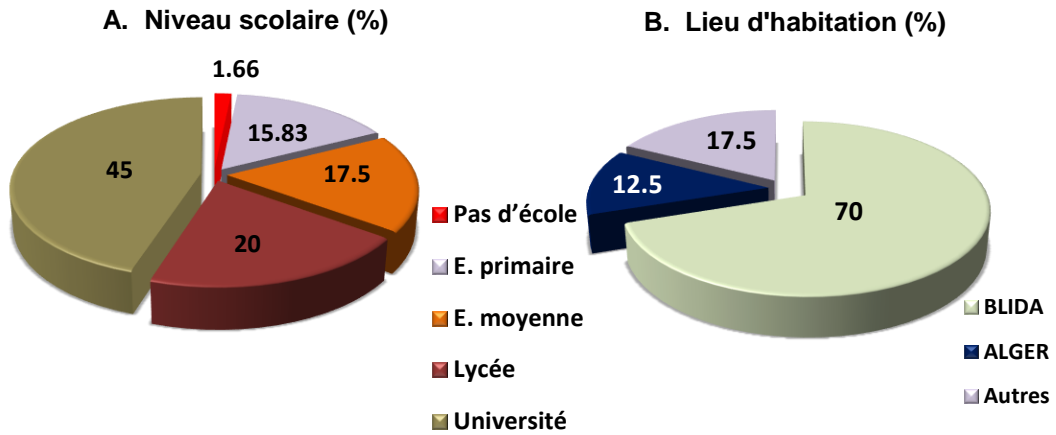


Figure 3.2 : Pourcentage de répartition des personnes : A : Selon le niveau scolaire, B : Selon la région.

Selon la figure 3.2, le niveau universitaire est le niveau le plus dominant avec un pourcentage de 45%, justifiant que les personnes à ce niveau sont les plus sensibilisées et qui ont une accessibilité importante sur ce genre d'information. La Wilaya de Blida est la zone principale de notre étude ; ce qui a donné un pourcentage très élevé (70%).

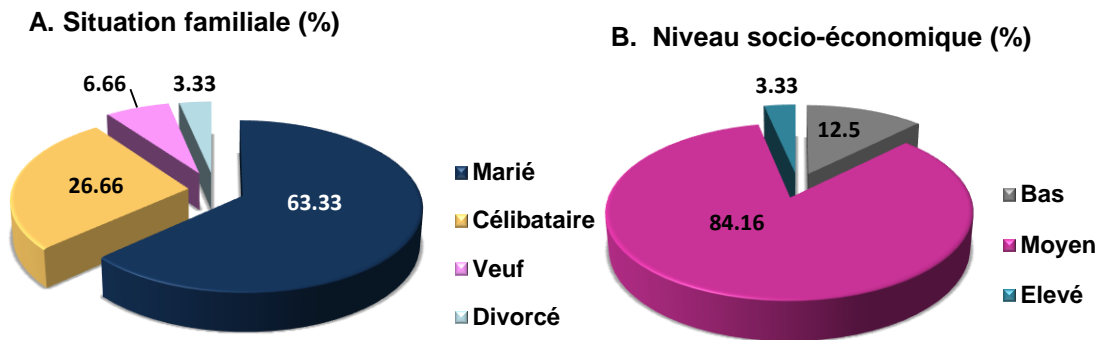


Figure 3.3 : Pourcentages des répartitions des personnes selon la situation familiale (A), et selon le niveau socio-économique (B).

D'après les résultats illustrés par la figure 3.3, nous avons constaté que le niveau socio-économique moyen est le niveau de vie le plus répartis (84.16%) ; bien que les personnes mariées sont les personnes les plus notées (63.33%).

3.1.2. Résultats de la deuxième partie de l'enquête : La phytothérapie

La figure 3.4 (A et B) montre que toutes les personnes interrogées connaissent la phytothérapie, qui est très populaire que ces gens ont entendu et/ou ont déjà étaient soigné par cette médecine alternative.

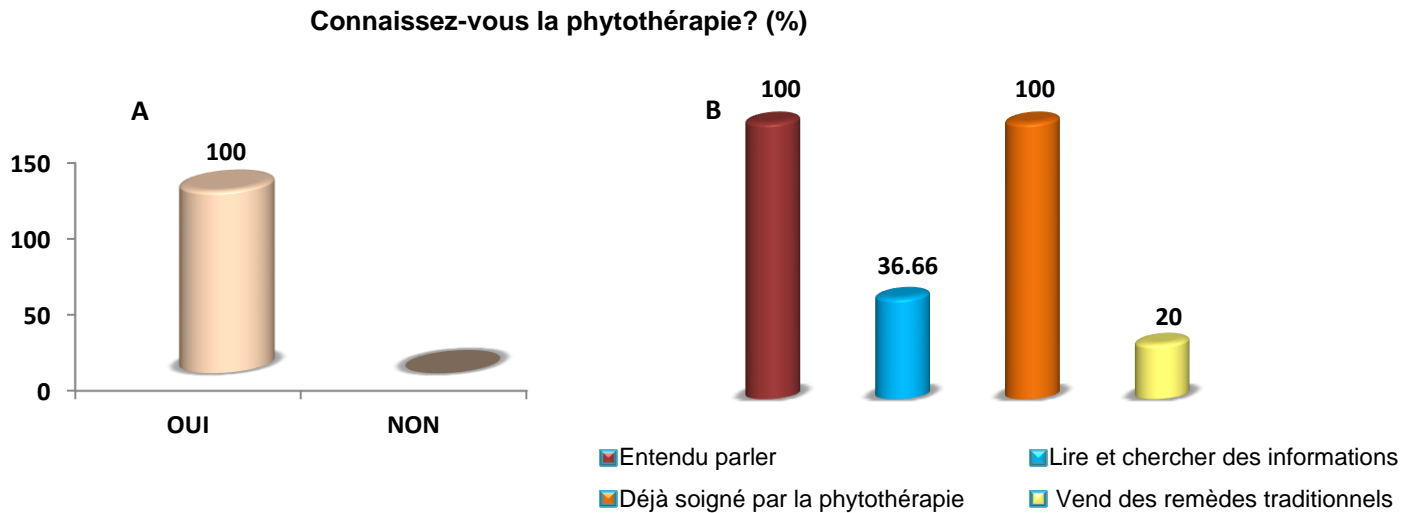


Figure 3.4 : Connaissance de la phytothérapie.

Parmi les 120 personnes interrogées, 81.66 % ont eu recours souvent à la phytothérapie pour leurs premiers soins sans demander l'avis soit d'un médecin soit d'un herboriste (Figure 3.5). Nous pouvons constater que la plus part des personnes croient en la fiabilité de la phytothérapie comme un moyen de guérison en première attention. Ce résultat est en concordance avec celui de l'OMS, qui annonce que 80% de la population Africaine dépend de la médecine traditionnelle [306].

Les résultats présentés dans la figure 3.6 indiquent que toutes les générations de la population algérienne font confiance absolue aux remèdes de la nature, dès la naissance de leurs enfants (61.66%) (Figure 3.6).

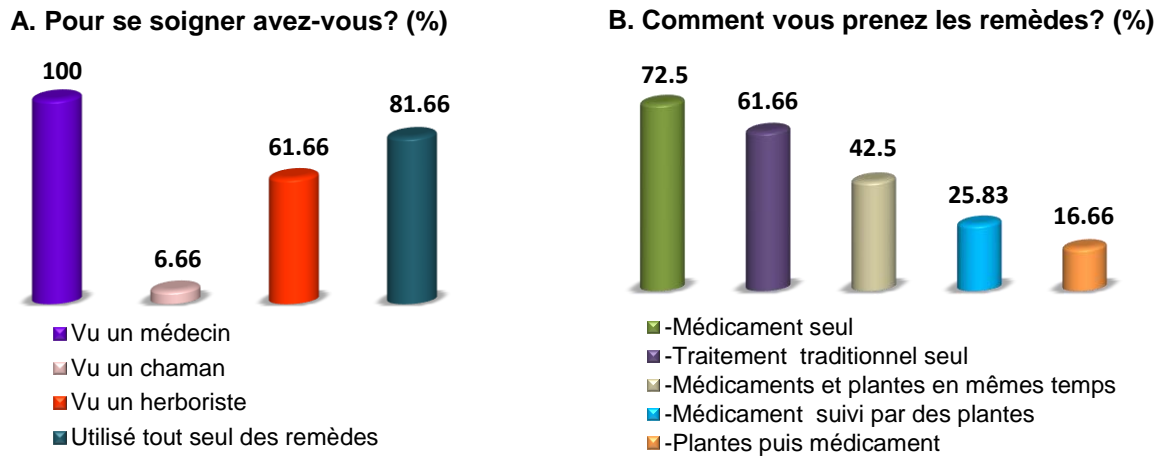


Figure 3.5 : Utilisation des remèdes traditionnels ; A : la nature de maitre soignant, B : l'association ou non avec les médicaments conventionnels.

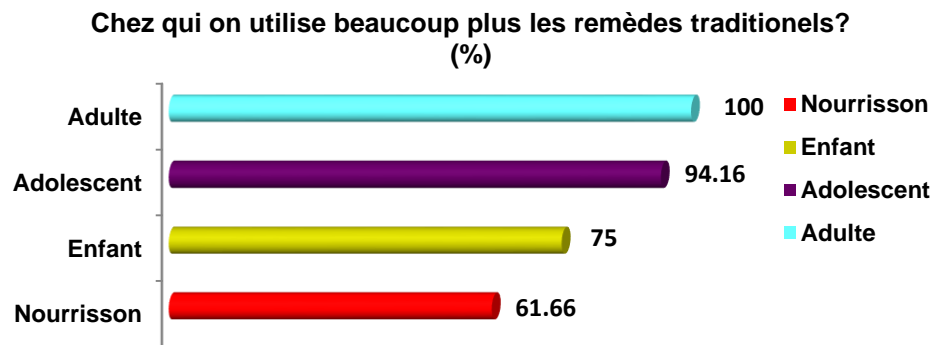


Figure 3.6 : Type de générations d'âge.

La figure 3.7. (A et B), montre que la majorité des personnes interrogées connaissent les vrais procédures initiatives de récolte ; avec des réponses de 72.5% pour les plantes cultivées ; car elles sont les mieux adaptées puisque elles sont plus contrôlées et sécurisées. 85% de ces personnes ont répondu qu'ils savent qu'il existe des conditions de récolte spéciales. Les conditions de récolte des plantes médicinales sont l'un des points les plus importants qui conditionnent la conformité du traitement traditionnel [307].

D'après la figure 3.8, L'enquête a révélé que la majorité des personnes préfèrent en première attention de se soigner par les feuilles et les fleurs (100%) ; on constate qu'ils ont comme même une connaissance de base que les substances actives de n'importe qu'elle plante se localisent principalement dans ces deux parties [308].

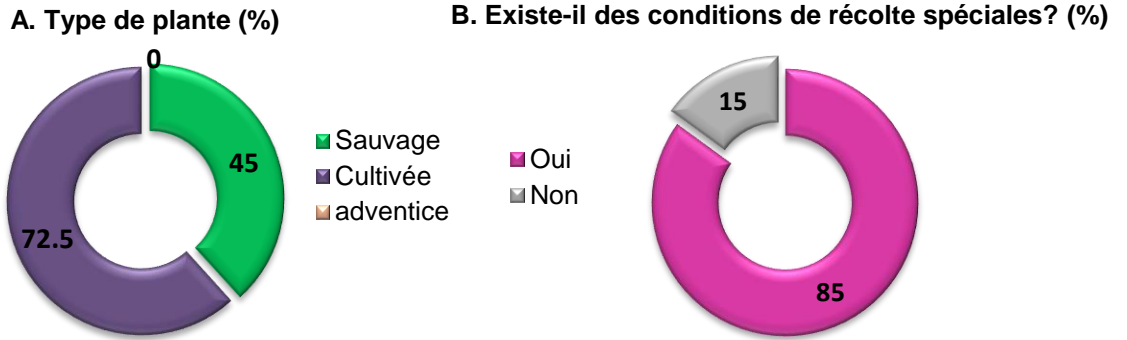


Figure 3.7: Pourcentage de répartition des réponses selon la nature des plantes récoltée (A) et les conditions de récolte (B).

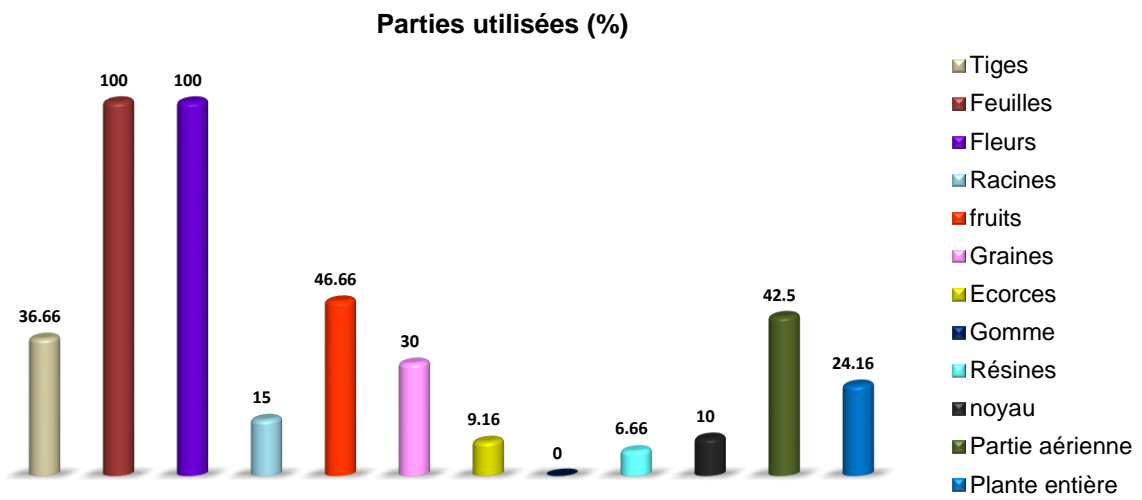


Figure 3.8 : Pourcentage de répartition des réponses selon les parties utilisées de la plante.

D'après la figure ci-dessous ; plus de 90% des personnes ont répondu que le séchage et le broyage de la matière végétale est indisponible pour extraire le produit actif de n'importe qu'elle plante [307].

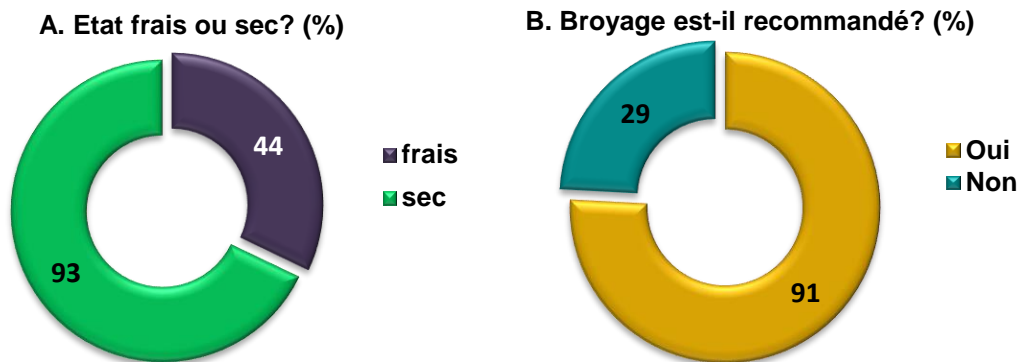


Figure 3.9 : Pourcentage de répartition des réponses selon la recommandation du séchage (A) et de broyage (B).

La figure 3.10 illustre que 77.5% des personnes déclarent que la période de six mois est la période la plus préférée (Figure 3.10). D'après [307] ; la durée de conservation des végétaux varie d'une plante à une autre et d'une méthode à une autre ; généralement la durée de 6 à 10 mois est la plus recommandée pour ne perdre les qualités organoléptiques et pharmacologiques du traitement.

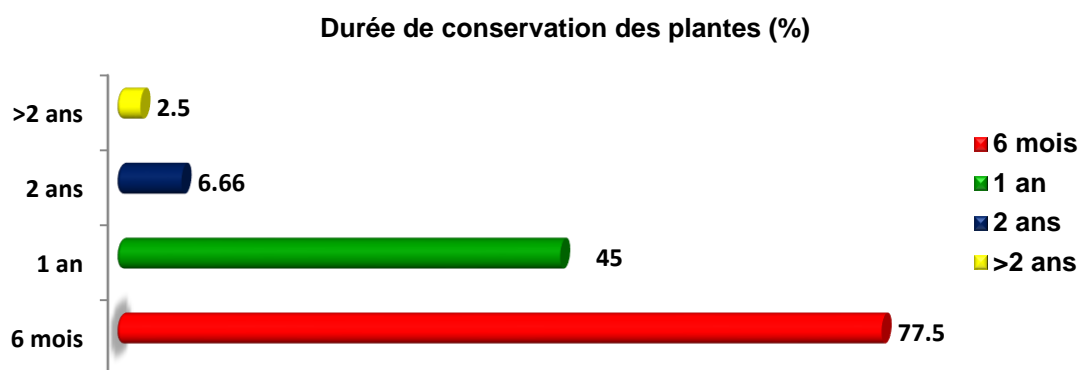


Figure 3.10 : Pourcentage de répartition des réponses sur la durée de conservation des plantes.

Concernant le mode de préparation des remèdes; la figure 3.11 (A et B) nous montre que l'infusion et la décoction sont les préparations les plus utilisées avec des pourcentages de 100% et 69.16% respectivement ; tandis que l'eau chaude et le miel sont les diluants les plus utilisés dans les préparations des remèdes avec un pourcentage de 100% et 92.5% respectivement. La préparation avec de l'eau chaude nous permis d'extraire une grande quantité de substances actives de n'importe quelle drogue ; le miel est aussi un bon conservateur des éléments thérapeutiques [308].

L'avis de la population interrogée sur les effets secondaires de la phytothérapie est fortement positif, plus que 80% des sujets pensent que la phytothérapie cause des effets secondaires (Figure 3.12. A). Ces personnes ont même avoué que son efficacité est assurée (35%), qu'elle améliore la qualité de vie et surmonte les limites de la médecine moderne (79.16%) (Figure 3.12. B).

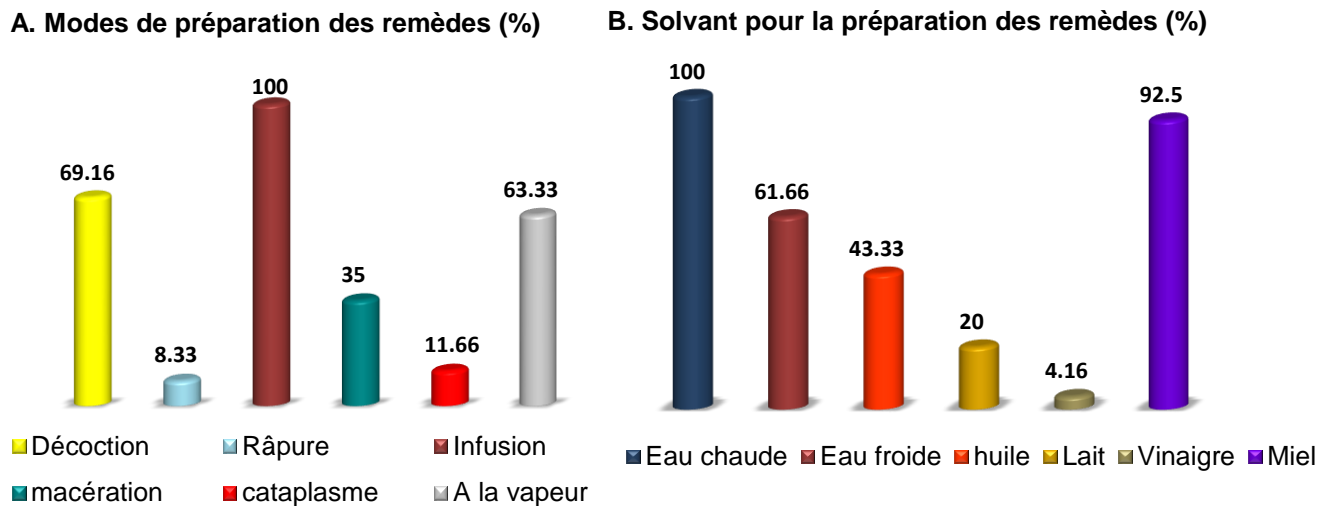


Figure 3.11 : Modes (A) et solvants(B) utilisés lors de la préparation des remèdes.

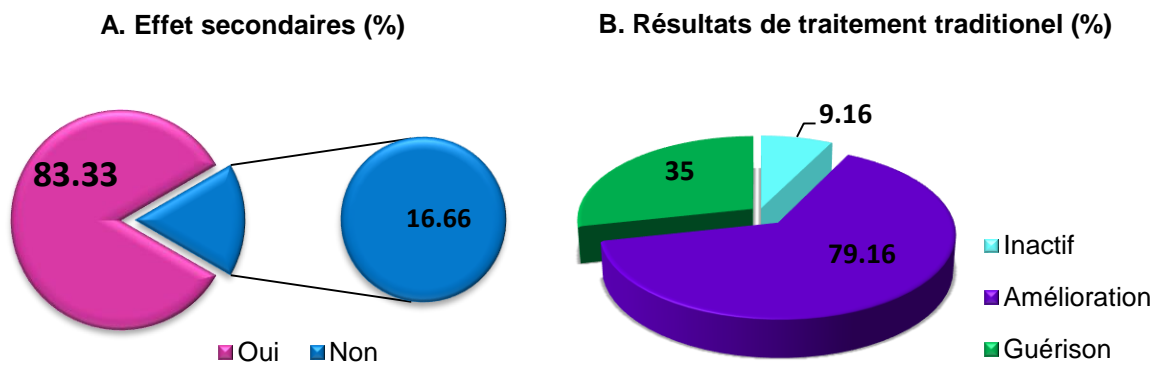


Figure 3.12 : Résultats du traitement traditionnel : A : Effet secondaire, B : Degrés de l'efficacité du traitement traditionnel.

3.1.3. Résultats de la troisième partie de l'enquête: Le *Cestrum parqui*

3.1.3.1. Résultats de questionnaire

Des taux de réponses positives ont dépassées les 60% (Figure 3.13 : A, B, et C) sur la connaissance de *C.parqui*, ce pourcentage confirme que cette plante est très populaire et très connu par la population questionnée principalement sous l'appellation de 'Mesk elile'.

D'après la figure 3.14 ; 44.16% des personnes interrogées pensent que le beau temps du printemps est la meilleure période de récolte de la plante ; vient par la suite l'été avec 36.66% qu'ils le voient comme bonne saison de récolte de *C.parqui*.

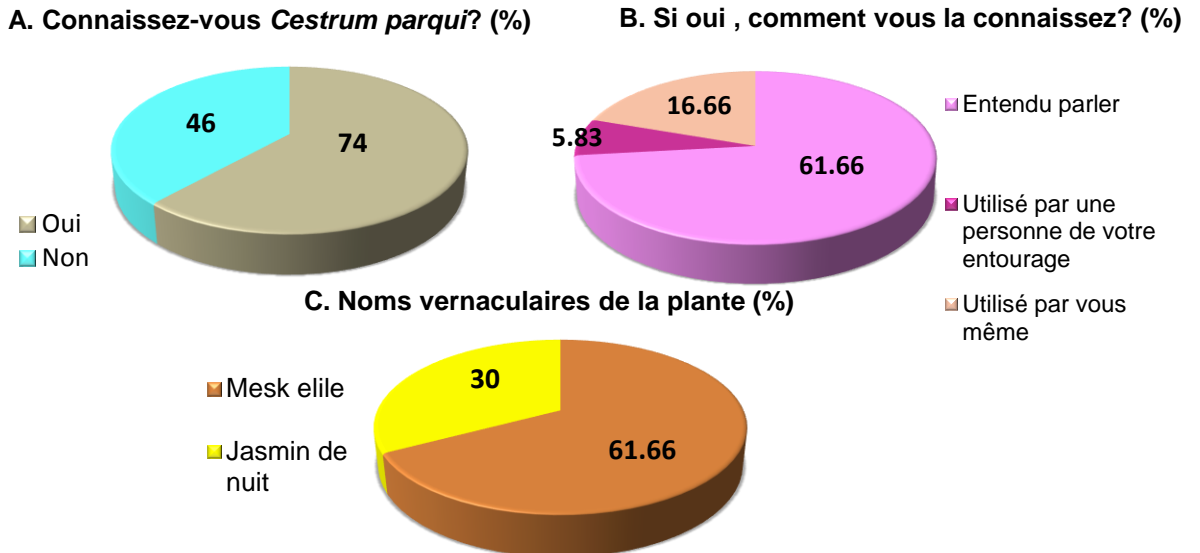


Figure 3.13 : Connaissances sur le *Cestrum parqui*.

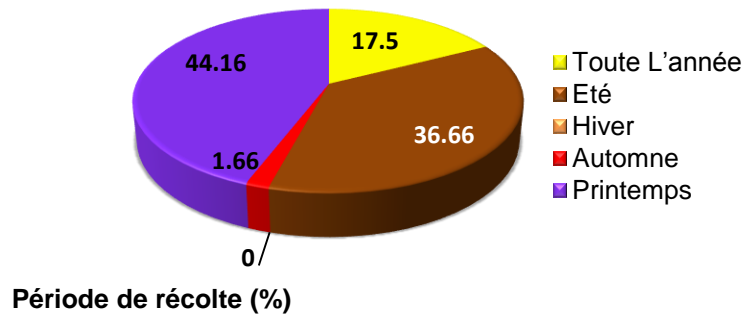


Figure 3.14 : Période de récolte de *C. parqui*.

Selon la figure 3.15 ; les feuilles de *C. parqui* sont la partie la plus utilisée avec un pourcentage de 46.66%, La partie des réponses restante se divise entre les fleurs et la partie aérienne. Les feuilles sont la partie la plus remarquée et la plus dominante dans cette plante ; donc les personnes se sont peut être basées sur l'hypothèse qui dit que la partie la plus abondante de la plante est la plus active thérapeutiquement.

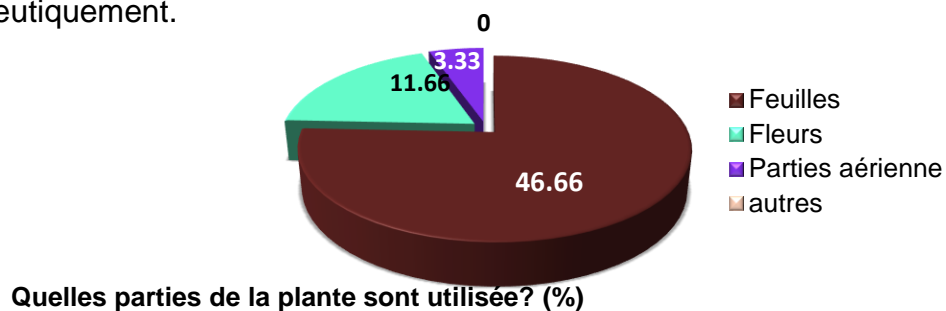


Figure 3.15 : Parties utilisées de *C. parqui*.

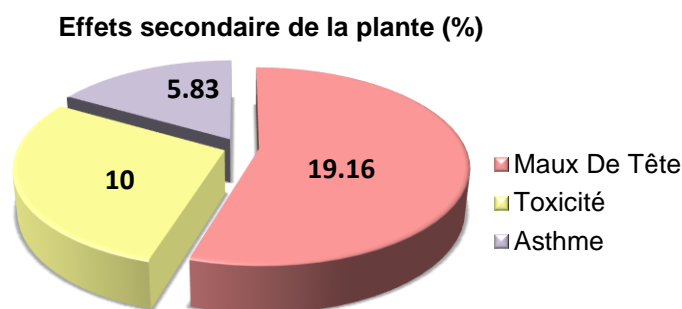


Figure 3.18 : Effets secondaires de *C.parqui*.

Les différentes investigations menées dans cette enquête ont permis de comprendre que les personnes interrogées en grande majorité utilisent les plantes pour se soigner avec les recettes des tradipraticiens. L'usage traditionnel des plantes médicinales constitue la base de la médecine tant préventive que curative. L'enquête ethnobotanique sert de trait d'union entre les deux médecines aussi bien traditionnelle que conventionnelle. Cette enquête est une étape indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de cibler la nature des drogues actives de *C.parqui* et leurs modes de préparation traditionnelle, ainsi les tests biologiques.

3.1.3.2. Résultats de la recherche bibliographique sur l'utilité traditionnelle de *C.parqui*

L'usage des différentes parties ou la plante entière du *Cestrum vert* est multidisciplinaire (Tableau 3.1) ; soit dans le côté médicale, alimentaire (hommes, animaux), l'environnement, sociologique, et pour les préparations des poisons [309]. Traditionnellement les différentes parties de *Cestrum parqui*, principalement les feuilles, les fleurs et le bois, sont couramment utilisées soit fraîches, soit comme infusion, décoction, jus, ou cataplasme [81], [310], [311], et [312]. Ces préparations sont utilisées contre la fièvre [81], [313], et [314], pour les maladies cutanées telles que les surinfections cutanées, les allergies, l'impétigo, et la lèpre [310], [311] et [315] contre les infections fongiques [316], [317], et [318], contre les infections bactériennes et virales [81], [310], et [311], comme antiparasitaire [319], contre l'inflammation [100], [320], [321] et [322], pour les problèmes digestifs et les infections intestinales [311], [312], [313], et [323] , contre les douleurs [320], [324], [325], et contre le cancer, [311] et [324].

Les Mapuche du sud du Chili utilisent le *Cestrum parqui* rituellement, lors de traitements curatifs chamaniques, depuis l'ère précolombienne. Cette plante a le pouvoir de résister aux attaques des sorciers ou des chamans noirs ; ses feuilles séchées sont fumées ou brûlées comme de l'encens. Le thé des feuilles est pris pendant les rituels et les cérémonies pour éviter la peur et l'influence du mauvais œil. Les Cholos utilisent toujours le bois et les feuilles de la plante autant que composants du tabac ; ce qui suggère que le parqui a été fumé avant l'introduction du tabac sur le continent [81].

Tableau 3.1. : Préparations traditionnelles des différentes parties de *C.parqui*

FR : Fruit, FL : Feuille, T : Tige, FLR : Fleures, PA : Partie aérienne, VO : Voie orale, VC : Voie cutanée.

Partie Utilisée	Préparations	Mode	Traitement	Références
-FL	-Infusion	VO	-La variole, la lèpre, la tuberculose, la fièvre et l'herpès, les feuilles peuvent être appliquées directement sur les plaies.	[81]
- FL	-Infusion -Fraiches -Jus	VO	-Variole, lèpre, tuberculose. -Eczéma. -Herpès, impétigo.	[310]

- FL	<p>-Infusion</p> <p>-Infusion (avec les branches de camomille).</p> <p>-Infusion (avec les feuilles de plantain). (1/jr/7jr, repos pour quelques jours et commence à nouveau pendant plusieurs mois).</p> <p>-Cataplasme</p> <p>-Décoction (3 à 5mn)(Application de tous les jours). - pommade des feuilles tendres</p>	<p>VO</p> <p>VO</p> <p>VC</p> <p>VC</p>	<p>-la dysenterie et les infections intestinales.</p> <p>-(Salmonellose) estomac et inflammations hépatiques.</p> <p>- Cancer du sein</p> <p>- Une partie du corps enflammé. - Les plaies.</p> <p>- la gale, la teigne, l'eczéma.</p>	[311]
- FLR	-Infusion	VO	-Problèmes digestive (A prendre en petites quantité) un verre avant d'aller dormir.	[312]
- FL	<p>- fraîches</p> <p>-Cataplasme</p>	<p>VC</p> <p>VC</p>	<p>-Application cutanée par frottement (comme antipyrétique).</p> <p>- Démangeaisons et urticaire.</p>	[315]
- FL	- Décoction	VO	-Antifongique (la teigne).	[318]

-T, FL	-Infusion	VO	-Douleur cardiaque, lavage des plaies, traitement de toux, hémorragie, lavage oculaire, douleur de la vessie et maux d'estomac.	[320]
-T, FL	-Infusion	VO	-Inflammation.	[321]
-PA	-Cataplasme (Broyé)	VC	-Contusions, gonflements, Fièvre, Vulnéraire.	[322]
	-Décoction	VO	- Dépuratif.	
- FL	- Décoction	VO	-Purgatif, antispasmodique, digestion.	[323]

3.2. Résultats de l'étude macroscopique de *C.parqui*

Après comparaison du spécimen récolté au niveau de la région de Belouiezdad à Alger avec ceux répertoriés au niveau de l'herbier de l'ENSA, nous avons pu constater que les deux échantillons sont identiques. Cependant nous avons eu recours aux observations macroscopiques plus approfondies afin de mieux identifier la plante.

Les figures ci-dessous montrent les principaux critères botaniques qui caractérisent le *Cestrum parqui*, nous notons la présence des rameaux qui sont nombreux, effilés, d'un feuillage alternatif (Photo 3.19).

Les feuilles lancéolées, glabres, d'un vert foncé en dessus, plus pâles en dessous, elles sont regroupées en terminal de 90 mm de longueur et de 22 mm de largeur, à forme pointue à chaque extrémité (Photo 3.20).

Les fleurs sont jaunâtres et atteignent 25 mm de longueur en formant plusieurs ensembles sur un pédoncule commun. Le calice est très court, d'une seule pièce, en tube court, à cinq dents (Photo 3.21, 22 et 23).

Les étamines sont au nombre de cinq et ne débordent pas le tube de la corolle; filets attachés vers le milieu du tube, ils sont dépourvus de poil (Photo 3.24).

Nous avons noté également la présence de l'ovaire supérieur de forme arrondi, terminé par un style de la longueur du tube de la corolle par un stigmate obtus,

avec cinq étamines à filets sans barbe, alternes avec les lobes de la corolle (Photo 3.25). Les résultats de notre étude macroscopique concordent avec ceux donnés par plusieurs auteurs [74], [75], [76], [77].

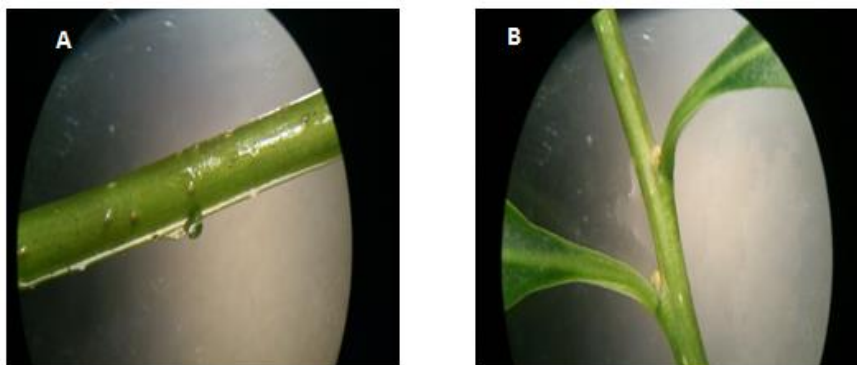


Photo 3.19 : Rameaux (A) et position de feuillage (B) (Gx2.5).

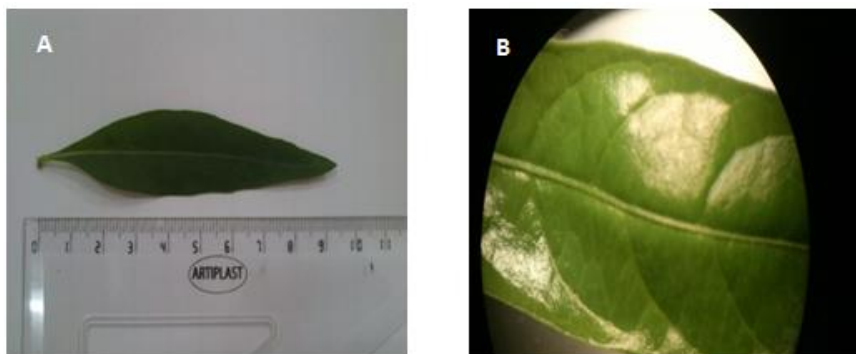


Photo 3.20 : Taille de feuille (A) et nervures (B) (Gx4.5).

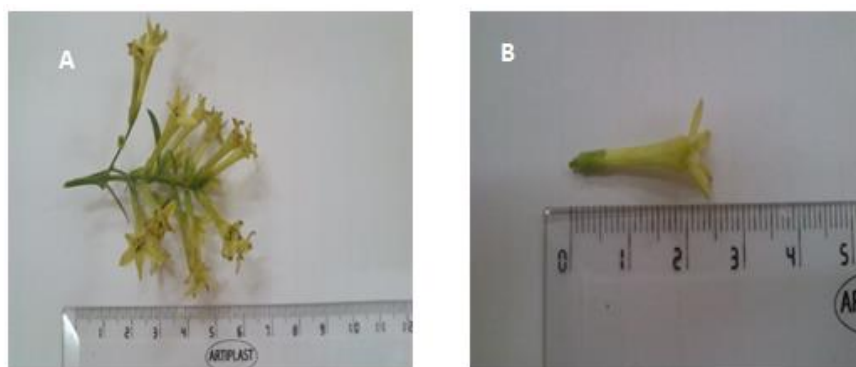


Photo 3.21 : Position des fleurs par rapport aux rameaux (A), et taille de fleur (B).

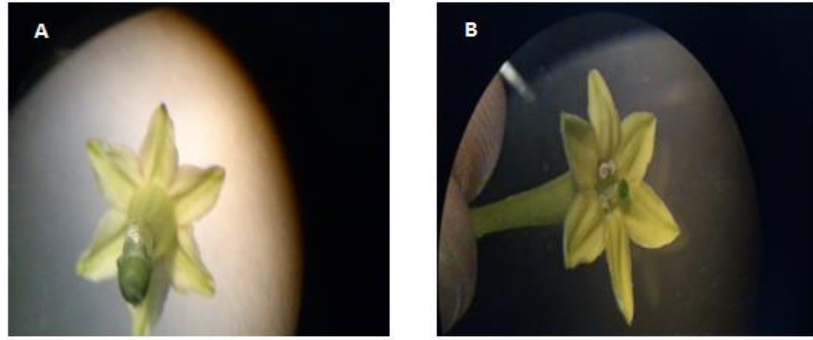


Photo 3.22 : Fleur vue du dos (A), et de profil (B) (Gx4.5).

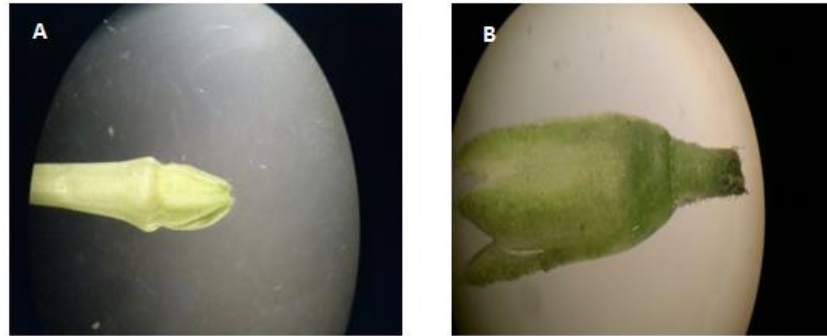


Photo 3.23 : (A) : Fleur fermée, B : vue de profil de calice (Gx4.5).

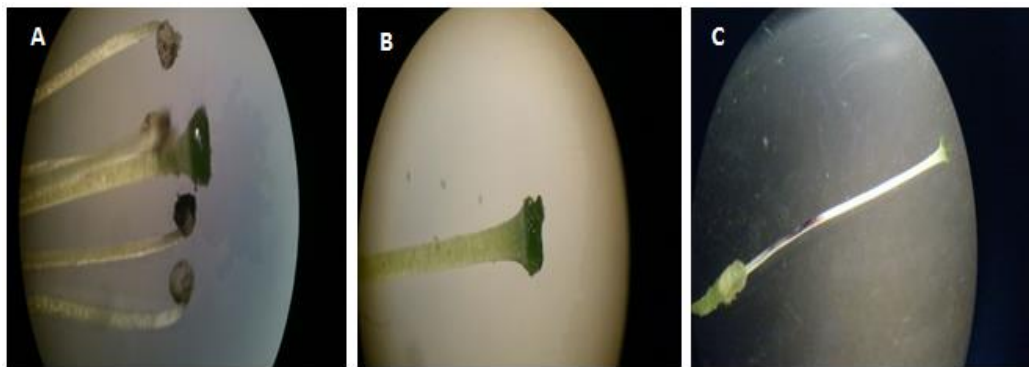


Photo 3.24 : (A) : Position des étamines par rapport au style, (B et C) : Style (Gx4.5).

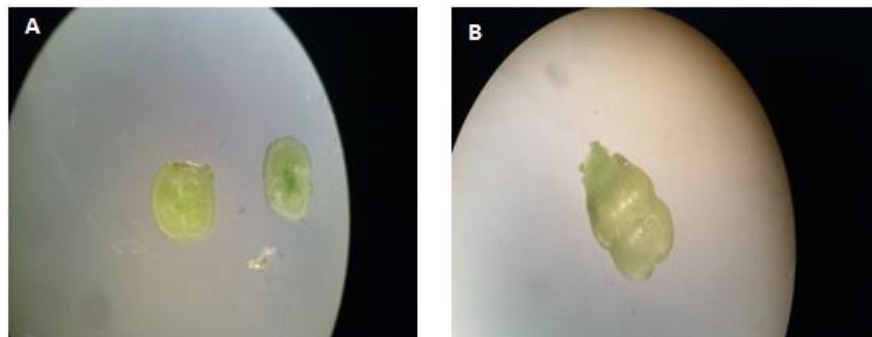


Photo 3.25 : (A) : Coupe transversale de l'ovaire, (B) vue de profil de l'ovaire (Gx4.5).

Les différents aspects macroscopiques observés sous la loupe binoculaire nous confirment l'identité de la plante récoltée.

3.3. Résultats de l'étude microscopique de la feuille de *C.parqui*

Afin de détecter ou de localiser des structures particulières au niveau de la feuille. L'observation microscopique de la feuille a révélé sa structure pluricellulaire, et elle nous a permis d'observer les tissus suivants (partant de l'extérieur à l'intérieur) (Photo 3.26 et 27):

- Absence des poils sécréteurs au niveau de l'épiderme,
- Présence d'un épiderme supérieur constitué par une assise de cellules,
- Présence des cellules allongées adjacentes contenant de nombreux chloroplastes,
- Présence de parenchyme foliaire,
- Présence du bois et du liber,
- Présence d'un épiderme inférieur formé par une assise de cellules.

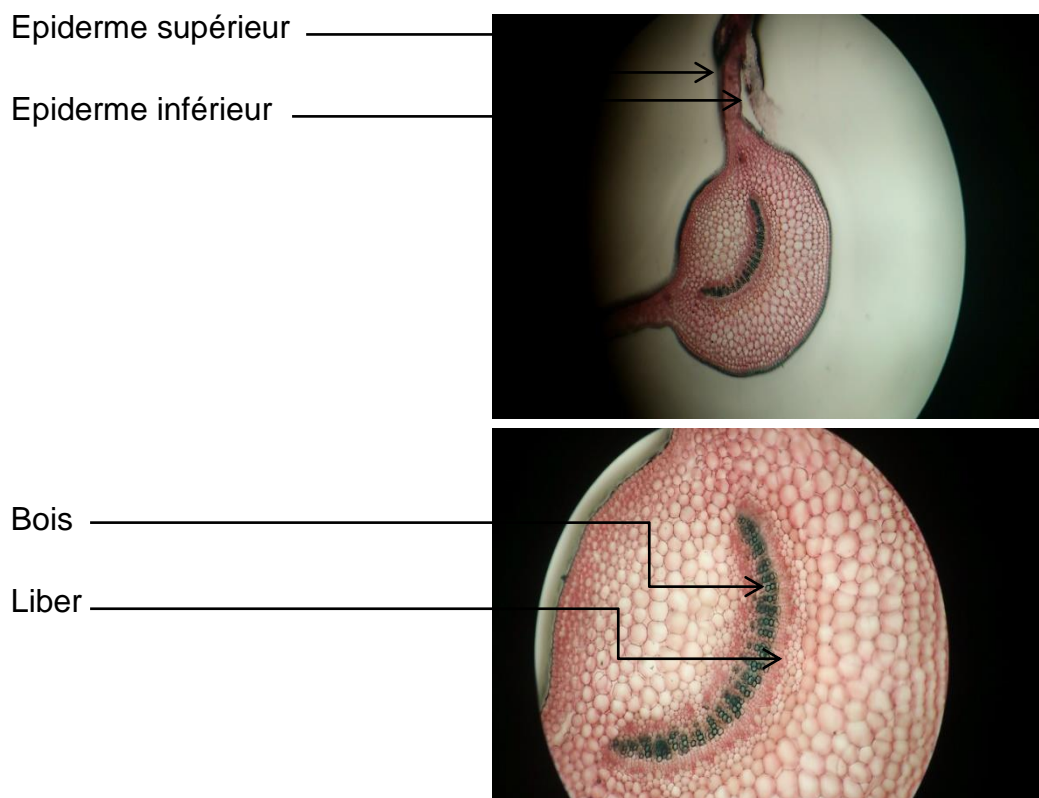


Photo 3.26 : Coupe transversale de la nervure principale de la feuille (En haut Gx10) (En bas Gx40).

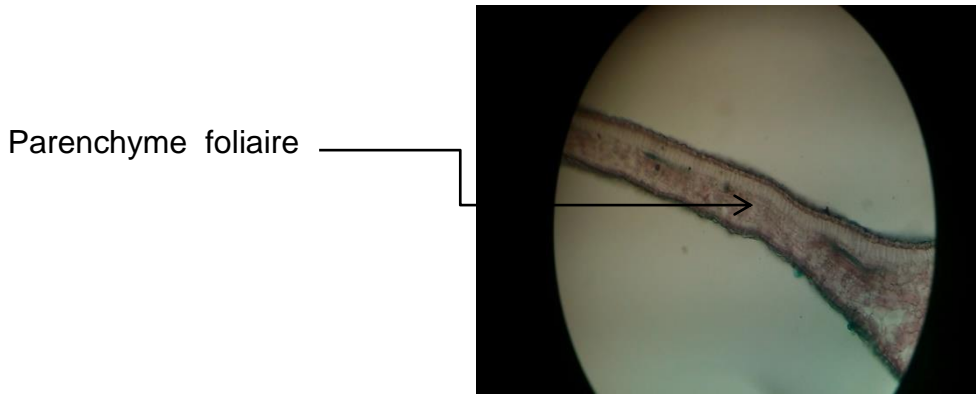


Photo 3.27 : Coupe transversale de feuille (Gx10).

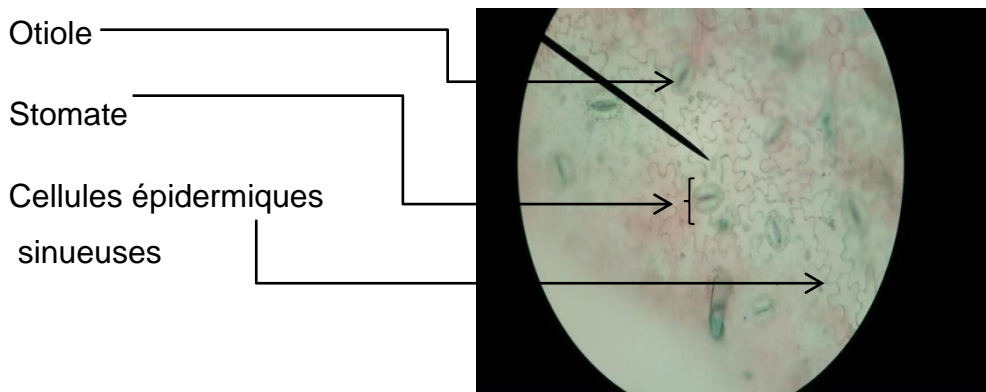


Photo 3.28 : Stromas au niveau de feuilles (Gx40).

L'observation de face de la partie externe de la feuille nous a montré la présence des cellules épidermiques, de forme sinueuse qui forment un puzzle, des stomates formés par deux cellules stomatiques, et au centre, nous observons une ouverture ; l'otiole (Photo 3.28).

3.4. Résultats des analyses phytochimiques

3.4.1. Détermination de la teneur en eau

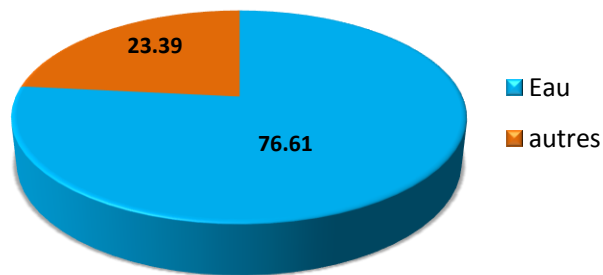


Figure 3.29 : Teneur en eau (%).

Les valeurs moyennes des trois essais (ANNEXE 05) nous ont donné un poids frais égal à 2 g et un poids sec égal à 0.467 g. La feuille contient donc 76.61 % d'eau (Figure 3.29). Cette teneur en eau est conforme à celle observée par la [326].

De par leur richesse en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau [327]. La teneur élevée en eau, chez les plantes, est en relation étroite avec l'activité métabolique. Elle fournit hydrogène indispensable aux réactions de biosynthèse [328].

3.4.2. Détermination de taux d'humidité

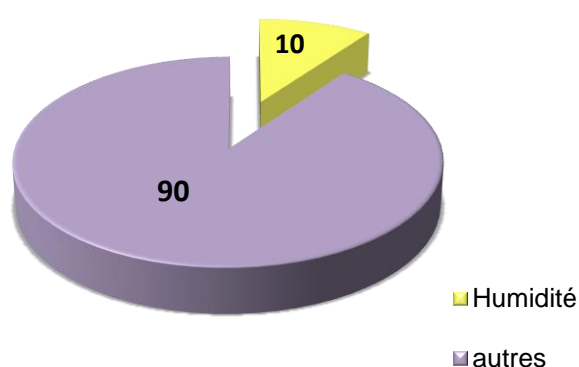


Figure 3.30 : Taux d'humidité (%).

La figure 3.30 montre que le taux d'humidité est de 10% par rapport au poids frais des feuilles (ANNEXE 05). Ce taux en humidité est conforme aux normes de la pharmacopée URSS [349], indiquant ainsi un bon séchage et une bonne conservation de la plante [329].

3.4.3. Détermination de la teneur en cendres

La calcination totale d'une prise d'essai de 2 g de poudre végétale nous a permis d'obtenir les résultats consignés dans le tableau 3.2. Les cendres obtenues sont de couleur claire et représentent chez les feuilles de *Cestrum parqui* une teneur de 16 % (ANNEXE 05). Cette dernière est supérieure à celle rapportée par la pharmacopée en 2005 qui est de 10 à 12 %.

Tableau 3.2 : Teneur en cendre de *C.parqui* :

Prise d'essai (g)	Pesée après calcination totale (g)	Teneur en cendre en % de poids sec
2 ± 0.163	0.32 ± 0.136	16% ± 0.263

La quantité des ions minéraux absorbés est en relation avec les conditions physicochimiques du sol dans lequel vit la plante. La température, l'éclairage et l'aération du milieu peuvent influencer sensiblement les teneurs en minéraux. L'état physiologique interne de la plante (stade de développement, âge, état hormonal) joue également un très grand rôle dans l'absorption des minéraux [330]. De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux ; dont elles les tirent du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme pour qu'ils puissent participer activement à l'activité thérapeutique de la plante [43].

3.4.4. Résultats de l'extraction des composés actifs de feuilles de *Cestrum parqui*

3.4.4.1. Extraction des composés polaires et apolaires par la méthode solide- liquide de Soxhlet

Nous avons obtenu une teneur en composés apolaires de 6.03 %. Concernant les principes actifs polaires ; la teneur est de 16.29 % de la matière sèche (Figure 3.31) (ANNEXE 05). Aucun résultat concernant le rendement de l'extraction par Soxhlet n'a été trouvé dans la littérature sur *C.parqui* ; ce qui rend la comparaison difficile de nos résultats.

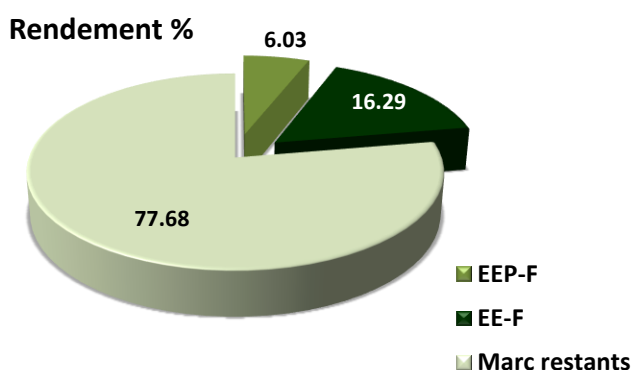


Figure 3.31 : Rendement de l'extraction solide-liquide.

3.4.5. Résultats de l'analyse des extraits par spectrophotométrie

Le rayonnement électromagnétique dans le domaine ultraviolet-visible s'exprime par sa longueur d'onde λ , en nm : Le domaine UV s'étend de 10 à 390 nm, celui du visible de 390 à 770 nm [331].

3.4.5.1. Résultats de l'analyse spectrophotométrique à balayage UV-Visible

a. Extrait éthanolique de feuilles ; EE-F

Le spectre obtenu montre les différents pics d'absorption des différentes fonctions chimiques détectées de l'EE-F en fonction de la longueur d'onde et de l'absorbance et leurs interprétations (Figure 3.32). Selon [332]. le domaine d'absorption situé entre 291 et 300 nm est propre aux composés benzéniques, alors que le domaine entre 400 et 498 nm est caractéristique aux caroténoïdes et leurs dérivés. Celui situé entre 600 et 664 nm correspond à la chlorophylle.

Selon la figure ci-dessous nous pouvons remarquer la présence de 15 pics majoritaires à 15 longueurs d'ondes différentes (de 220 à 665 nm) détectés par le spectrophotomètre UV-1800 SHIMADZU, avec une condensation hautement importante des molécules actives entre 200 et 400 nm ; cet intervalle d'absorption est propre aux substances benzéniques [332]. Un pic majoritaire à 241 nm (Abs.= 4.000) est détecté et qui correspond à un aglycone flavonoïque [333]. (Tableau 3.3).

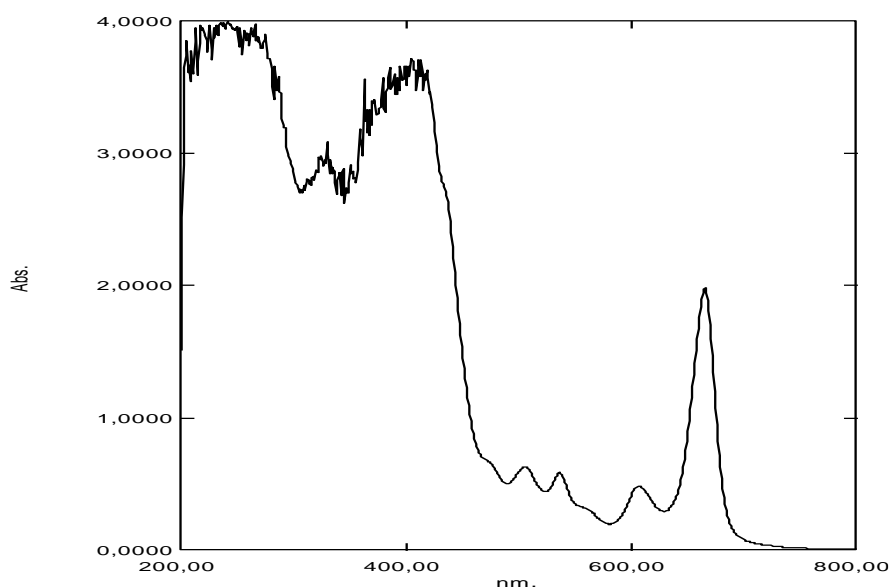


Figure 3.32 : Spectre d'analyse par la spectrophotométrie à l'UV-Visible de l'EE-F.

Tableau 3.3 : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait éthanolique de feuilles (EE-F) de *C.parqui* :

EE-F			
No. De pique	L. d'onde nm.	Abs.	Interprétation
1	665	1,9858	Chlorophylle.
2	607	0,4822	Chlorophylle.
3	536	0,5868	Caroténoïdes et dérivés
4	506	0,631	Caroténoïdes et dérivés
5	221	3.7433	Aglycone flavonoïque
6	404	3,7221	Caroténoïdes et dérivés
7	241	4,000	Aglycone flavonoïque
8	628	0,2945	Chlorophylle.
9	581	0,1982	Caroténoïdes et dérivés
10	523	0,4419	Caroténoïdes et dérivés
11	489	0,5026	Caroténoïdes et dérivés
12	345	2,6268	Chalcones
13	380	3.6248	C. benzéniques
14	366	3.6631	C. benzéniques
15	314	3.2160	C. benzéniques

EE-F : Extrait éthanolique de feuilles, *No* : Numéro, *C* : Composés, *L* : Longueur, *Abs* : Absorbance.

D'après ces illustrations, nous constatons que cette analyse a révélé la richesse de l'EE-F en polyphénols d'où leur composition chimique commune avec les substances benzéniques détectées est composée principalement de noyau benzénique [33].

b. Extrait étheropétrolique de feuilles ; EEP-F

D'après la figure 3.33 et le tableau 3.4, l'analyse par l'UV-V. de l'EEP-F a révélé d'une part une richesse en fonctions chimiques actives plus importantes que celles de l'EE-F ; avec 16 pics détectés, et une condensation très importante des molécules benzéniques entre 200 et 400 nm [332], et de l'autre part une bonne extraction étherique. Le tableau 3.3 montre aussi que les pics avec des longueurs d'ondes qui se situent entre 500 et 600 sont les plus signalés, et qui correspondent aux anthocyanidines [333]. Une augmentation maximale de l'absorbance (Abs=3.6253) à 222 nm a été clairement observée dans le spectre par la forte présence d'un composé terpénique à unité isoprénique [333]. La forte détection des molécules benzéniques et isopréniques nous conduit à penser

fortement à la présence des alcaloïdes stéroïdiens, des terpènes, et des stérols [49].

Tableau 3.4 : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait étheropétrolique de feuilles de *C.parqui* :

EEP-F			
No. De pique	L. d'onde nm.	Abs.	Interprétation
1	667	3,3339	Chlorophylle.
2	222	3.6253	C. isopréniques
3	611	0,8769	Chlorophylle.
4	561	0,4164	Chlorophylle.
5	532	1,0346	Caroténoïdes et dérivés
6	502	1,5239	Caroténoïdes et dérivés
7	470	1,3137	Anthocyanidines
8	630	0,5659	Chlorophylle.
9	583	0,2942	Anthocyanidines
10	549	0,3603	Caroténoïdes et dérivés
11	521	0,632	Caroténoïdes et dérivés
12	484	1,08	Anthocyanidines
13	459	1,2532	Caroténoïdes et dérivés
14	207	3.4123	C. isopréniques
15	218	3.5692	C. isopréniques
16	224	3.5213	C. isopréniques

EEP-F : Extrait étheropétrolique de feuilles, No : Numéro, C : Composés, L : Longueur, Abs : Absorbance.

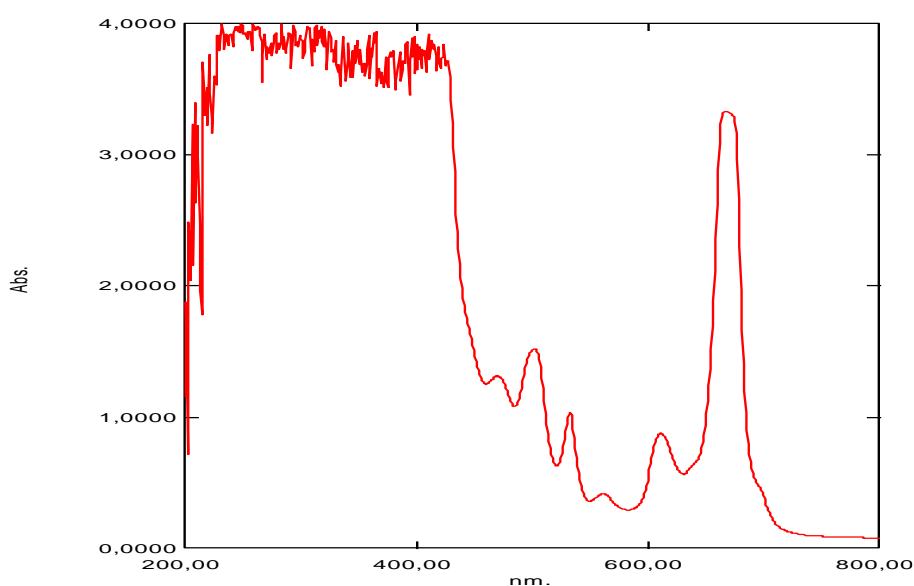


Figure 3.33 : Spectre d'analyse par la spectrophotométrie UV-Visible de l'EEP-F.

c. Extrait aqueux de feuilles ; EA-F

L'analyse de l'extrait aqueux par l'UV-V. (Figure 3.34) révèle qu'il renferme des substances actives mais de faible présence par rapport aux deux extraits précédents (EE-F et EEP-F), avec deux absorbances importantes mesurées par le spectrophotomètre détectée à 254 et à 271 nm, correspondant à une forte concentration des composés benzéniques (Abs=2.7546), et des aglycones flavonoïdiques (Abs=2,4355) respectivement [332] (Tableau 3.5). Par ailleurs, les molécules qui présente des absorbances qui se situe entre 200 et 250 nm ; ne semble pas être des composés terpéniques, mais plutôt des composés plus polaires qui pourraient être des dérivés phénoliques [333].

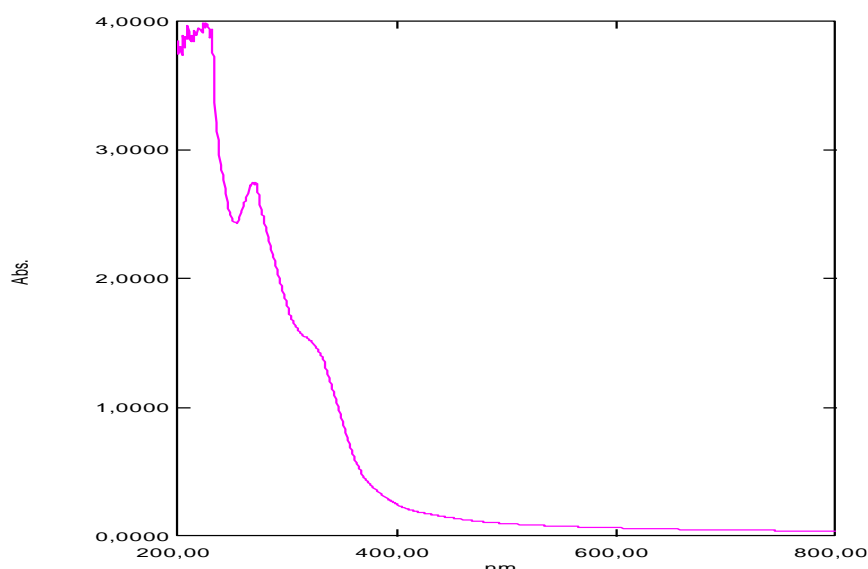


Figure 3.34: Spectre d'analyse par la spectrophotométrie à l'UV-Visible de l'EA-F.

Tableau 3.5. : Longueur d'ondes d'absorption de molécules détectées de l'extrait aqueux de feuilles de *C.parqui* :

EA-F			
No. De pique	L. d'onde nm.	Abs.	Interprétation
1	689	0,0486	Chlorophylle.
2	271	2,7546	C. benzéniques
3	674	0,0468	Chlorophylle.
4	254	2,4355	Aglycone flavonoïque

EA-F : Extrait aqueux de feuilles, No : Numéro, C : Composés, L : Longueur, Abs : Absorbance.

L'analyse par la spectrophotométrie UV-V des trois extraits a donné des différents pics tous le long du domaine d'absorption ; précisément aux longueurs d'ondes

de 200 à 400 nm ; cet intervalle est connue comme la zone qui regroupe la plus part des groupes fonctionnels actifs (groupements carboxyle, aldéhyde, benzène, acide...) des composées secondaire d'une plante [334]. Cette diverse richesse nous assure que les solvants utilisés pour les trois d'extractions ont pu extraire plusieurs molécules de nature chimique différente.

3.4.5.2. Résultats de l'analyse spectrophotométrique à Infrarouge

Nous avons regroupé les différentes bandes des principaux groupements fonctionnels qui peuvent être attribués à la nature chimique des différents extraits.

Le rayonnement électromagnétique dans le domaine de l'infrarouge s'étend de 770 nm à 1 mm. Cependant l'unité spectrale couramment utilisé en spectroscopie moléculaire infrarouge est le nombre d'onde ν , exprimé en cm^{-1} . Le domaine qui nous intéressera dans le cadre des molécules organiques étudiées est restreint : de 500 à 4000 cm^{-1} [331]. L'interprétation des spectres est réalisée d'après la table de lecture des spectres IR (ANNEXE 06) [334].

a. Extrait éthanolique de feuilles ; EE-F

Le spectre IR (Figure 3.35) de l'extrait EF est en parfaite harmonie avec son screening chimique, Il nous montre une forte détection de groupements fonctionnels le long de deux bandes d'absorption différentes ; de 500 à 1700 (cm^{-1}) et de 2800 à 3500 (cm^{-1}), bien que la bande d'absorption qui s'allonge entre 3200 et 3400 (cm^{-1}) représente la bande la plus concentrée en composés avec des absorbances qui dépassent la valeur 2.00 (Tableau 3.6).

Des pics intenses vers 3376.25 cm^{-1} et 3421.3 cm^{-1} caractérisent des groupements libres de carboxyle ou phénol (O-H), des alcools, et les groupements amines primaires (N-H) ; ces données nous oriente à dire qu'il y a une abondance des composés azotés et polyphénoliques.

L'absorption assez intense vers 2857.48 cm^{-1} et 2925.89 cm^{-1} , nettement visible dans les spectres infrarouge, est une bande de valence très riche en groupements aliphatiques et aromatiques C-H₃, liaisons aromatiques, des aldéhydes, et des acides carboxyliques.

Le spectre ci-dessous représente également un pic d'absorption vers 1732.19 cm^{-1} dû à un groupement carbonyle qui est probablement dû à un système conjugué : nous avons le choix entre des cétones, des esters, des anhydrides. D'une absorbance un peu faible ; apparait une bande carbonyle située vers 1626.65 cm^{-1} et qui correspond aux doubles liaisons aromatiques.

Nous remarquons aussi des pics intenses entre 1387.83 cm^{-1} et 1406.18 cm^{-1} caractérisant les groupements O-H phénoliques, et deux pics détectés à 1061.94 et 1167.44 cm^{-1} correspondant à la fonction C-O d'un alcool secondaire. Une forte présence des vibrations de valence de C-H aromatiques sont observées entre 667.13 cm^{-1} et 983.011 cm^{-1} .

La présence d'alcaloïdes est visible par les nombreux pics au niveau de la bande OH située entre 3000 et 3500 cm^{-1} caractéristique de la vibration d'un acide carboxylique confirmé aussi par la vibration de la liaison carbonyle C=O localisée à 1721 cm^{-1} .

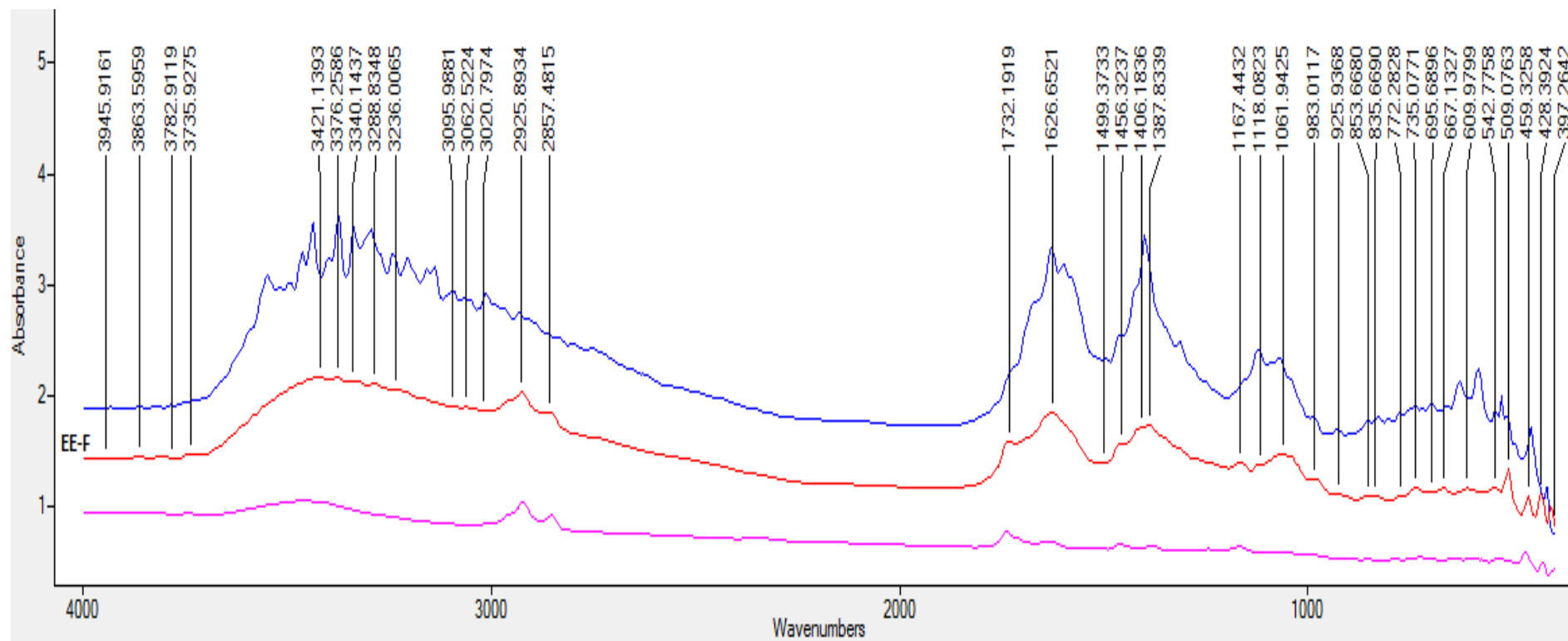


Figure 3.35 : Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EE-F.

b. Extrait étheropétrolique de feuilles ; EEP-F

L'analyse de l'EEP-F par infrarouge a indiqué qu'il est moins concentré que l'EE-F ; dont les pics sont faiblement tracés (Figure 3.36) ; les faibles concentrations détectées expliquent la faible polarité du solvant utilisé :

Des pics intenses sont détectés entre 2853.5467 cm^{-1} et 2922.9715 cm^{-1} suite à la vibration des plusieurs groupements aliphatiques et aromatiques (C-H₃), des liaisons aromatiques, des acides carboxyliques, et des aldéhydes.

Nous pouvons constater aussi une forte présence de groupements libres de carboxyle ou phénol (O-H), et de groupements amines ou amides, suite à une absorption maximale à 3467.7342 cm^{-1} (Abs=1.057).

Le pic à 1738.97 cm^{-1} révèle la présence des esters, des composés anhydridiques, et des groupements cétoniques, alors que la présence de groupements carboxyles libres, et des doubles liaisons aromatiques a été observée aussi à 1461.4273 cm^{-1} et à 1643.0149 cm^{-1} respectivement (Tableau 3.6).

La présence en plus d'une large bande à 3445 cm^{-1} permettant de justifier la présence des stérols, des pics juste au-dessus de cette bande responsable de l'existence d'alcaloïdes au sein de l'extrait EEP-F. Le test positif concernant les extraits lipidiques et en particulier les acides gras est confirmé par la présence d'un pic important caractéristique de la vibration carbonyle C=O d'un ester situé à 1738 cm^{-1} . Un détail important est la nature des acides gras dont la présence d'insaturation au niveau de la matière végétale identifiée par un pic à 3005 cm^{-1} spécifique de la vibration C-H d'un alcène et par conséquent l'existence d'acide oléique ou linoléique. Cette composition est vérifiée au niveau des pics des vibrations C-H des groupes méthyles CH₃ et méthylènes CH₂ entre 2922 et 2852 cm^{-1} . Le pic localisé à 1627 cm^{-1} confirme aussi la présence des stérols grâce à cette vibration C-O.

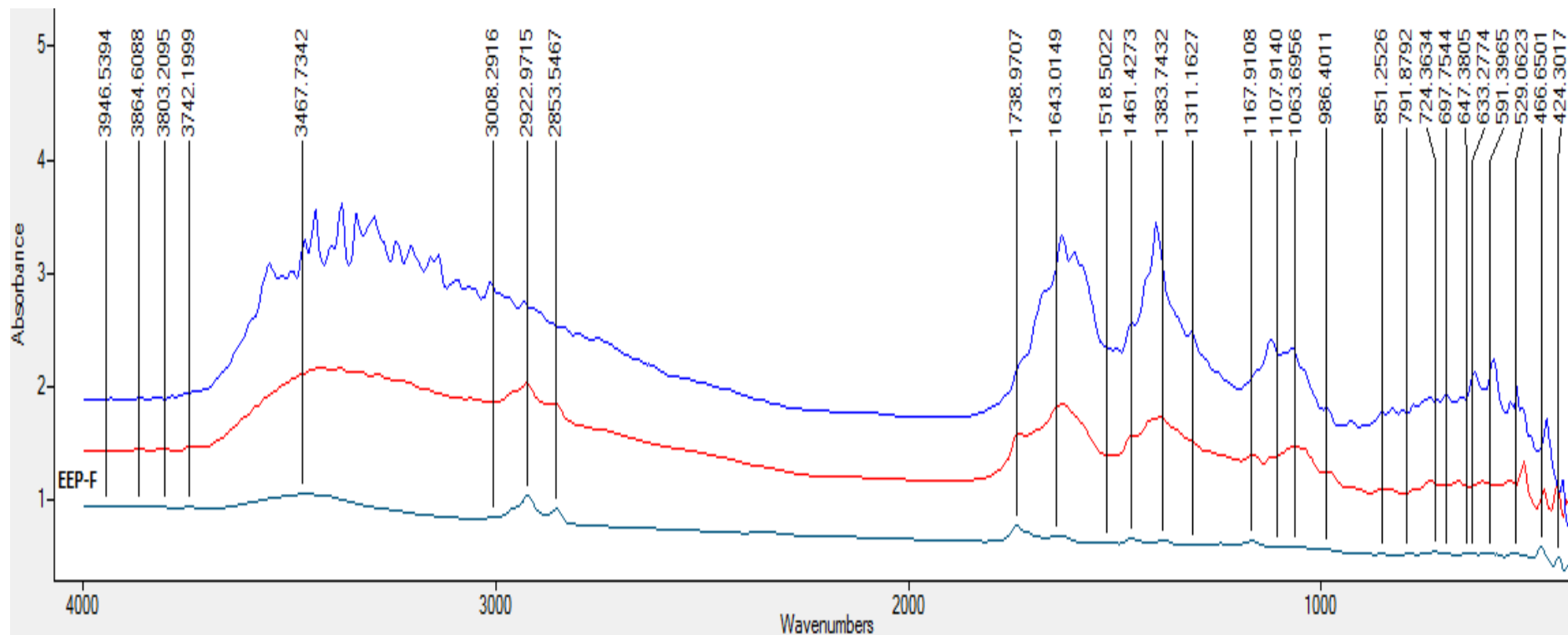


Figure 3.36: Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EEP-F.

c. Extrait aqueux de feuilles de *C.parqui* ; EA-F

L'infusé s'est révélé plus riche et plus concentré en groupements fonctionnels par rapport aux deux extraits précédents avec 33 pics majoritaires correspondant aux absorbances importantes qui dépassent la valeur de 2.00 (Figure 3.37). L'hétérogénéité de l'extrait explique la forte polarité du solvant utilisé ainsi la richesse de l'EA-F en molécules actives.

Des pics hautement présentatifs ont été observés, le premier pic à 1399.63 cm^{-1} révèle la richesse de l'EA-F en groupements hydroxyles phénoliques (O-H), et les liaisons de nature C-O due à la présence des stérols ; bien que le deuxième pic détecté à 1627.43 cm^{-1} nous montre une présence de doubles liaisons aromatiques, et des liaisons de nature C=N ; tandis que la bande qui se trouve entre 3140.2065 et 3548.1844 cm^{-1} confirme clairement la richesse de *C.parqui* en composés azotés (N-H) (Tableau 3.6).

Les groupements phénoliques ont été largement détectés dans plusieurs bandes différentes de 1300 au 1450 cm^{-1} et entre 3300 et 3500 cm^{-1} ; cela nous oriente de constater la présence des différentes classes des substances polyphénoliques.

Le spectre IR de l'extrait EA est totalement identique à celui de l'extrait EE avec une différence quantitative. Alors que les alcaloïdes, et les polyphénols sont plus importants et plus caractéristiques du fait de leurs solubilités, et du caractère ionique dans l'eau [33].

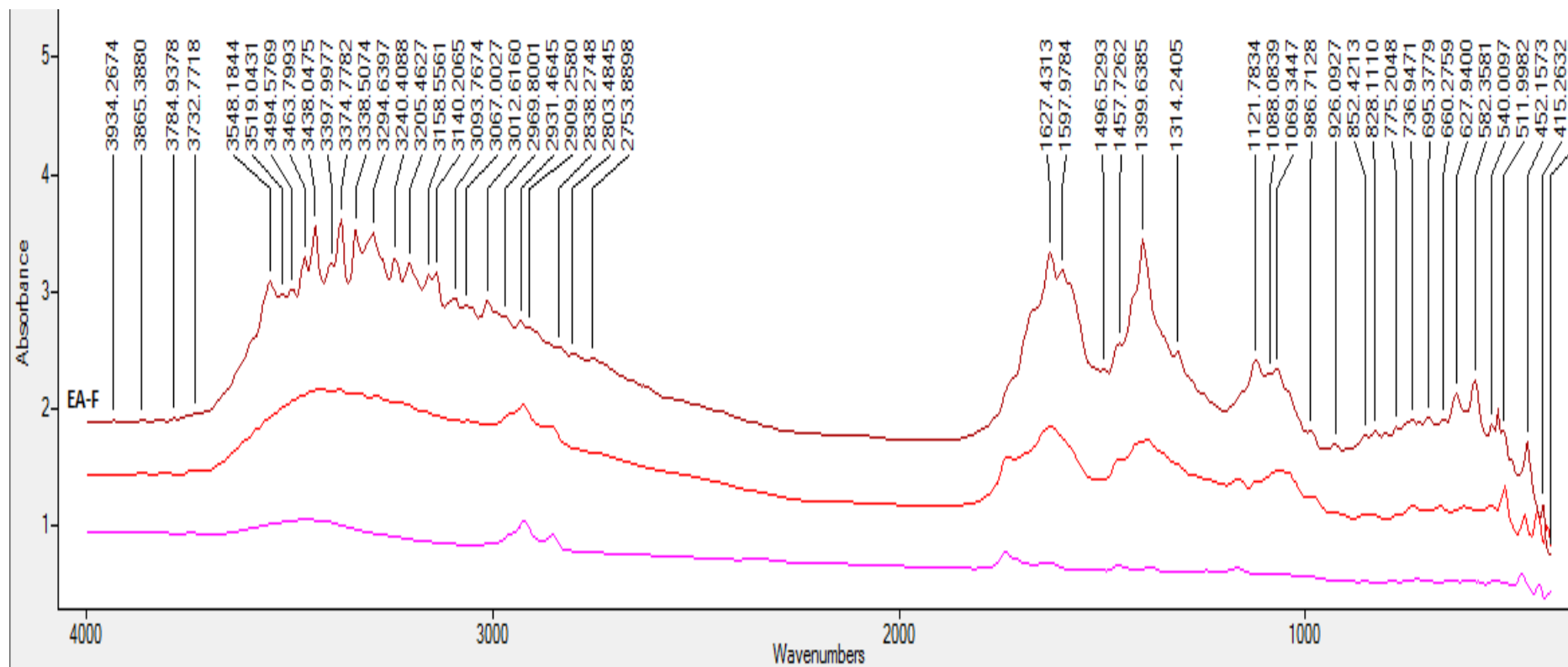


Figure 3.37: Spectre d'analyse infrarouge (IR) de l'EA-F.

Tableau 3.6 : Pics majoritaires détectés des trois extraits (EE-F, EEP-F, et EA-F) par l'infrarouge (IR) :

EE-F			
Pic à	Hauteur de Pic	Interprétation	Liaison chimique
667.1327	1.1728	-Liaisons aromatiques	C-H
695.6896	1.1450	-Liaisons aromatiques	C-H
735.0771	1.1770	-Liaisons aromatiques	C-H C-Cl
772.2828	1.1108	-Liaisons aromatiques	C-H C-Cl
835.6690	1.1075	-Liaisons aromatiques	C-H
853.6680	1.1069	-Liaisons aromatiques	C-H
983.0117	1.2603	-Liaisons aromatiques	C-H
1061.9425	1.4845	-Alcool secondaire	C-O C-C
1118.0823	1.3898	-Alcool secondaire	C-O C-C
1167.4432	1.4021	-Alcool secondaire	C-O C-C
1387.8339	1.7400	-Groupements phénoliques	O-H C-O
1406.1836	1.7297	-Groupements phénoliques	O-H C-O
1456.3237	1.5781	-Groupements phénoliques -Doubles liaisons aromatiques	O-H C=C
1499.3733	1.4083	-Doubles liaisons aromatiques	C=C
1626.6521	1.8521	-Doubles liaisons aromatiques	C=C C=N
1732.1919	1.5896	-Esters aliphatiques / -Cétones -Anhydride	C=O
2857.4815	1.8613	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatiques -Aldéhyde -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H C _{Tri} -H O-H
2925.8934	2.0357	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatiques -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H O-H
3020.7974	1.8784	-Liaisons aromatiques -Acide carboxylique	C-H O-H
3062.5224	1.9056	-Liaisons aromatiques -Acide carboxylique	C-H O-H
3095.9881	1.9183	-Groupements amines primaires -Acide carboxylique	N-H O-H

3236.0065	2.0655	-Groupements amines primaires/amides -Alcool lié	N-H O-H
3288.8348	2.1171	-Groupements amines primaires/amides -Alcool lié	N-H O-H
3340.1437	2.1386	-Groupements amines primaires/amides -Alcool lié	N-H O-H
3376.2586	2.1648	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides	O-H N-H
3421.1393	2.1715	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides	O-H N-H
EEP-F			
724.3634	0.5502	-Liaisons aromatiques	C-H C-Cl
791.8792	0.5317	-Liaisons aromatiques	C-H C-Cl
851.2526	0.5334	-Liaisons aromatiques	C-H
986.4011	0.5698	-Liaison aromatique	C-H
1167.9108	0.6439	-Alcool secondaire	C-O C-C
1383.7432	0.6541	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol)	O-H C-O
1461.4273	0.6728	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol)	O-H
1643.0149	0.6905	-Doubles liaisons aromatiques	C=C C=N
1738.9707	0.7779	-Esters aliphatiques / Cétones -Anhydride	C=O
2853.5467	0.9294	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) Liaisons aromatique -Aldéhyde -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H C _{Tri} -H O-H
2922.9715	1.0492	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Acide carboxylique	C-H ₃ O-H
3008.2916	0.8542	-Liaisons aromatiques -Acide carboxylique	C-H O-H
3467.7342	1.0571	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines	O-H N-H

		primaires/amides	
EA-F			
627.9400	2.1350	-Bande liaisons aromatiques	C-H
660.2759	1.9144	-Bande liaisons aromatiques	C-H
695.3779	1.9262	-Bande liaisons aromatiques	C-H
736.9471	1.9097	-Bande liaisons aromatiques	C-H C-Cl
775.2048	1.8447	-Bande liaisons aromatiques	C-H C-Cl
828.1110	1.8098	-Bande liaisons aromatiques	C-H
852.4213	1.7753	-Bande liaisons aromatiques	C-H
926.0927	1.6997	-Bande liaisons aromatiques	C-H
986.7128	1.8174	-Alcool secondaire	C-O
1069.3447	2.3376	-Alcool secondaire	C-O C-C
1088.0839	2.2982	-Alcool secondaire	C-O C-C
1121.7834	2.4240	-Alcool secondaire	C-O C-C
1314.2405	2.4938	-Groupements phénoliques	O-H C-O
1399.6385	3.4462	-Groupements phénoliques	O-H C-O
1457.7262	2.5583	-Groupements phénoliques -Doubles liaisons aromatiques	OH C=C
1496.5293	2.3477	-Doubles liaisons aromatiques	C=C
1597.9784	3.1852	-Doubles liaisons aromatiques	C=C
1627.4313	3.3422	-Doubles liaisons aromatiques	C=C C=N
2753.8898	2.4349	-Aldéhyde -Acide carboxylique	C _{Tri} -H O-H
2803.4845	2.4770	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatique -Aldéhyde -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H C _{Tri} -H O-H
2838.2748	2.5380	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatique -Aldéhyde -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H C _{Tri} -H O-H
2909.2580	2.6897	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatique -Acide carboxylique	CH ₃ C _{Tét.} -H O-H
2931.4645	2.7557	-Groupements (aliphatiques et aromatiques)	CH ₃ C _{Tét.} -H

		-Liaison aromatique -Acide carboxylique	O-H
2969.8001	2.7994	-Groupements (aliphatiques et aromatiques) -Liaison aromatique -Acide carboxylique	C-H ₃ C _{Tét.} -H O-H
3012.6160	2.9296	-Acide carboxylique	O-H
3067.0027	2.8868	-Acide carboxylique	O-H
3093.7674	2.9504	-Acide carboxylique	O-H
3140.2065	3.1745	-Allongement de la liaison (amines primaires)/amides -Acide carboxylique	N-H O-H
3158.5561	3.1509	-Allongement de la liaison (amines primaires)/amides -Acide carboxylique	N-H O-H
3205.4627	3.2477	-Alcool lié -Allongement de la liaison (amines primaires)/amides	O-H N-H
3240.4088	3.2895	-Alcool lié -Allongement de la liaison (amines primaires)/amides	O-H N-H
3294.6397	3.5027	-Alcool lié -Allongement de la liaison (amines primaires)/amides	O-H N-H
3338.5074	3.5387	-Alcool lié -Allongement de la liaison (amines primaires)/amides	O-H N-H
3374.7782	3.6090	-Allongement de la liaison (amines primaires)/amides -Alcool lié	N-H O-H
3397.9977	3.2431	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides -Alcool lié	O-H N-H O-H
3438.0475	3.5652	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides	O-H N-H
3463.7993	3.3055	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides	O-H N-H
3494.5769	3.0264	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires/amides	O-H N-H
3519.0431	2.9826	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol)	O-H N-H

		-Groupements amines primaires	
3548.1844	3.0894	-Groupements libres (de carboxyle ou phénol) -Groupements amines primaires	O-H N-H

3.4.6. Résultats du screening triphytochimique des extraits

Les tests d'évaluation préliminaire de la composition chimique des différents extraits de *C.parqui* (EE-F, EEP-F, EA-F) ont permis de mettre en évidence une présence importante de quelques groupes chimiques représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.7: Résultats du screening phytochimique de l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F :

Extraits	Composés phytochimiques													
	AL*	AT	CR	CO	FL	HV/AG	HC	MC	PP	QN	SA**	ST	TR	Ta C, G
EEP-F	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	++	-
EE-F	+++	-	-	-	+	-	-	+	++	-	+++	-	+	++
EA-F	+++	-	-	-	+	-	-	+	+++	-	+++	+	+++	++

AL : Alcaloïdes, AT : Anthocyanes, CR : Composés réducteurs, CO : Coumarines, FL : Flavonoïdes, HV/AG : Huiles volatiles et acides gras, HC : Hétéroside cyanogénique, MC : Mucilage, PP : Polyphénols, QN : Quinones, SA : Saponines, ST : Stérols, TR : Terpènes, TA C,G : Tanins catéchiques et galiques. : Réaction positives pour les trois méthodes testés, ** : la présence est révélée par un dosage (EA-F) et le test de précipitation (EE-F).*

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée (Photo 3.38 et 39). Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : **+++**
- Une réaction moyennement positive est représentée par : **++**
- Une réaction faiblement positive est représentée par : **+**
- L'absence de la substance est représenté par : **-**

D'après le tableau 3.7, on peut constater que :

- Les alcaloïdes existent dans les trois extraits. Ils sont en quantités plus importantes dans l'EE-F et l'EA-F par rapport à l'EEP-F,
- Les anthocyanes sont faiblement présents dans l'EE-F et l'EEP-F, alors que l'EA-F ne les contient pas,

- La présence des flavonoïdes est plus marquée dans l'EA-F que l'EE-F, avec une négativité du test dans l'EEP-F,
- Les polyphénols ont été fortement détectés dans l'EA-F, par rapport à l'EE-F, bien qu'ils sont absents dans l'EEP-F,
- L'indice de mousse (Annexe 06) et l'intensité du précipité indiquent que la présence des saponosides est importante dans l'EE-F et l'EA-F respectivement,
- Les stérols sont plus importants que les terpènes dans l'EEP-F, et inversement dans l'EA-F, alors qu'ils sont absents dans l'EE-F.
- Une réaction moyennement positive des tanins catéchiques et galliques a été observée dans l'EE-F et l'EA-F, contrairement à l'EEP-F qui s'est révélé dépourvus de ces composés.
- Enfin, il est à noter que dans les trois extraits ; les anthocyanes, les composés réducteurs, les coumarines, les hétérosides cyanogéniques, et les quinones sont absents.

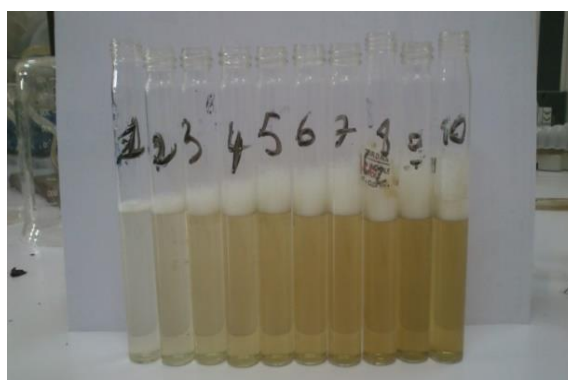


Photo 3.38 : Indice de mousse de l'EA-F (Méthode de dosage) (Originale).

Les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux ultérieurs de [99]; ces derniers ont mis en évidence la présence des saponines et des tanins dans les feuilles et les tiges, de [89]; qui ont trouvé les saponines, les stérols, et les alcaloïdes dans l'extrait éthanolique des feuilles, et de [92]; qui ont prouvé la présence des triterpènes ou/stérols, des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, et des saponines dans l'extrait méthanolique de feuilles.

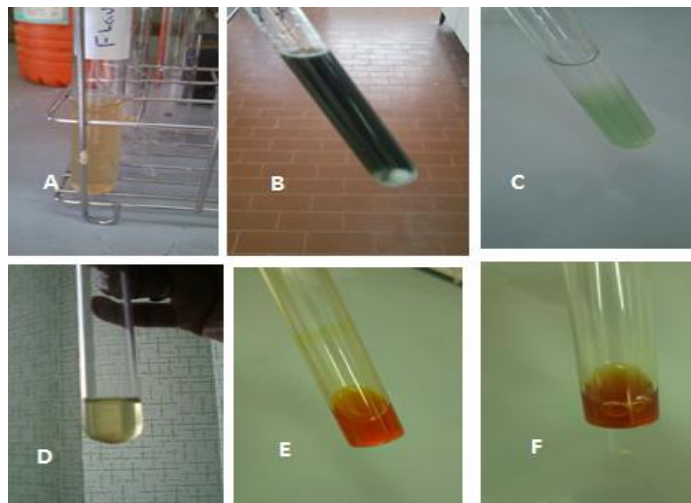


Photo 3.39 : Quelques résultats de screening chimique de l'EA-F (Originale).

A : Réaction positive de flavonoïdes, B : Réaction positive des polyphénols, C : Réaction positive des terpènes/ou Stéroïdes, D, E, F : Réaction positives des alcaloïdes par les trois méthodes.

La nature des principes chimiques mis en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes de *C. parqui* ; telles que l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne, et cytotoxique qui sont les méthodes les plus exploitées sur les plantes qui sont riches en saponines, en polyphénols, et en alcaloïdes [33].

3.5. Résultats des activités biologiques

3.5.1. Contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de *C.parqui*

La maîtrise de la bio-contamination reste une préoccupation constante et s'inscrit dans le contexte général de l'efficacité et de la sécurité des phytomédicaments.

Le contrôle de la qualité microbiologique de la poudre est une étape primordiale pour rassurer d'une part une stérilité *in vivo* des extraits préparés ; afin de protéger les animaux de telles intoxications éventuelles, et d'autre part pour éviter toute susception d'une contamination microbienne au cours de la réalisation des analyses biologiques *in vitro*.

Ce contrôle s'est avéré négatif avec l'absence des germes contaminants et les germes pathogènes recherchés qui sont reconnus par leurs fréquences de pathogénicité exprimée dans les plus parts des cas par des intoxications digestives graves chez l'être humain et l'animal (ANNEXE 07). La poudre de feuilles de *C.parqui* est validée comme produit à qualité microbiologique

satisfaisante. Le tableau 3.8 représente l'interprétation des résultats par rapport aux critères microbiologiques dédiés par [285].

Tableau 3.8 : Résultats du contrôle microbiologique de la poudre de feuilles de *C.parqui* :

Germes Recherchés	Résultats		Normes UFC/g	Interprétation
Germes aérobies à 30°C	10 ⁻¹	48h : Absence	Germes<10 ⁴	Résultats conformes aux normes
	10 ⁻²	48h: Absence		
	10 ⁻³	48h: Absence		
Coliformes fécaux	10 ⁻¹	48h: Absence KV : Négatif	Germes<10	Résultats conformes aux normes
	10 ⁻²	48h: Absence KV : Négatif		
	10 ⁻³	48h : Absence KV : Négatif		
Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	10 ⁻¹	48h : 2 spores	Germes<10	Résultats conformes aux normes
	10 ⁻¹	48h : Absence		
	10 ⁻²	48h: Absence		
	10 ⁻²	48h: Absence		
Moisissures	10 ⁻¹	5j: Absence	Germes<10 ³	Résultats conformes aux normes
	10 ⁻²	5j: Absence		
	10 ⁻³	5j: Absence		
Salmonelles	10 ⁻¹	SFB I: Absence	Absence de germe	Résultats conformes aux normes
	10 ⁻²	SFB II: Absence		
	10 ⁻³	HEK I: Absence		

KV : Réaction de l'indole suite à l'addition de quelques gouttes de réactif de Kovacs, *SFB I/II* : premier/deuxième repiquage dans le bouillon au sélénite acide de sodium+ cystine , *HEK I*: Premier repiquage dans le milieu Hecktoen, *UFC* : Unité formant colonie.

La consommation des végétaux pose un problème de sécurité alimentaire dans la mesure où ces aliments consommés sont depuis longtemps reconnus comme sources de transmission de maladies infectieuses. Le nombre de cas associés aux végétaux a progressé au cours des dix dernières années. Ainsi une large gamme des plantes contaminées ont récemment causé d'importantes épidémies d'infections microbiennes. Celles-ci peuvent s'expliquer par différents facteurs : des changements dans les pratiques agricoles, une croissance de la consommation des phytomédicaments crus ou peu transformés, une augmentation des échanges internationaux et du nombre de consommateurs immunodéprimés [335].

3.5.2. Résultats de l'étude de toxicité aiguë *in vivo* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles *C.parqui*

Cette étude repose sur deux méthodes complémentaires. Les observations de ces tests toxicologiques réalisés sur les souris sont consignées quotidiennement ; ainsi que les signes de morbidité les plus importants, la mortalité, et l'étude macroscopiques des organes sont également notés.

3.5.2.1. Test de toxicité aiguë *in vivo* par la méthode des doses fixes – Ligne directrice n°420 de l'O.C.D.E.

3.5.2.1.1. Résultats de test préliminaire

a. 300 mg/kg *p.c.* (Une souris/ lot)

Les souris de tous les lots injectées par les différents extraits à 300 mg ainsi les lots témoins sont restés à leur état normal et aucun signe anormal n'est remarqué pendant les 14 jours des observations cliniques (Tableau 3.9).

b. 2000 mg/kg *p.c.* (Une souris/ lot)

L'augmentation de la dose de trois extraits pour chaque souris est recommandée lorsque la dose précédente est validée comme dose non toxique. D'après le tableau 3.9 ; Toutes les souris gavées par la dose de 2000 mg/kg *p.c.* mis sous surveillance pendant une autre durée de 14 jours n'ont présentées ni des signes de toxicité évidente ni de cas de mortalité.

Tableau 3.9 : Résultat du test préliminaire à 300 mg/kg p.c. et à 2000 mg/kg p.c. :

Signes de toxicité Dose fixée ; 01 souris par lot	Lot 01 EE-F		Lot 02 EEP-F		Lot 03 EA-F		Lot 04 E.D.S		Lot 05 H.M.	
	EP₃₀₀	EP₂₀₀₀	EP₃₀₀	EP₂₀₀₀	EP₃₀₀	EP₂₀₀₀	EP₃₀₀	EP₂₀₀₀	EP₃₀₀	EP₂₀₀₀
Mortalité	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Aspect de peau et de forure	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aspects des yeux et muqueuses	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Activité respiratoire	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aspect des selles et urines	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Agitation anormale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Horripilations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autre comportements bizarres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

EE-F : Extrait éthanolique de feuilles, EEP-F : Extrait étheropétrolique de feuilles, EA-F : Extrait aqueux de feuilles, NR : Etat normal, - : Absence, EP₃₀₀ : Etude préliminaire à 300 mg/kg p.c., EP₂₀₀₀ : Etude préliminaire à 2000 mg/kg p.c., E.D.S. : Eau distillée stérile, H.M. : Huile de maïs.

3.5.2.1.2. Résultats de l'étude principale

La dose de 2000 mg/kg *p.c.* est injectée à raison de cinq souris pour chaque extrait comme dose fixée et définitive pour cette étude principale, vue qu'elle n'a pas induit ni des effets nocifs ni de mortalité chez toutes les souris suivies pendant l'étape précédente de ce test.

Dans ce cadre ; le suivi des lots des sujets gavés ainsi des lots témoins traités par de l'eau distillée et l'huile de maïs pendant 14 jours, n'a provoqué aucune modification de l'état général des sujets et de changement de comportement par rapport aux souris témoins. Suite aux résultats obtenus ; les trois extraits sont classés alors selon le Système de Classification Globalement Harmonisé (SGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë à la catégorie 05 des substances non toxiques (ANNEXE 03) (Tableau 3.10).

Tableau 3.10 : Résultat de l'étude principale à 2000 mg/kg *p.c.* :

Signes de toxicité Dose fixée ; 05 souris par lot	Lot 01 EE-F	Lot 02 EEP-F	Lot 03 EA-F	Lot 04 E.D.S	Lot 05 H.M.
Mortalité	0%	0%	0%	0%	0%
Aspect de peau et de forure	NR	NR	NR	NR	NR
Aspects des yeux et des muqueuses	NR	NR	NR	NR	NR
Activité respiratoire	NR	NR	NR	NR	NR
Aspect des selles et des urines	NR	NR	NR	NR	NR
Agitation anormale	-	-	-	-	-
Salivation	-	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-	-
Horripilations	-	-	-	-	-
Autre comportements bizarres	-	-	-	-	-

L'intérêt pharmacologique de *C.parqui* nous a imposé cette approche préliminaire de sa toxicité orale en vue d'une part de son adaptation en tradithérapie, et d'autre part de sa richesse en alcaloïdes et en saponines connus comme substances toxiques à certaines doses. Le test de toxicité aiguë des trois extraits à 2000 mg/kg *p.c.* par la méthode des doses fixes a consisté d'une part sur le principe de minimiser le nombre des souris en respectant les droits éthiques de l'animal de laboratoire, et d'autre part de pratiquer l'expérience pendant une durée plus courte que celle des méthodes classiques.

3.5.2.2. Résultats de test de toxicité aigue *in vivo* par le test limite selon la ligne directrice n°423

Le test limite de toxicité aigüe d'une substance est recommandé soit lorsqu'aucune étude toxicologique est réalisée et confirmée, soit lorsqu'elle est connue comme produit inerte non toxique. Ce test limite vient d'un côté pour accomplir et optimiser les résultats obtenus dans le premier test ; et de l'autre côté de rassurer les données toxicologiques acquis ; dont le nombre des souris est augmenté à 06 souris par lots, et le suivi des souris ainsi l'observation macroscopiques des différents organes est réalisée pendant 15 jours. L'extrait aqueux est testé dans ce test avec deux concentrations exprimées en % (g/100ml), tandis que la concentration limitée à 2000 mg/ml *p.c.* est préparée à partir de l'EE-F et de l'EEP-F.

3.5.2.2.1. Résultats de l'observation clinique

L'observation clinique des différents lots est basée sur les mêmes critères du premier test ; prenant le pourcentage de mortalité en première attention, ainsi les principaux signes d'une toxicité évidente (Tableau 3.11). Aucune mortalité n'a été notée chez toutes les souris traitées; et qui n'ont présenté aucun signe de toxicité pendant les 15 jours d'observation.

Tableau 3.11: Observation clinique des lots traités :

Signes de toxicité	EA 10%	EA 20%	EE_{2000mg/kg}	EL_{2000mg/kg}	H.M.	E.D.S.
Mortalité	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Aspect de peau et de forure	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aspects des yeux et muqueuses	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Activité respiratoire	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aspect des selles et urines	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Agitation anormale	-	-	-	-	-	-
Salivation	-	-	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-	-	-
Horripilations	-	-	-	-	-	-
Autre comportements bizarres	-	-	-	-	-	-

3.5.2.2.2. Résultat de l'évolution du poids des souris (g)

En se basant sur la diminution du poids d'une souris comme un point témoignant d'une toxicité évidente ; le poids (g) des souris suivies est pris au 15^{ème} jour de l'expérience et comparé avec celui des lots témoins négatifs (ANNEXE 08).

La figure 3.40 : A, B, C1, et C2 montre que la différence entre la moyenne du poids des souris au J1 par rapport au J15 est hautement significative ($P=0.000$). La comparaison intragroupe des poids des souris traitées par rapport aux lots témoins par le test de Fisher (Minitab17) qu'on a pu constater que l'eau distillée et l'huile de maïs sont sans effet nocif sur l'état général des souris, et ils sont considérés étant comme de bons solvants inertes.

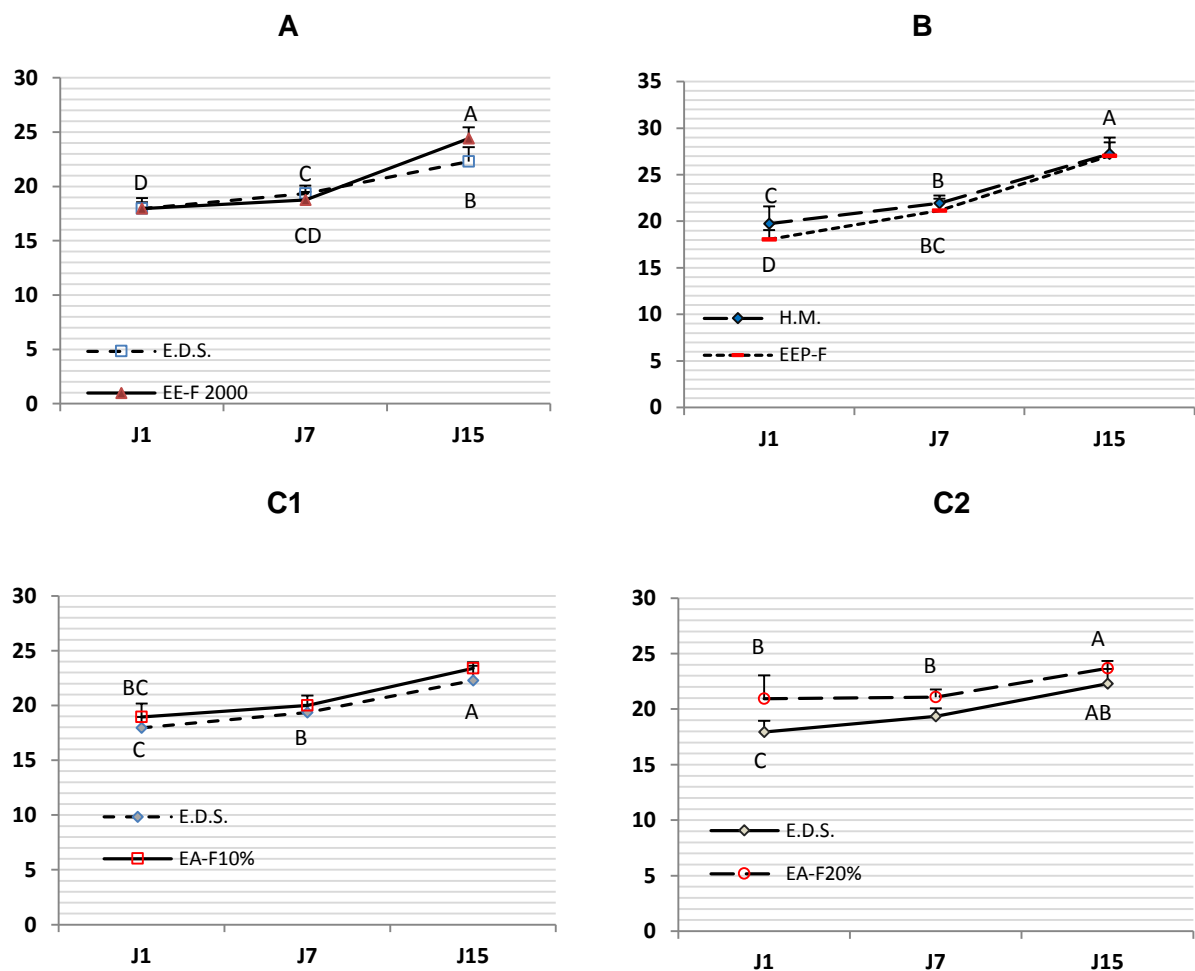


Figure 3.40 : Comparaison intragroupe de poids des souris traitées.

A : EE-F, B : EEP-F, C1 : EA-F 10%, et C2 : EA-F 20%.

D'une autre part, la comparaison globale intergroupe par le test de Fisher des moyennes des poids des souris de tous les lots traités (Figure 3.41), a montré que les souris injectées par l'EEP-F ont présenté une prise du poids importante précisément à partir du J7 ; cette différence peut être liée probablement à l'apport nutritionnel de l'EEP-F qui est riche en stérols et en acide gras (Résultats du screening chimique).

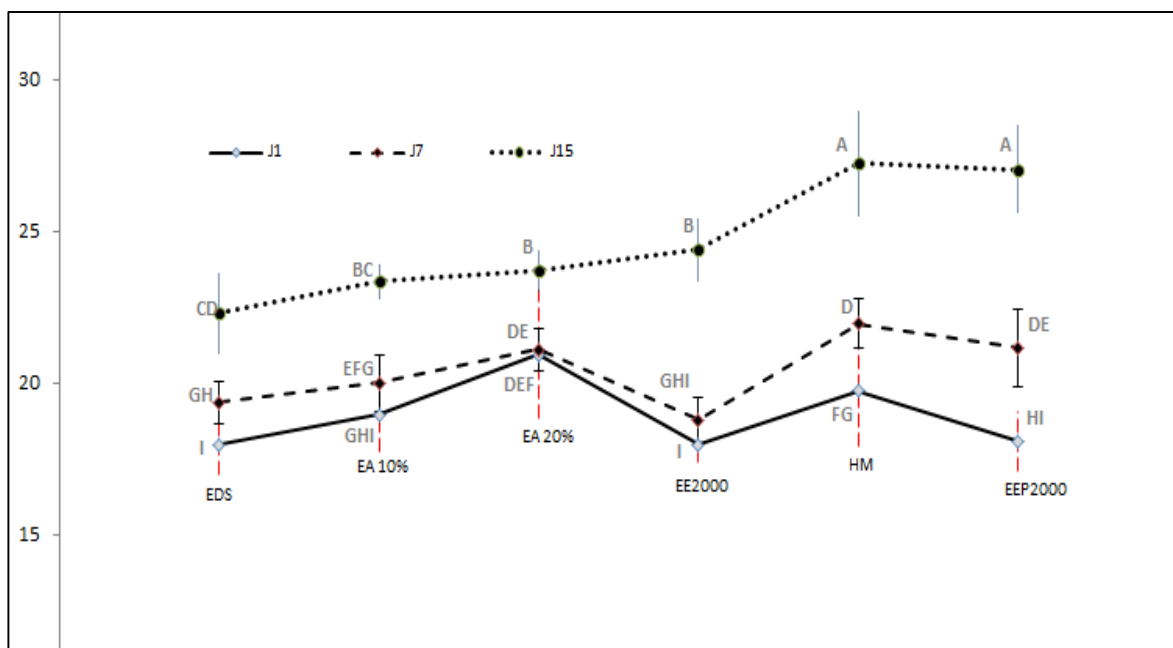


Figure 3.41 : Comparaison globale intergroupe entre les moyennes de poids des souris (Regroupement par le Test de Fisher).

EDS : Eau distillée stérile, EA : Extrait aqueux, EE : Extrait éthanolique, EEP : Extrait étheropétrolique.

3.5.2.2.3. Résultats de l'étude macroscopique des organes

D'une façon générale ; la comparaison de l'aspect général des organes des lots traités (hypertrophie, rougeur, saignements internes ...) (Photo 3.42) (ANNEXE 08), et de leurs poids par rapport aux lots témoins, sont les critères de base sur lesquels on a pu supposer qu'il n'y a pas eu une atteinte physiopathologique probablement due aux extraits injectés (Figure 3.43, 45, 46, 47 ,et 48) , par contre une différence hautement significative ($P=0.000$) entre les valeurs des médianes et des moyennes des poids du foie a été notée dans tous les lots étudiés (Figure 3.44 : A, B, C1, et C2).

En revanche, une différence très faiblement significative est notée entre la moyenne du poids du cerveau des souris de lot traité par l'EEP-F à 2000 mg/kg par rapport au lot témoin (Huile de maïs), avec un $P=0.727$ (Figure 3.46), et entre le poids des cœurs des souris gavées par l'EA-F10% ($P=0.664$) comparativement aux témoins (Eau distillée stérile) (Figure 3.46, et 47).



Photo 3.42 : Souris disséquée (Gauche) et organes prélevés (Droite) (Originale).

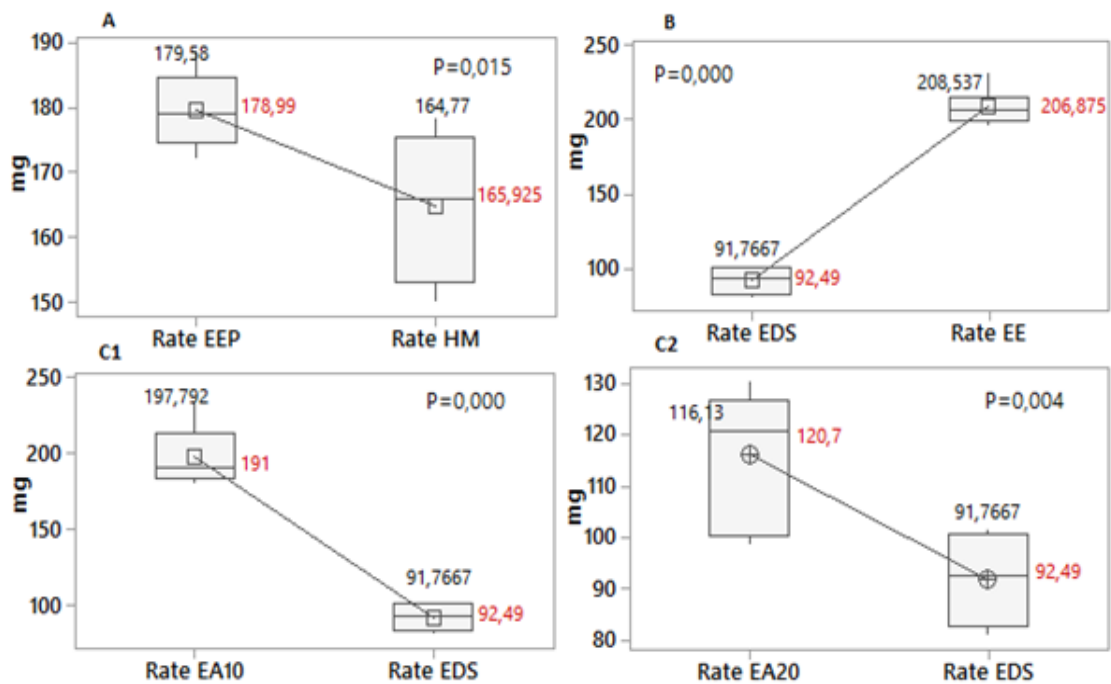


Figure 3.43 : Comparaison intragroupe des poids des rates des lots traités par rapport aux lots témoins.

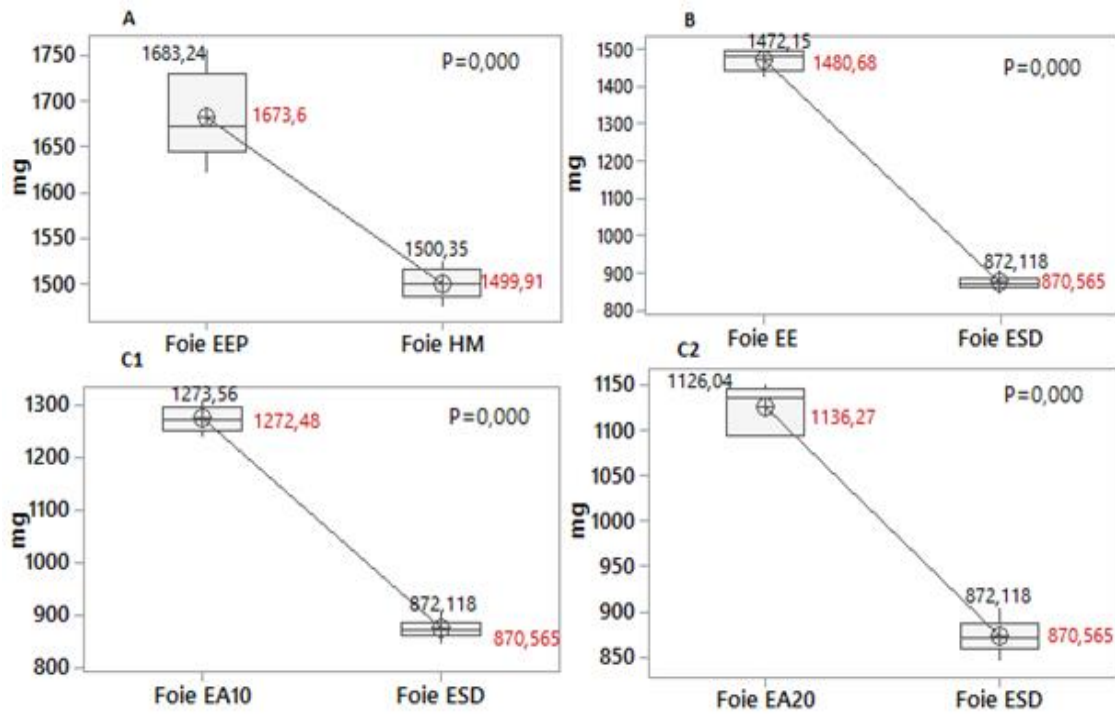


Figure 3.44 : Comparaison intragroupe des poids des foies des lots traités par rapport aux lots témoins.

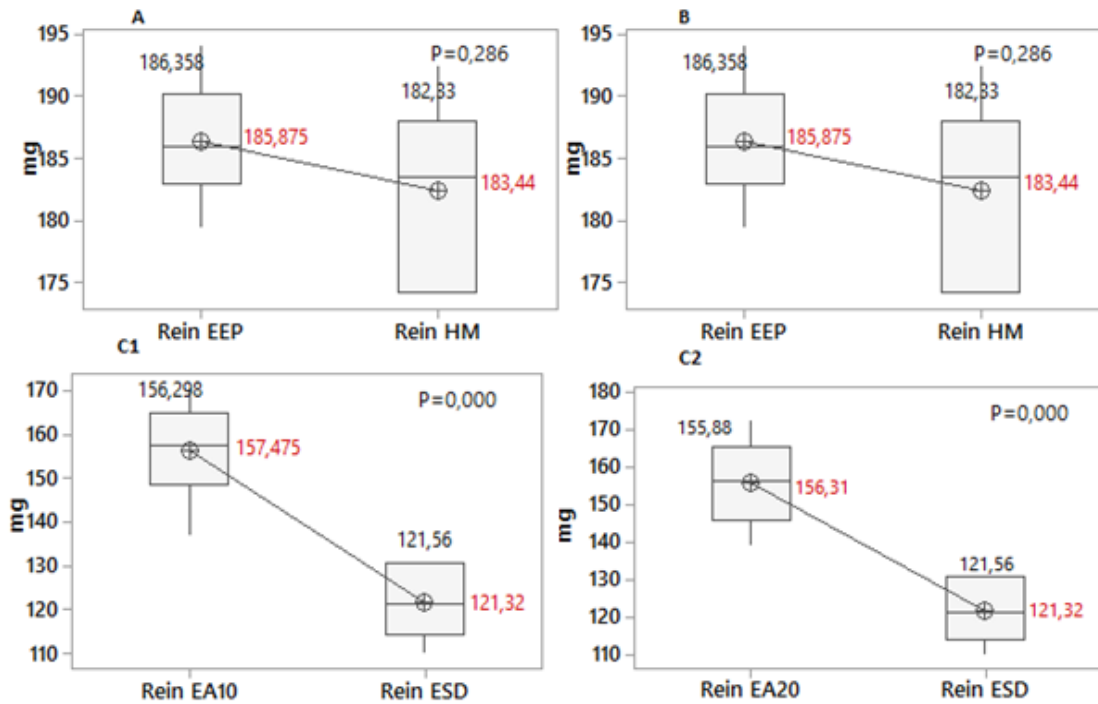


Figure 3.45 : Comparaison intragroupe des poids des reins des lots traités par rapport aux lots témoins.

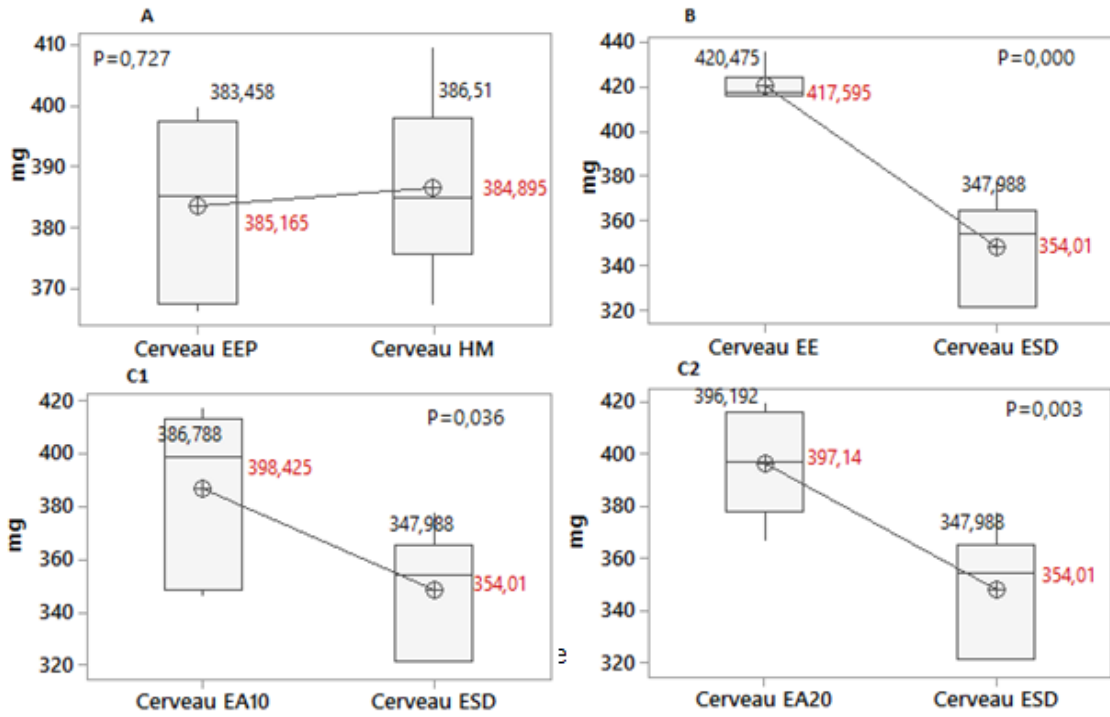


Figure 3.46 : Comparaison intragroupe des poids des cerveaux des lots traités par rapport aux lots témoins.

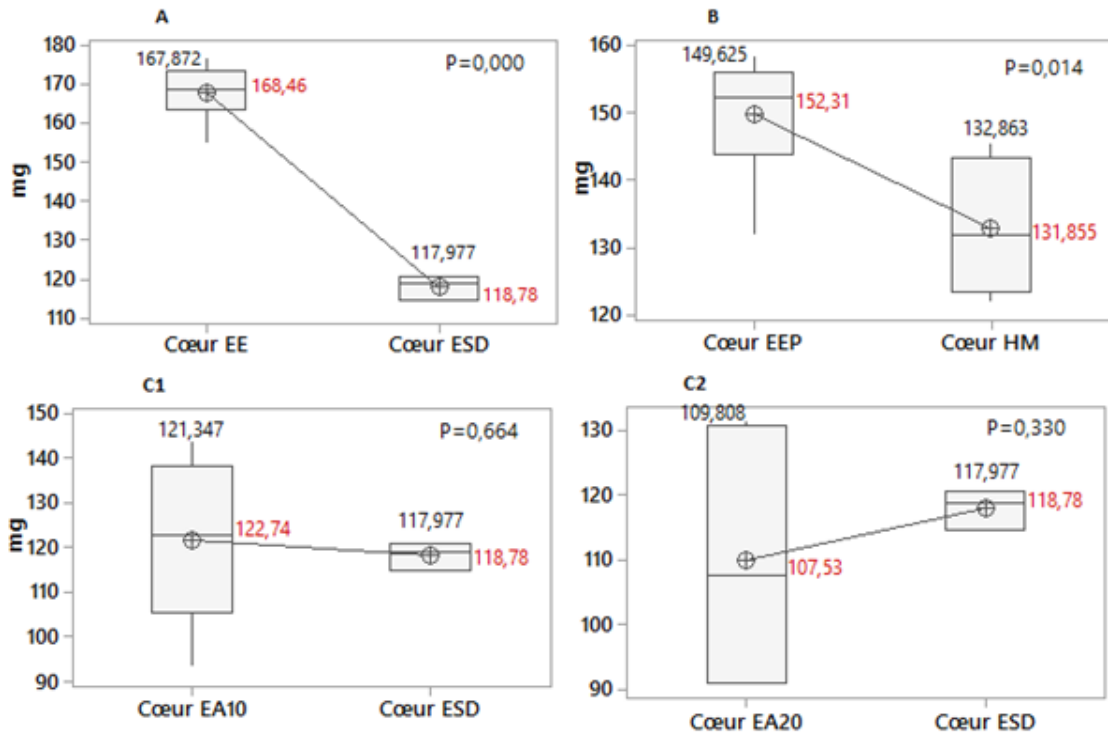


Figure 3.47 : Comparaison intragroupe des poids des cœurs des lots traités par rapport aux lots témoins.

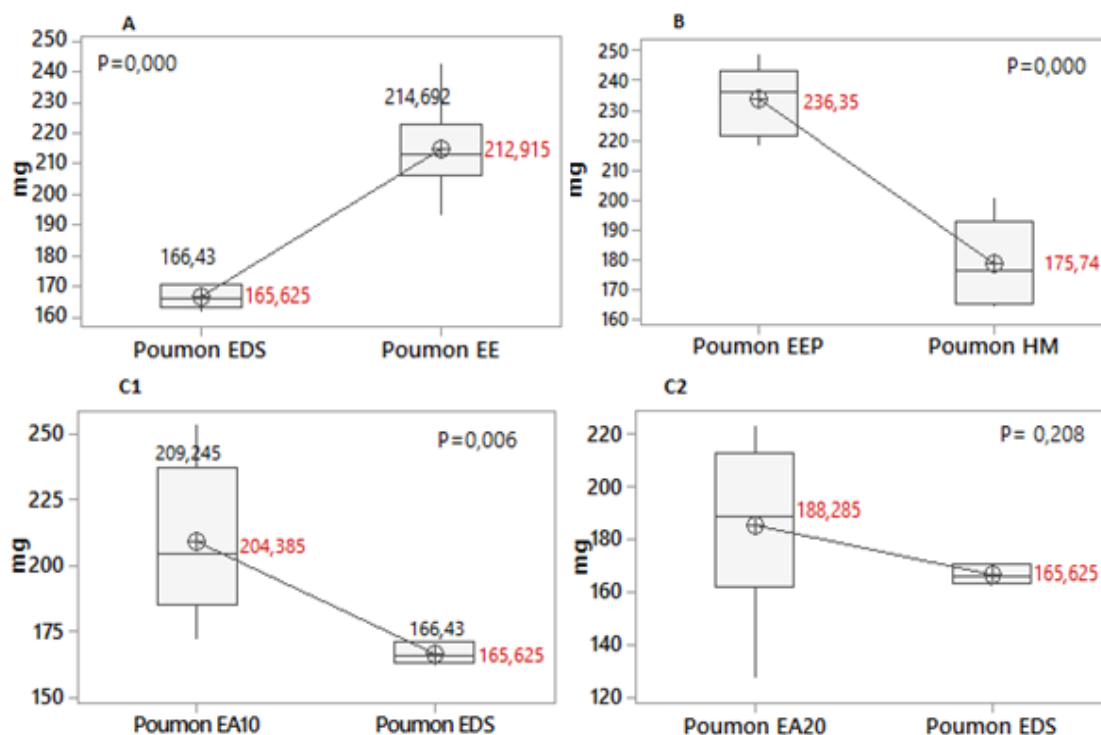


Figure 3.48 : Comparaison intragroupe des poids des poumons des lots traités par rapport aux lots témoins.

Selon les résultats de toxicité présentés par les deux méthodes (ANNEXE 08); les doses choisies des extraits sont révélées infratoxiques ; d'où la nécessité d'optimiser ces données par d'autres exploitations *in vivo* plus poussées et plus détaillées précisément sur l'hépatotoxicité induite par *C. parqui*.

Il a été montré que l'intensité de l'intoxication des animaux dépend de la quantité et de la durée de consommation du *Cestrum parqui* ; dont l'atteinte rénale, intestinale, et hépatique sont les principaux signes de toxicité les plus constatés [84], [106]; [107], [108], [139], bien qu'il a été déterminé que la dose létale pour les bovins est de 20 à 30 g/kg du corps corporelle : un veau est mort 48 heures après ingestion de 30 g (poids humide) de la plante / kg de poids corporel [109].

Le parquine ; un type d'alcaloïde, et les saponines sont les substances les plus probablement responsables de ce genre de toxicité [09]. L'étude de comparaison entre la toxicité chez les animaux et les êtres humains doit être bien se mettre en grande évidence ; l'unique étude réalisée par [336] en Chilie, sur la toxicité aiguë sur souris a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. parqui* s'est avéré non toxique à 11 et 12g/kg p.c.

3.5.3. Résultats de l'activité antileishmanienne *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

Compte tenu de la complexité des processus antileishmanien selon les recherches bibliographiques, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antiparasitaire d'un échantillon. Notre choix est porté donc sur l'utilisation de deux méthodes différentes et complémentaire sur deux souches différentes à fin de valider et de combiner les réponses obtenues.

3.5.3.1. Résultats de l'activité antileishmanienne *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* sur *Leishmania major* LIPA 100/09 et *Leishmania infantum* LIPA 15/05 par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan à 0.4% (BT)

Dans un premier temps, il est nécessaire de mentionner que le très faible effet antiparasitaire de pourcentage de DMSO (0.5%) utilisé pour la solubilisation des différents produits dans le RPMI a été négligé et pris en considération pour se rapprocher de l'effet réel de chaque produit testé (Tableau 3.12).

Tableau 3.12 : Effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération parasitaire par la méthode de BT :

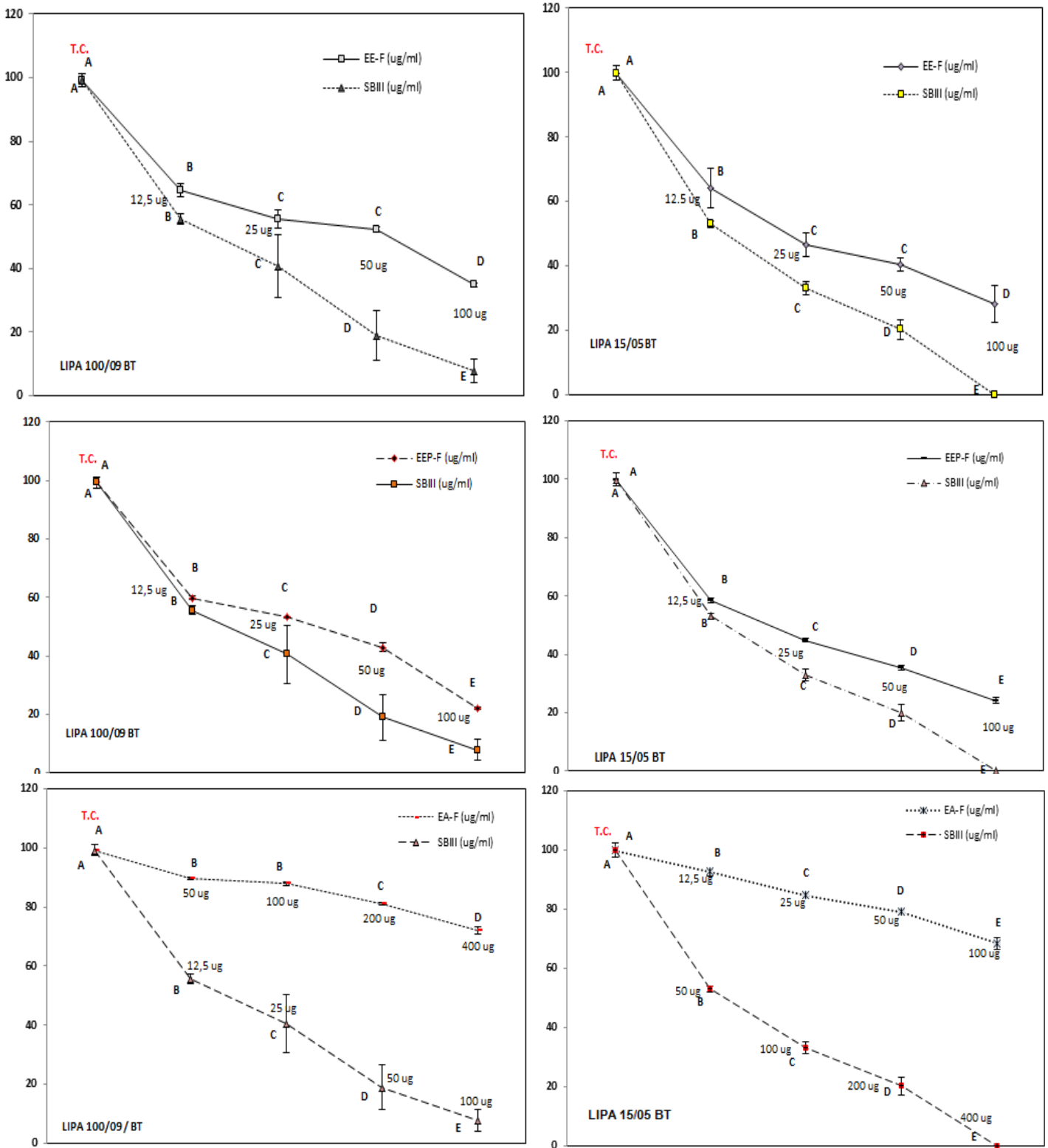
Lots	Valeur de P	% Vitalité**	IC 95%
<i>L. major</i>	P= 0.562	100,0 ^A ± 0,0	(97,7; 102,3)
<i>L. major</i> + DMSO 0.5%	P= 0.562	99,27 ^A ± 2,00	(97,00; 101,54)
<i>L. infantum</i>	P= 0.958	100,0 ^A ± 0,0	(97,3; 102,7)
<i>L. infantum</i> + DMSO 0.5%	P= 0.958	99,92 ^A ± 2,39	(97,22; 102,63)

L : *Leishmania*, X^A : Comparaison des moyennes par le test de regroupement de Fisher, IC : Intervalle de confiance.

La concentration de DMSO de 0.5 % dans le RPMI1640 n'a pas induit une différence significative sur la croissance parasitaire des deux souches (P>0.5) ; ce qui nous ramène à dire que son effet est fortement faible à inexistant. La concentration de DMSO recommandée dans ce genre de préparation physiologiques est inférieure à 1% ; mais ça nous a pas empêché de testé notre concentration utilisée dans cette partie de notre travail.

D'après la figure ci-dessous, on peut constater que l'effet antileishmanien de tous les produits sur le taux de vitalité (%) sur les deux souches de *Leishmania* (Annexe 09) est dose-dépendant avec une différence hautement significative ($P=0.000$) des pourcentages de vitalité parasitaire induits par les différentes concentrations de chaque produit (Tableau 3.13).

Suite à la visualisation de la figure 3.70 et le tableau 3.13 ; il est clair de dire que le SBIII a été le produit antileishmanien le plus marqué avec des faibles CI50 (09.64 et 04.29 ug/ml vis-à-vis la LIPA 100/09 et la LIPA 15/05 respectivement), de plus, une inhibition totale de LIPA 15/05 a été induite par sa concentration de 75 ug/ml. Le test de regroupement effectué sur l'EE-F et l'EA-F par la comparaison intragroupe la méthode de Fisher nous a indiqué qu'il a une similarité de l'effet antileishmanien entre quelques doses testées du même extrait (entre 25 et 50 ug de l'EE-F, et entre 50 et 100 ug de l'EA-F), ce qui explique leur faible pouvoir inhibiteur par rapport à l'EEP-F qui a montré une réponse fortement dose-dépendante (% de vitalité), ainsi une activité inhibitrice prononcée sur les deux souches testées, avec des CI50 plus inférieurs aux deux autres extraits (Figure 3.49, Tableau 3.13).



T.C. : Test de contrôle. A, B, C, D...: Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17)

Figure 3.49 : Effet antileishmanien de l'EE-F, l'EEP-F, l'EA-F, et le SBIII sur la vitalité de la LIPA 100/09 et la LIPA 15/05 par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan (BT) 0.4%.

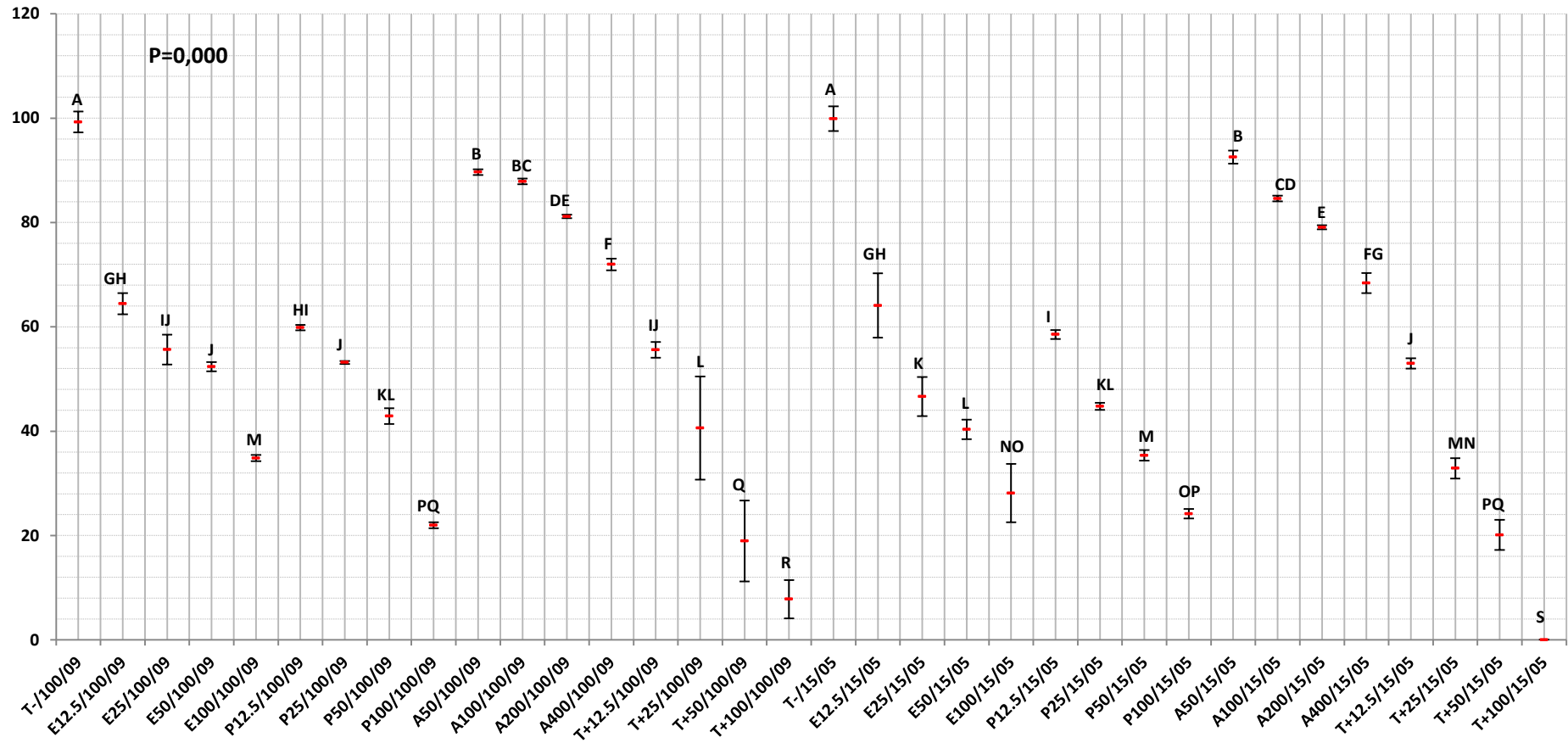
Tableau 3.13 : Résultats des CI50 des différents produits par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan 0.4% :

Produits	Souche	Valeur de P	Equation de la courbe	R ²	CI50% (ug/ml)
SBIII	L.100/09	<i>P=0.000</i>	$Y = 54.99 - 0.5176 \times (X)$	-0.897	09.64
	L.15/05	<i>P=0.000</i>	$Y = 52.37 - 0.5518 \times (X)$	-0.956	04.29
EE-F	L.100/09	<i>P=0.000</i>	$Y = 66.62 - 0.3156 \times (X)$	-0.974	52.66
	L.15/05	<i>P=0.000</i>	$Y = 61.52 - 0.3567 \times (X)$	-0.884	32.29
EEP-F	L.100/09	<i>P=0.000</i>	$Y = 64.50 - 0.4272 \times (X)$	-0.998	33.94
	L.15/05	<i>P=0.000</i>	$Y = 57.39 - 0.3556 \times (X)$	-0.943	20.78
EA-F	L.100/09	<i>P=0.000</i>	$Y = 92.35 - 0.05166 \times (X)$	-0.993	819.78
	L.15/05	<i>P=0.000</i>	$Y = 93.17 - 0.06412 \times (X)$	-0.972	673.26

SBIII : antimoine trivalent ; témoin de référence, *EE-F* : Extrait éthanolique de feuilles, *EEP-F* : Extrait étheropétrolique de feuilles, *EA-F* : Extrait aqueux de feuilles, *L.100/09* : *Leishmania major*, *L.15/05* : *Leishmania infantum*, *R²* : Coefficient de corrélation, *CI50* : concentration inhibitrice de 50% de la charge parasitaire

Cependant, la faible activité observée est celle de l'infusé, d'ailleurs, les parasites ont pu atteindre un pourcentage de vitalité trop élevé (> 70%) même en présence des fortes concentrations de ce dernier, bien que les CI50 exprimées sur les deux souches sont fortement supérieures (CI50 >400 ug/ml). Etant donné les valeurs de toutes les concentrations inhibitrices (CI50) observées dans le tableau 3.13, sur les deux souches testées ; on retient que *Leishmania infantum* est la souche la plus sensible vis-à-vis de tous les produits étudiés. De même, et au vue de la figure 3.50, qui représente une comparaison intergroupe des différents effets de tous les produits par le test de Fisher (Minitab17) ; on retient qu'il n'y a pas une différence de la croissance parasitaire de deux souches testées dans le test de contrôle ; ceci prouve que ces souches ont une croissance cinétique exponentielle similaire ; une telle différence de cette concentration de l'une de ces souches au cours de l'expérience est fortement liée aux effets de l'un des produits misent en contacte.

L'EEP-F s'est révélé le meilleur extrait, d'ailleurs la comparaison de son effet sur les deux souches par rapport à celui de SBIII a dévoilé une similarité du pouvoir inhibiteur beaucoup plus marquée entre 100 ug/ml de l'EEP et 50 ug/ml de SBIII, et entre 50 ug/ml de l'EEP et 25 ug/ml du SBIII (Figure 3.50).



T- : RPMI1640+DMSO 0.5%, E : Extrait éthanolique, P : Extrait éthéréopétrolique, A : Extrait aqueux, A+ : SBIII, A, B, C, D... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17).

Figure 3.50 : Résultats de comparaison intergroupe de pourcentage de vitalité (%) de LIPA 100/09 et LIPA 15/05 vis-à-vis les produits testés par la méthode de l'inclusion par le bleu de Trypan 0.4%.

3.5.3.2. Résultats de l'activité antileishmanienne *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* sur *Leishmania major* LIPA 100/09 , et *Leishmania infantum* LIPA 15/05 par la méthode de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT

Les deux méthodes réalisées dans cette activité ont une expression des résultats inversée ; la coloration des parasites par le test de l'inclusion par le bleu de Trypan (BT) donne un pourcentage de vitalité des parasites (cellules vivantes incolores comptées), par contre celle du MTT nous donne le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire (taux de Formazan formé par les cellules vivantes) ; ceci explique la croissance (MTT) et la décroissance (BT) des graphes affichés.

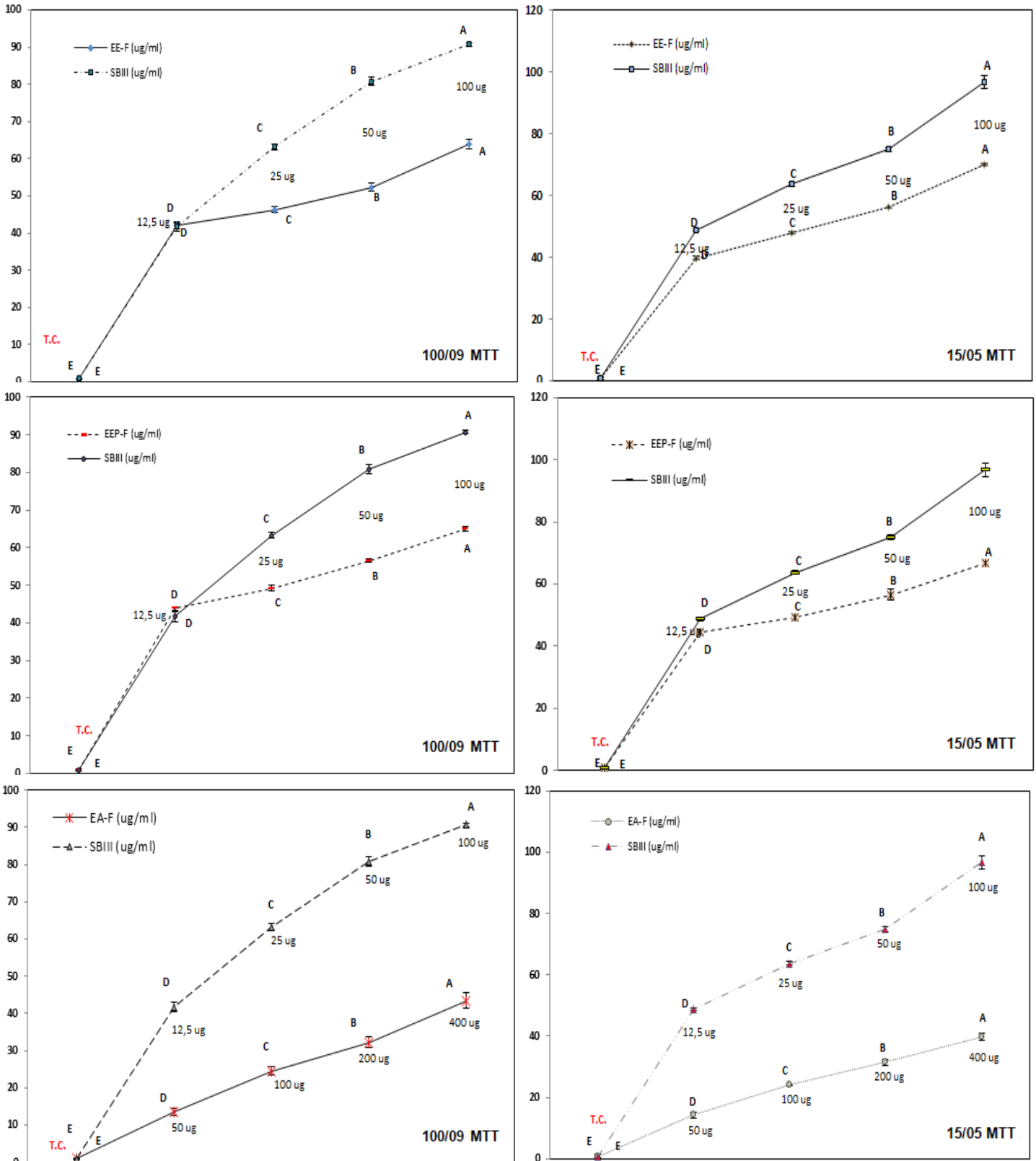
Le test de contrôle de DMSO à 0.5% sur la prolifération parasitaire est achevé par la méthode colorimétrique du MTT ; le tableau 3.14 illustre les pourcentages d'inhibition des différents lots testés.

Tableau 3.14 : Effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération parasitaire des deux souches par la méthode de MTT :

Lots	Valeur de P	% Inhibition**	IC 95%
<i>L. major</i>	P=0.000	00 ^B ± 0.00	(-0,164201; 0,164201)
<i>L. major</i> + DMSO 0.5%	P=0.000	0,89 ^A ± 0,18	(0,7283; 1,0567)
<i>L. infantum</i>	P=0.009	00 ^B ± 0.00	(-0,391570; 0,391570)
<i>L. infantum</i> + DMSO 0.5%	P=0.009	0,87 ^A ± 0,45	(0,478; 1,262)

L : *Leishmania*, X^A : Comparaison des moyennes par le test de regroupement de Fisher, IC : Intervalle de confiance.

La comparaison des moyennes par le test de regroupement a révélé qu'il y a une légère différence significative entre la prolifération des parasites seules et ceux mis en contact avec 0.5% de DMSO ; cette différence est probablement due à la haute sensibilité de ce test colorimétrique qui se base sur l'activité réelle enzymatique des parasites vivantes au lieu de la visualisation classique à l'œil nu des parasites vivantes par la méthode de BT (ANNEXE 09).



T.C. : Test de contrôle. A, B, C, D...: Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17.)

Figure 3.51 : Effet antileishmanien de l'EE-F, l'EEP-F, l'EA-F, et le SBIII sur le % de l'inhibition de la LIPA 100/09 et la LIPA 15/05 par la méthode de réduction des sels de tétrazolium ; MTT.

Selon la figure 3.51, l'effet antileishmanien de tous les produits testés par la méthode de MTT est énoncé fortement dose-dépendant, avec une différence hautement distinctive ($P=0.000$) des différents effets des différentes concentrations testées (Tableau 3.15).

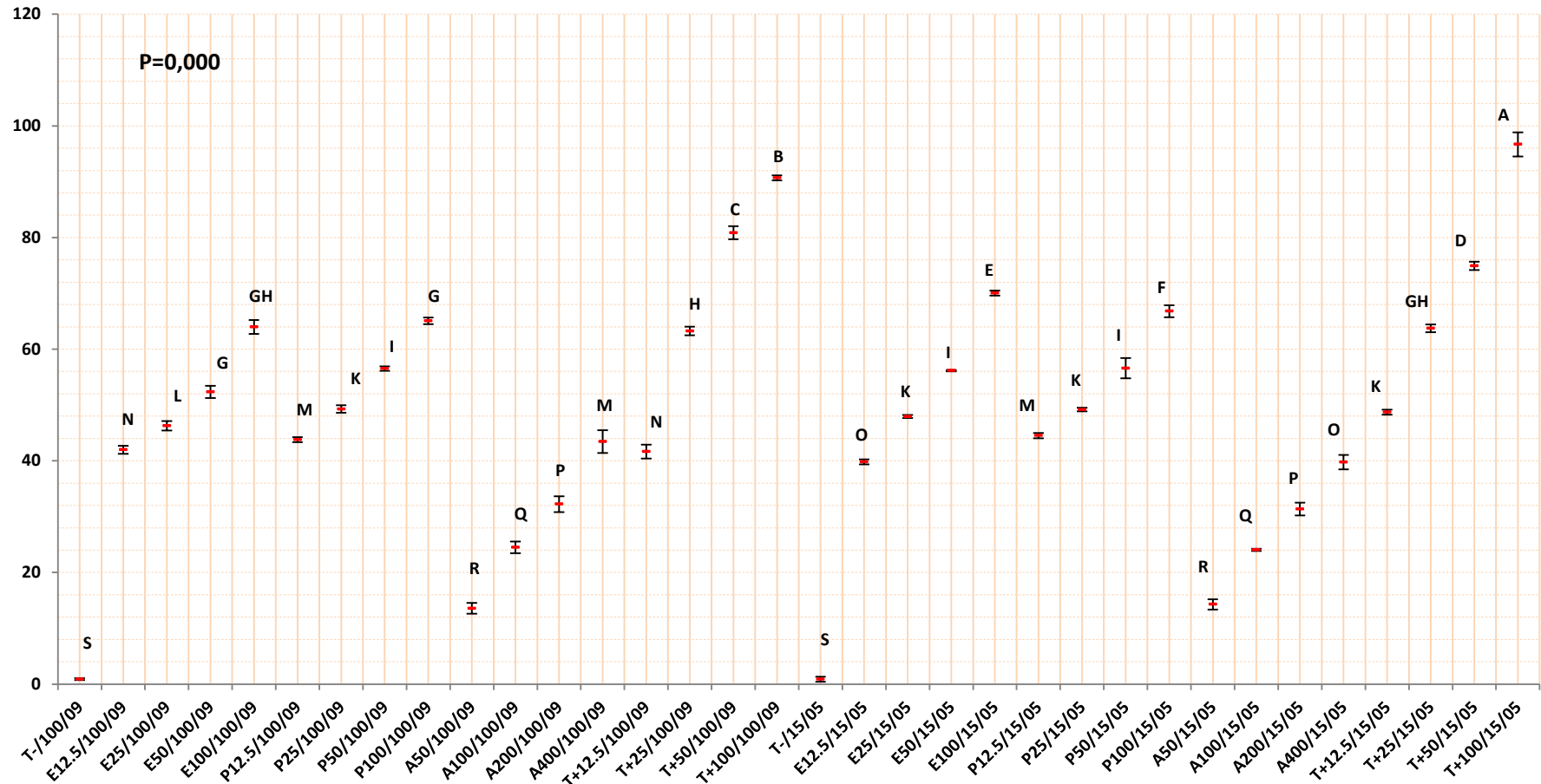
L'action antileishmanienne de SBIII a été l'action la plus manifestée par rapport aux extraits testés de feuilles de *C.parqui*, avec des CI50 inférieures à 10 µg/ml; bien que la concentration de 12.5 µg/ml de l'EE-F et l'EEP-F a induit une inhibition comparable sur *Leishmania major* LIPA 100/09 à celle de la même concentration du SBIII (Figure 3.51); cela nous a orienté de constater le pouvoir inhibiteur important de ces deux extraits même à faibles concentrations.

D'autre part, et selon les valeurs des CI50 affichées dans le tableau 3.15, on peut dire que les différents produits ont gardé le même ordre d'efficacité que celui dédié par la méthode précédente (BT); d'où l'EEP-F a resté l'extrait le plus actif avec une CI50 importante sur *Leishmania infantum* LIPA 15/05 (29.74 µg/ml).

Tableau 3.15 : Résultats des CI50 des différents produits par la méthode de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT :

Produits	Souche	Valeur de P	Equation de la courbe	R ²	CI50% (µg/ml)
SBIII	L.100/09	$P=0.000$	$Y= 45.58+0.5019 \times (X)$	0.901	08.80
	L.15/05	$P=0.000$	$Y= 47.01+0.5122 \times (X)$	0.980	05.83
EE-F	L.100/09	$P=0.000$	$Y= 39.59+0.2466 \times (X)$	0.993	42.20
	L.15/05	$P=0.000$	$Y= 38.07+0.3290 \times (X)$	0.988	36.26
EEP-F	L.100/09	$P=0.000$	$Y= 42.71+0.2339 \times (X)$	0.980	31.16
	L.15/05	$P=0.000$	$Y= 42.59+0.2491 \times (X)$	0.986	29.74
EA-F	L.100/09	$P=0.000$	$Y= 13.76+0.0782 \times (X)$	0.955	463.13
	L.15/05	$P=0.000$	$Y= 14.92+0.0663 \times (X)$	0.945	528.39

SBIII : antimoine trivalent ; témoin de référence, EE-F : Extrait éthanolique de feuilles, EEP-F : Extrait étheropétrolique de feuilles, EA-F : Extrait aqueux de feuilles, L.100/09 : *Leishmania major*, L.15/05 : *Leishmania infantum*, R² : Coefficient de corrélation, CI50 : concentration inhibitrice de 50% de la charge parasitaire.



T- : RPMI1640+DMSO 0.5%, E : Extrait éthanolique, P : Extrait étheropétrolique, A : Extrait aqueux, A+ : SBIII, A, B, C, D... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17.)

Figure 3.52: Résultats de comparaison intergroupe de pourcentage de vitalité (%) de LIPA 100/09 et LIPA 15/05 vis-à-vis les produits testés par la méthode de réduction des sels de Tétrazolium ; MTT.

Selon la comparaison intergroupe des différents effets des différents produits illustrée sur la figure 3.52 par le test de regroupement, on peut confirmer que l'EEP-F a réagi généralement d'une façon semblable sur les deux souches de *Leishmania* testées; tandis que qu'il a y avait une différence de l'effet antileishmanien de l'EE-F sur les deux souches testées.

Tableau 3.16 : Index de sélectivité (IS) des extraits de feuilles de *C.parqui* par les deux méthodes :

Extraits	Souches	IS/BT	IS/MTT	Interprétation*
EE-F	<i>L. major</i> 100/09	16.81	20.02	Sélectif sur le parasite
	<i>L. infantum</i> 15/05	27.42	25.63	Sélectif sur le parasite
EEP-F	<i>L. major</i> 100/09	12.30	13.86	Sélectif sur le parasite
	<i>L. infantum</i> 15/05	20.10	14.52	Sélectif sur le parasite
EA-F	<i>L. major</i> 100/09	4.35	6.98	Sélectif sur le parasite
	<i>L. infantum</i> 15/05	5.30	6.12	Sélectif sur le parasite

L. : *Leishmania*, *IS* : Index de sélectivité, *BT* : méthode de l'inclusion au bleu de Trypan, *MTT* : Méthode colorimétrique de MTT,* : Si $IS > 1$: l'extrait a une action parasitaire plus que cytotoxique, et si $IS < 1$: L'extrait est cytotoxique qu'antiparasitaire.

Les données affichées sur le tableau 3.16, suggèrent que tous les extraits de feuilles sont sélectifs sur les parasites testés et qui ont une action parasitaire plus que cytotoxique ; ces résultats nous aident de se rapprocher de plus en plus aux bioformulations des remèdes à base de *C.parqui*. Dans le cadre de la juxtaposition des résultats obtenus par les deux méthodes ; on peut conclure que la reproductibilité du test antileishmanien est assurée suite aux valeurs rapprochées des CI50 de chaque produits testés.

Le traitement topique des blessures provoquées par la leishmaniose indique que la maladie n'est pas reconnue comme infection systémique par le parasite, mais comme une épidémie des plaies et les surinfections qui surviennent; par conséquent, le *C.parqui* comme il est couramment utilisé pour désinfecter et guérir les blessures aussi il est appliqué par les populations pour traiter la leishmaniose [397], [94]. Les résultats obtenus dans ce travail confirment l'utilité traditionnelle de feuilles de de *C.parqui* contre l'infection par les Leishmanies.

La richesse des extraits de feuilles de *C.parqui* en composés actifs révélés par le screening chimique et l'analyse spectrophotométrique, nous a inspiré de rechercher si la synergie entre ces molécule peut avoir un effet antiparasitaire ou

non ; un extrait total renferme de très nombreuses molécules, et lorsqu'ils sont testées séparément peuvent n'avoir que très peu d'activité. Dans le cas des molécules possédant des effets synergiques (activités contre le parasite sur une même voie métabolique) ou des effets de potentialisation (activités contre le parasite sur des voies différentes et complémentaires), nous observons une activité antiparasitaire plus importante lorsque ces molécules sont testées ensemble. La purification de tels composés ne conduit donc pas à une concentration linéaire de l'activité [337].

Les produits antileishmaniens de référence ont une action inhibitrice soit sur la synthèse de l'ADN, soit sur l'oxydation glycolytique, ou sur celle des acides gras, de plus ils ne sont actifs *in vivo* qu'après conversion en antimoine trivalent (comme le SBIII), Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite, enzyme présente seulement chez le parasite [132] ; L'action antileishmanienne d'un des extraits testés peut se dérouler par une de ces réactions inhibitrices.

Plusieurs travaux ont déjà été publiés au sujet des métabolites végétaux actifs sur *Leishmania*. Malgré la richesse des espèces de *Cestrum* en molécules connues comme antiparasitaire mais peu de travaux sur l'activité antiprotozoaire ont été réalisées [319], [338]. Il est démontré que ce genre est riche en saponines, alcaloïdes, lactones, chalcones, et en terpénoïdes; qui pourraient être responsables de l'activité antileishmanienne [339], [340], [341]; [344], [345].

D'après [290], [291] ; un extrait brut a une activité leishmanicide si la CI50 est inférieure à 400 ug/ml ; les résultats obtenus dans ce travail montre que l'EA-F est non actif sur les deux souches testées, tandis que l'EE-F et l'EEP-F se sont révélés de bons agents antileishmaniens, avec des CI50 inférieures à 55 ug /ml.

En effet, une très bonne activité leishmanicide d'un produit s'exprime par une CI50 inférieure à 25 ug/ml [292], [293]; sur cet échelle, on peut dire que l'EEP-F est un très bon extrait leishmanicide principalement sur *Leishmania infantum* LIPA 15/05. La richesse de l'EEP-F en composé, terpéniques, isopréniques, et stéroïdiques confère à ce dernier un pouvoir antileishmanien plus marqué que ceux de l'EE-F et l'EA-F ; en interagissant avec l'ergostérol de la membrane parasitaire par affinité structurelle [338], [344].

3.5.4. Résultats de test de cytotoxicité *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui* sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire d'origine leucocytaire ; les *Thp1* par la méthode de l'inclusion au bleu de Trypan à 0.4% (BT) et la méthode de réduction des sels de Tétrazoliums, MTT

L'approche cytotoxicologique des extraits de feuilles de *C. parqui* sur un modèle cellulaire humain monocyttaire d'origine leucocytaire est réalisée à fin d'atteindre des objectifs principaux :

Le premier consiste à évaluer le pouvoir cytotoxique de feuilles de *C.parqui* sur une lignée cancéreuse, et de raccorder les résultats à l'utilisation traditionnelle trouvé dans la littérature de *C.parqui* contre le cancer [311], alors que le second objectif est basé sur la détermination de l'index de sélectivité (IS) des extraits de feuilles. Cet index nous aide à déterminer si un de ces extraits testés est beaucoup plus parasitaire que cytotoxique sur les macrophages issus d'une transformation des monocytes misent en contact avec des différentes concentrations des extraits (l'EE-F, l'EEP-F, et l'EA-F) ; sachant que les macrophages sont la première barrière qui s'oppose contre le parasite de *Leishmania* au début de l'infection chez l'homme [118], [121]. La détermination de la sélectivité des différentes molécules grâce au calcul de l'index de sélectivité est selon la formule suivante : $IS = CC_{50}cellule / CI_{50} parasite$. Si la valeur de l'IS est supérieure à l'unité, le composé étudié est considéré comme sélectif sur les parasites. En revanche, si l'IS est inférieur à l'unité, le composé en question est plus cytotoxique qu'antiparasitaire [346].

L'effet de DMSO à 0.5% sur la prolifération cellulaire des *Thp1* est pris en considération par les deux méthodes; pour négliger son faible effet inhibiteur, à fin de se rapprocher aux effets réels des différents produits testés (ANNEXE 10).

Nous avons procédé à l'évaluation de l'aspect microscopique sous microscope inversé (20 × 0,4) et le comptage des cellules colorées au bleu de Trypan à 0.4 % des cultures cellulaires de 48h qui ont montré qu'il n'y pas une différence ni de charge cellulaire ni de morphologie cellulaire entre les *Thp1* cultivées seules et celles misent en contact avec 0.5% de DMSO (Photo 3.53).

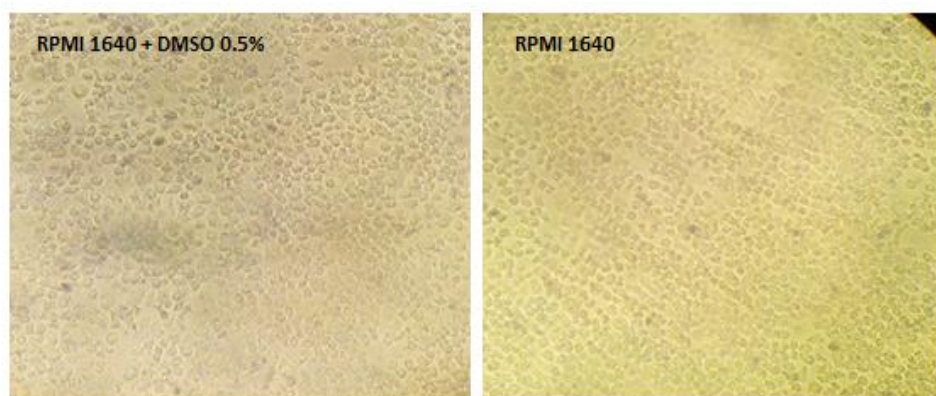


Photo 3.53 : Effet de DMSO à 0.5% sur les *Thp1* (20x0,4) (Originale).

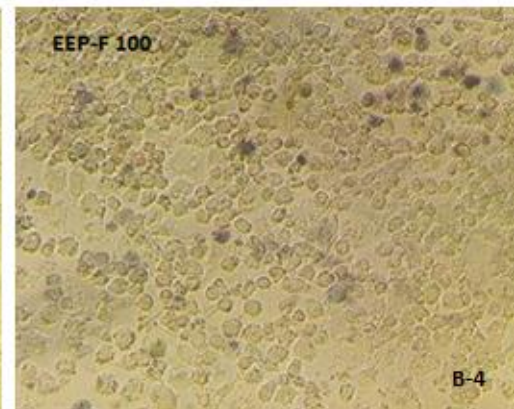
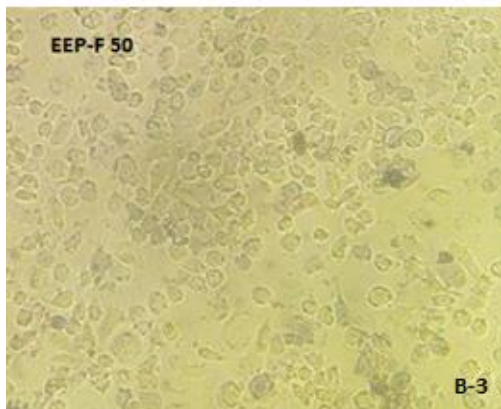
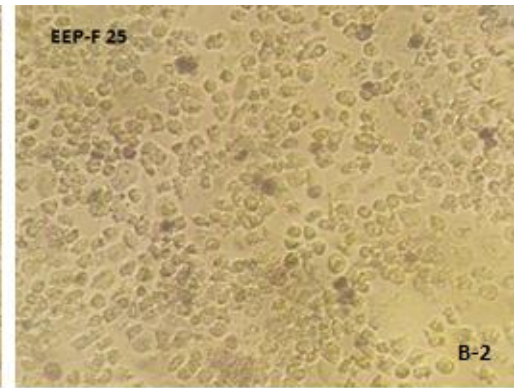
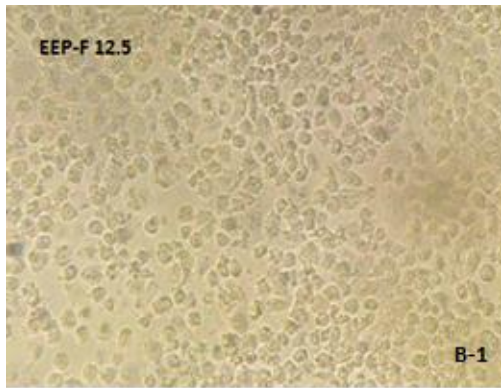
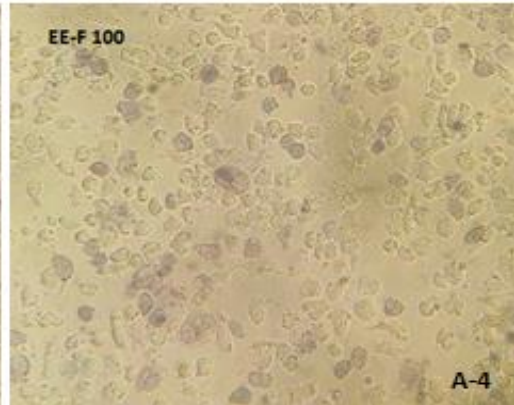
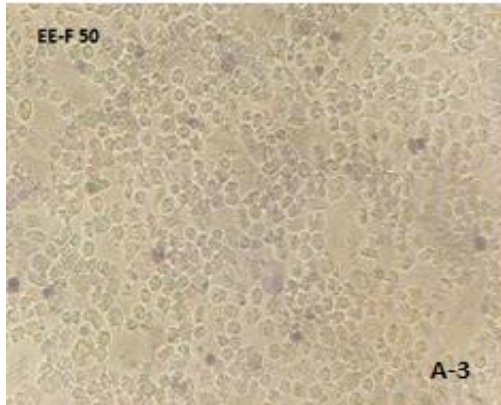
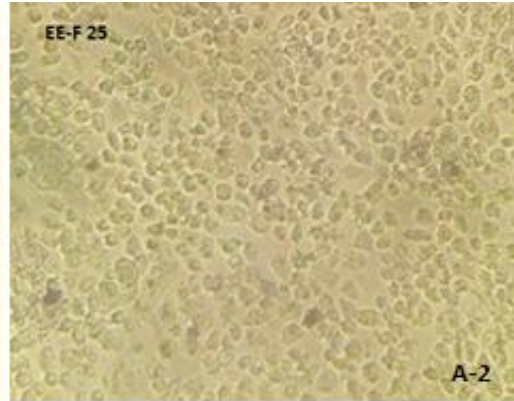
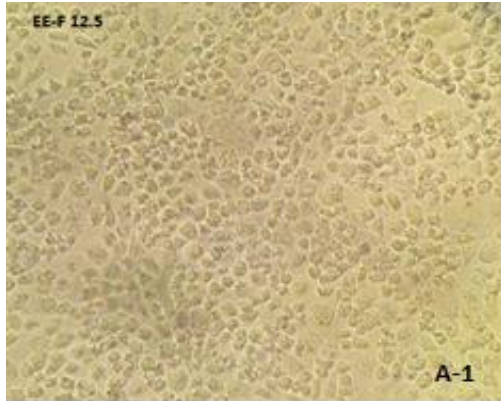
Tableau 3.17 : Effet de DMSO à 0.5% sur la croissance des *Thp1* :

Lots	% Cytotoxicité**	IC 95%
Bleu de Trypan à 0.4% $P=0.065$		
<i>Thp1</i>	00 ^A ± 00	(-0,328012 ; 0,328012)
<i>Thp1</i> +DMSO 0.5%	0,42 ^A ± 0,37	(0,099 ; 0,756)
MTT $P=0.000$		
<i>Thp1</i>	00 ^B	(-0,092773; 0,092773)
<i>Thp1</i> +DMSO 0.5%	0,66 ^A ± 0,10	(0,5722; 0,7578)

*: $P= 0.065$, **: XA : Comparaison des moyennes par le test de regroupement de Fisher, IC : Intervalle de confiance.

Comme on s'y attendait; l'ajout de 0.5% de DMSO au milieu de croissance (RPMI1640) avec les cellules n'a induit aucune différence significative ($P=0.065$, et test de Fisher) de la croissance cellulaire en comparant avec le lot des *Thp1* cultivées seules par la méthode de coloration, tandis qu'une légère différence a été constaté par la méthode de MTT ; cela est probablement dû à la sensibilité du test (Tableau 3.17) (ANNEXE 10).

La figure 3.54, représente la coloration au bleu de Trypan à 0.4% des différents puits des cellules *Thp1* cultivées en présence des différentes concentrations des différents extraits de *C.parqui* ; on peut remarquer que le nombre des cellules mortes colorées en bleu est proportionnel à la concentration testée, et ça s'applique sur les trois extraits testés, bien que l'EE-F et l'EEP-F à 100 ug/ml ont induit un nombre important des cellules neutralisées colorées (Photo 3.54 A-4 et B-4), tandis que l'effet cytotoxique de l'EA-F sur les cellules *Thp1* s'est révélé trop faible à inexistant avec une coloration presque légèrement visible même au forte concentration testée (Photo 3.54 C-4).



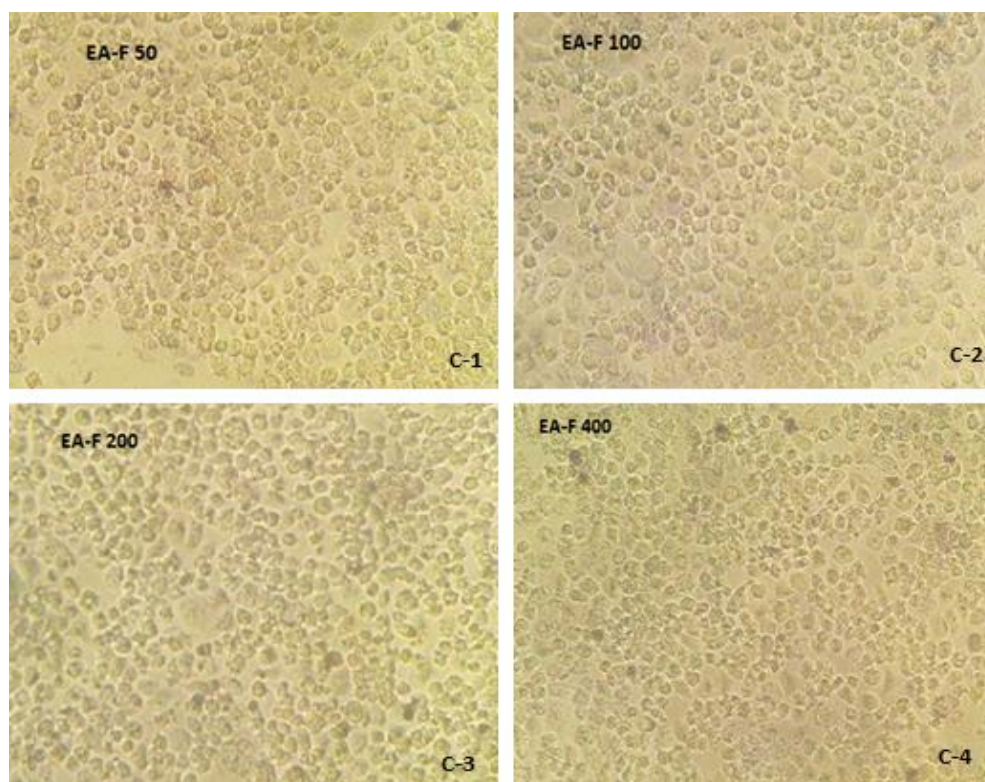
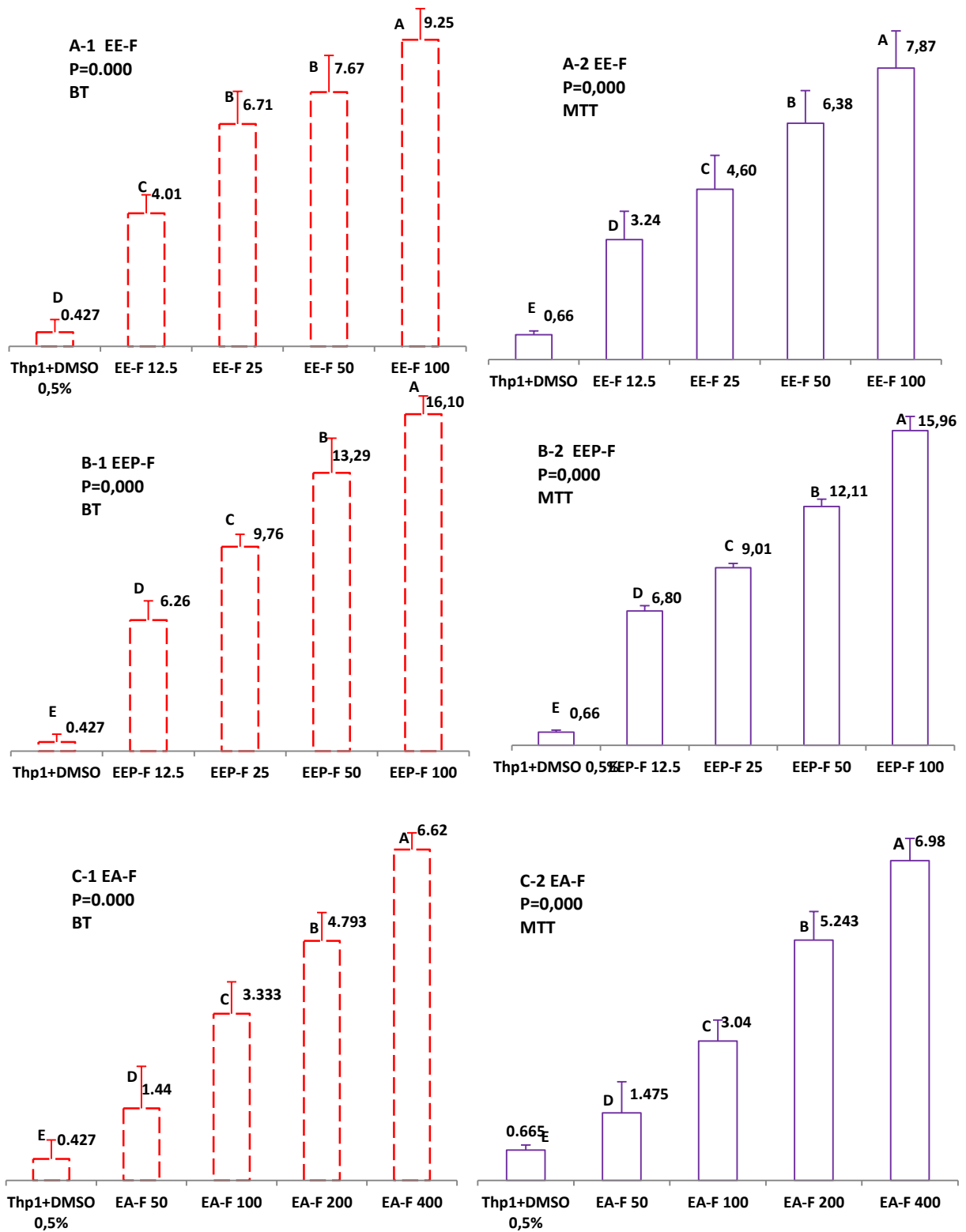


Photo 3.54 : Coloration au bleu de Trypan à 0.4% des différents puits des *Thp1* misent en contact avec les différentes concentrations des trois extraits et observés sous microscope inversé (20x0,4): A 1-4 : EE-F, B 1-4 : EEP-F, C 1-4 : EA-F.

D'après la figure 3.55, on peut déterminer que l'effet cytotoxique par la méthode de l'inclusion des différents extraits des feuilles de *C.parqui* est en fonction des doses par les deux méthodes, avec une similarité de taux de cytotoxicité entre la 25 et la 50 ug/ml de l'EE-F par le test de coloration au bleu de Trypan, bien que la différence entre les pouvoir cytotoxique des différentes concentrations a été fortement significative ($P=0.000$) par les deux tests. De plus, l'EEP-F s'est révélé plus cytotoxique sur les *Thp1* par rapport aux deux autres extraits, avec un taux maximal de cytotoxicité de la dose de 100 ug/ml qui dépasse 15% pour les deux méthodes testées, alors que la prolifération cellulaire de la lignée cellulaire *Thp1* semble moins affectée par le traitement avec l'EA-F (ANNEXE 10).



A : Extrait éthérépétrolique de feuilles, B : Extrait éthanolique de feuilles, C : Extrait aqueux de feuilles, A, B, C, D... : Comparaison des moyennes par regroupement (Test de Fisher), BT : Coloration au bleu de Trypan, MTT : Réduction des sels de Tétrazolium

Figure 3.55 : Effet cytotoxique des extraits de feuilles *C.parqui* sur les *Thp1* A : EE-F, B : EEP-F, C : EA-F.

Tableau 3.18 : Effet cytotoxique des extraits de feuilles de *C.parqui* par les deux méthodes :

Produits	Valeur de P	Equation de la courbe	R ²	CC50% (ug/ml)
Bleu de Trypan à 0.4%				
EE-F	P=0.000	Y= 4.502+0.05137 x (X)	0.834	885.69
EEP-F	P=0.000	Y= 6.471+0.1042 x (X)	0.915	417.71
EA-F	P=0.000	Y= 1.497+0.01359 x (X)	0.921	3569.02
MTT				
EE-F	P=0.000	Y= 3.163+0.05039 x (X)	0.879	929.47
EEP-F	P=0.000	Y = 6.227+0.1013 x (X)	0.980	432.11
EA-F	P=0.000	Y= 1.367+0.01503 x (X)	0.935	3235.72

CC50 : Concentration cytotoxique qui inhibe 50% de la charge cellulaire.

Le tableau 3.18, représente les différentes CC50 des trois extraits de feuilles, déterminées par les deux méthodes réalisées ; l'activité antiproliférative en termes de ces CC50 était faiblement exprimées (CC50 > à 400 ug/ml), bien que l'EEP-F a été l'extrait cytotoxique le plus marqué avec des faibles CC50 des deux méthodes. La reproductibilité du test de cytotoxicité est bien validée suite à la compatibilité des résultats obtenus de deux méthodes.

En comparant les pourcentages de cytotoxicité de DMSO à 0.5 % de deux méthodes qui sont vraiment proches ; on peut conclure que la différence est due aux lots du contrôle puisque le résultat est toujours calculé par rapport à ce dernier, sachant que la croissance des *Thp1* dans les mêmes conditions des deux méthodes n'assure pas avoir exactement la même charge cellulaire à la fin de l'expérience ; et on n'ignore pas l'apoptose cellulaire spontanée qui peut provoquer cette petite différence. Les CC50 obtenues des différents extraits (> 400 ug/ml) indiquent que ces extraits ne sont pas cytotoxiques *in vitro* sur ces cellules monocytaires humaines ; sachant que ces cellules sont la première cible des *Leishmanies* au début de l'infection chez l'homme ; les doses finales testées pour l'activité antileishmanienne sont choisies en basant sur de ne pas choisir des doses létales nocives ; ces résultats ne sont pas complètement valides ; des tests de cytotoxicité plus poussés et avec des fractionnements des extraits sont fortement recommandés pour mieux se rapprocher à l'effet réel des différents composés.

Les végétaux renferment plusieurs molécules secondaires à un profil anticancéreux ; les alcaloïdes ; les terpénoïdes, les saponines, et les polyphénols se positionnent principalement en premier lieu avec plusieurs travaux publiés., [347], [348], [349] ; d'une façon générale, les données suggèrent que la bonne action antiproliférative de l'EEP-F sur les *Thp1* par rapport aux deux extrais testés malgré la similarité de la composition chimique entre ces derniers, et probablement due à la dominance des molécules terpéniques connus comme des bons agents cytotoxiques [349], [350].

L'étude de l'activité cytotoxique nous a clairement montré que les feuilles avaient une faible activité sur la prolifération cellulaire globale de la lignée cellulaire *Thp1* malgré leurs richesses en molécules anticancéreux. Ceci pourrait s'expliquer par deux hypothèses :

- La glycolisation et le degré de méthylation des flavonoïdes et des alcaloïdes bloquerait leur entrée dans les cellules cancéreuses, d'où l'inactivité de certains extraits [351].

- Des saponosides et des terpénoïdes sont décrits dans la littérature comme possédant une forte activité cytotoxique prouvée. Ces saponosides peuvent agir en tant qu'agents anticancéreux potentiels en empêchant la carcinogenèse, ou par des effets antiprolifératifs et/ou cytotoxiques directs contre des cellules cancéreuses tant *in vitro* qu'*in vivo* [352]. L'extrait éthanolique et l'infusé riche en saponosides, n'ont montré aucune activité cytotoxique. La méthode d'extraction utilisée pourrait être mise en cause. Les saponosides auraient pu être dénaturés par la chaleur.

Hormis ces deux hypothèses, il ne faut pas exclure la nature de la lignée cellulaire. Il faut comprendre par cela que selon la lignée cellulaire utilisée pour les tests cytotoxiques le pouvoir cytotoxique peut varier.

Très peu de recherche de toxicité *in vitro* sur les lignées cellulaires humaines de *C. parqui* qu'ont été publiées ; Il n'existe qu'un seul rapport dans la littérature sur l'activité cytotoxique de l'extrait éthanolique (1.7-6.6 ug/ml) sur les cellules de Caco-2 réalisée en 2010 par l'équipe de [89], même pour les peu d'études de cytotoxicité des différents extraits de quelques espèces de genre *Cestrum* ;

l'ensembles de leurs CC50 de leur extraits étaient toujours élevées (généralement supérieurs à 200 ug/ml) [338], [92], [353].

3.5.5. Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique de l'EE-F, L'EEP-E, et l'EA-F des feuilles de *C.parqui*

Pour caractériser l'activité antimicrobienne de nos extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extraits végétaux. De plus, l'inactivité des solvants (DMSO et l'eau distillée) utilisés pour dissoudre les résidus de ces extraits a été vérifiée. La sensibilité des souches aux antimicrobiens de référence a été aussi contrôlée.

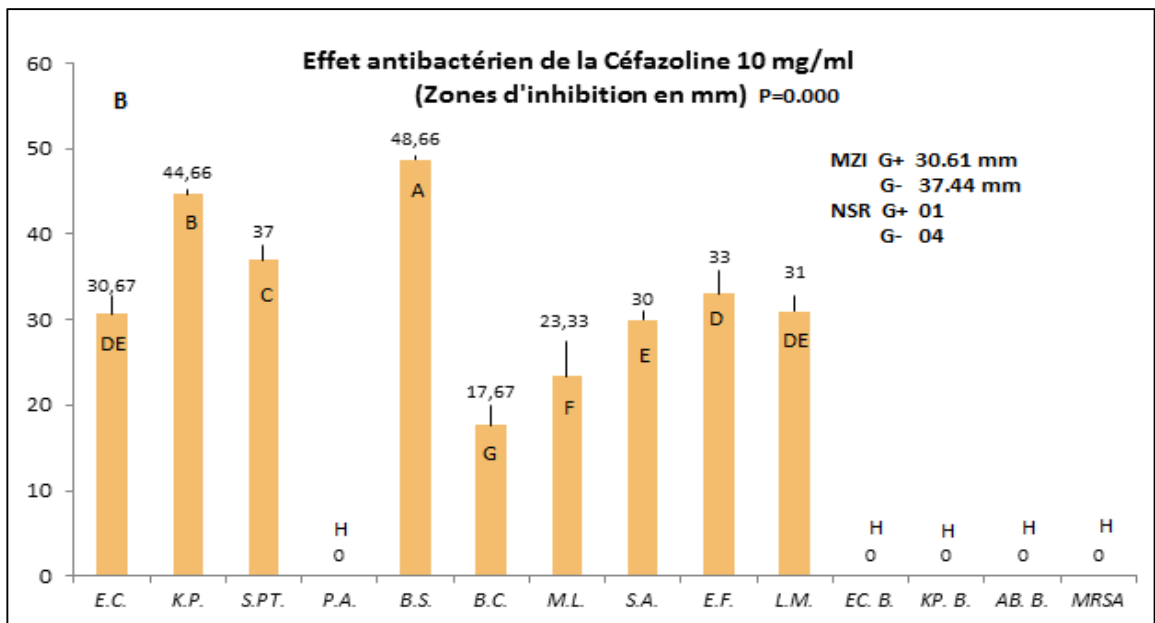
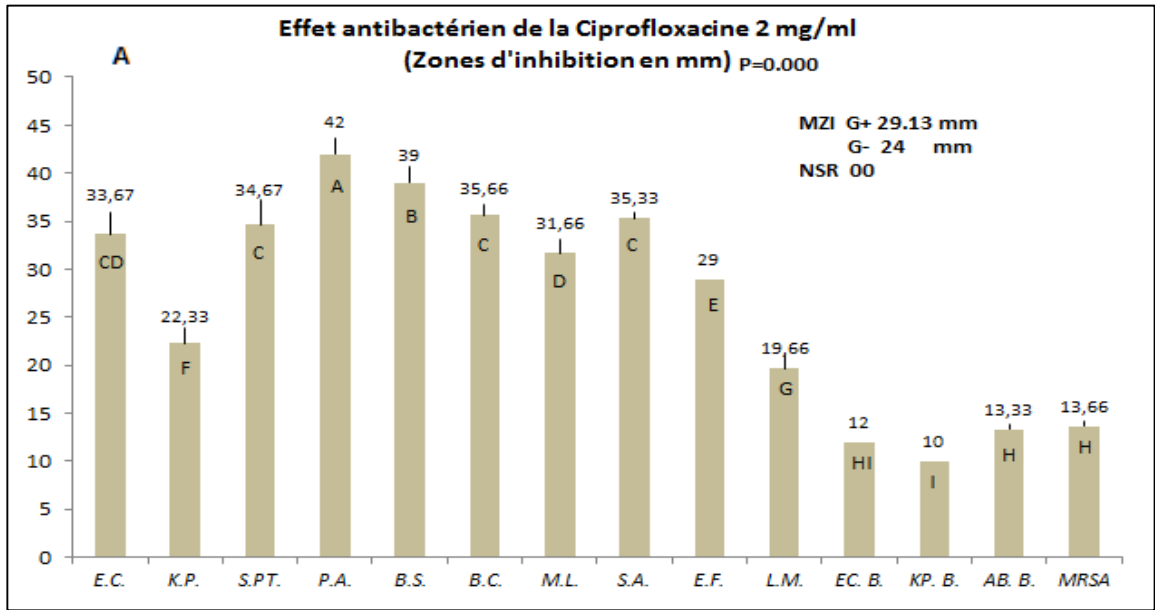
3.5.5.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'EE-F, L'EEP-E, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

a. Effet antibactérien des témoins positifs : La Ciprofloxacine 2 mg/ml et la Céfazoline 10 mg/ml :

L'activité antibactérienne des témoins de références (ANNEXE 11) a été hautement significative avec un $P=0.000$. La ciprofloxacine à 2 mg/ml a été l'antibiotique de référence le plus marqué ; d'ailleurs il a été actif sur toutes les souches bactériennes testées principalement sur les bactéries à Gram positif ; une très forte activité a été observé sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibitions de 42 et 39 mm respectivement. Le profil multirésistant d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* les a conféré la moindre sensibilité envers la ciprofloxacine avec des zones d'inhibition de 12 et 10 mm respectivement (Figure 3.56 A, et 3.57).

La céfazoline a exprimé un pouvoir antibactérien moins important que la ciprofloxacine avec une résistance totale de *Pseudomonas aeruginosa* et de toutes les souches multirésistantes. La sensibilité des souches à Gram négatif vis-à-vis la céfazoline a été la sensibilité la plus observée avec 37.44 mm comme moyenne des zones d'inhibition mesurées ; malgré que la sensibilité la plus importante a été notée sur une souche à Gram positif ; *Bacillus subtilis* (48.66 mm) (Figure 3.56 B, et 3.57).

Remarque : Toutes les souches bactériennes illustrées dans toutes les figures sont présentées sous les abréviations suivantes : E.C. : *Escherichia coli*, K.P. : *Klebsiella pneumoniae*, S.P.T. : *Salmonella paratyphi*, P.A. : *Pseudomonas aeruginosa*, B.S. : *Bacillus subtilis*, B.C. : *Bacillus ceureus*, M.L. : *Micrococcus luteus*, S.A. : *Staphylococcus aureus*, E.F. : *Enterococcus faecalis*, L.M. : *Listeria monocytogenese*, EC.B. : *E. coli* BLSE+, KP.B. : *Klebsiella pneumoniae* BLSE+, A.B.B. : *Acenitobacter baumannii* BLSE+, MRSA : *Staphylococcus aureus* MRSA.



MZI : Moyenne des zones d'inhibition, NSR : Nombre de souches résistantes, G+ : Gram positif, G- : Gram négatif. A, B, C, D, E, ... : regroupement par le test de Fisher (Minitab 17)

Figure 3.56 : Effet antibactérien des témoins positifs : A : Ciprofloxacine 2 mg/ml, B : Céfazoline 10 mg/ml.

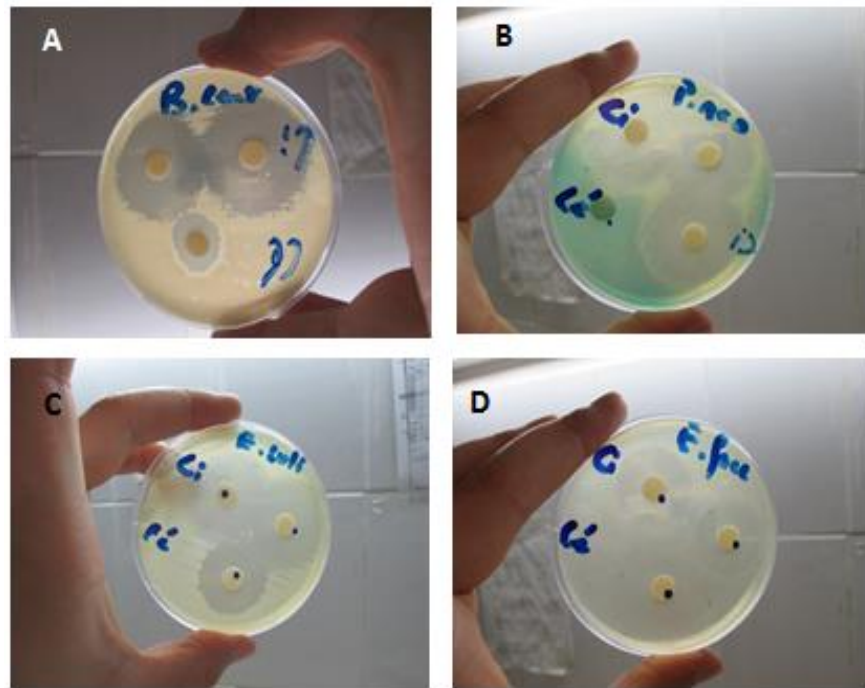
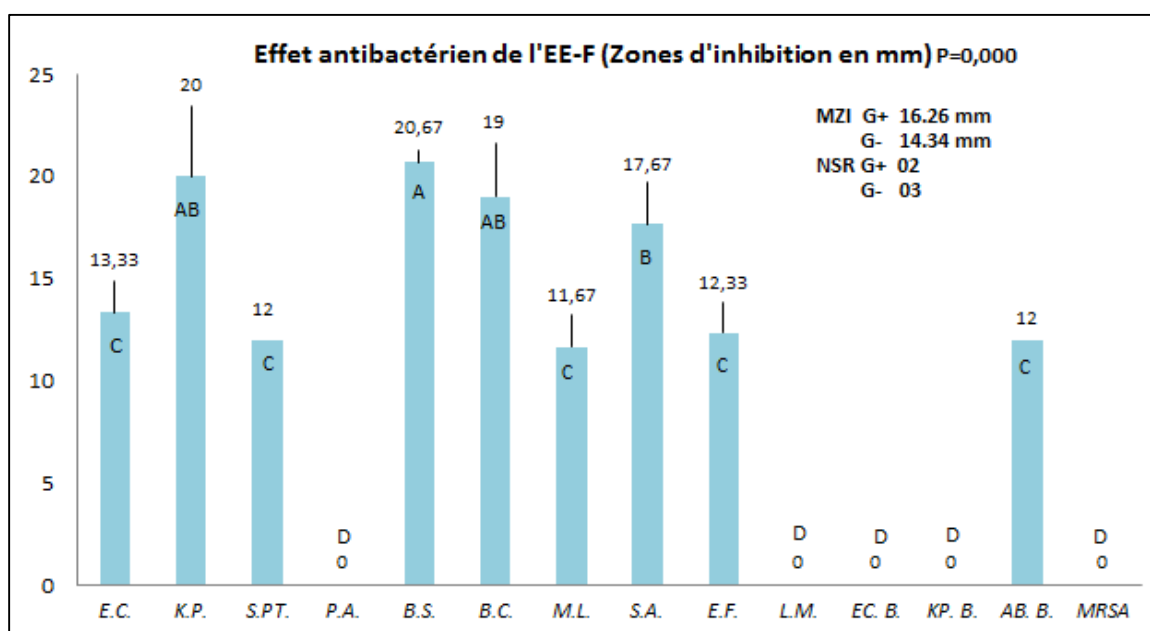


Figure 3.57 : Effet de la Ciprofloxacin 0.1mg/dis. et la Céfazoline 0.5 mg/dis sur quelques souches bactériennes testées : A : *Bacillus ceureus*, B : *Pseudomonas aeruginosa*, C : *Escherichia coli*, D : *Enterococcus faecalis*.

Les modes d'actions des agents antibactériens diffèrent selon la nature d'affinité entre la bactérie et l'agent inhibant la croissance bactérienne, L'efficacité totale de la ciprofloxacin sur toutes les souches bactériennes reflète le spectre large de son activité ; il cible l'ADN et les topoisomérases des bactéries on empêchant le rassemblement normal de l'ADN au cours de la traduction, ce qui le rend un antibiotique de référence et du première intention dans le cas des infections bactériennes les plus sévères. La Céfazoline inhibe l'élaboration de la paroi bactérienne, en interférant avec la synthèse de peptidoglycane en perturbant la perméabilité de la paroi [354]; l'affinité de l'effet de la céfazoline avec le type de paroi bactérienne limite son action antibactérienne envers les bactéries à double membrane. Les souches bactériennes multirésistantes ont acquis une large résistance vis-à-vis de l'ensemble des bétalactamines existants dans le marché, cela signifie la croissance des souches hospitalières multirésistantes sur le milieu de culture malgré la présence de céfazoline qui est une bétalactamine de troisième génération [355].

b. Effet antibactérien de l'extrait éthanolique de feuilles, EE-F

L'EE-F à 20 mg/ml n'a présenté aucun effet antibactérien sur toutes les souches testées ; par contre sa concentration à 100 mg/ml a exprimé un pouvoir antibactérien prononcé principalement sur les bactéries à Gram positif avec une différence hautement significative des différentes zones d'inhibitions mesurées ($P=0.000$). Une résistance totale a été exprimée par *Pseudomonas aeruginosa*, et *Listeria monocytogenese*, De plus, *Acinetobacter baumannii* a été la seule souche hospitalière sensible avec une zone d'inhibition de 12 mm (Figure 3.58 et 59).



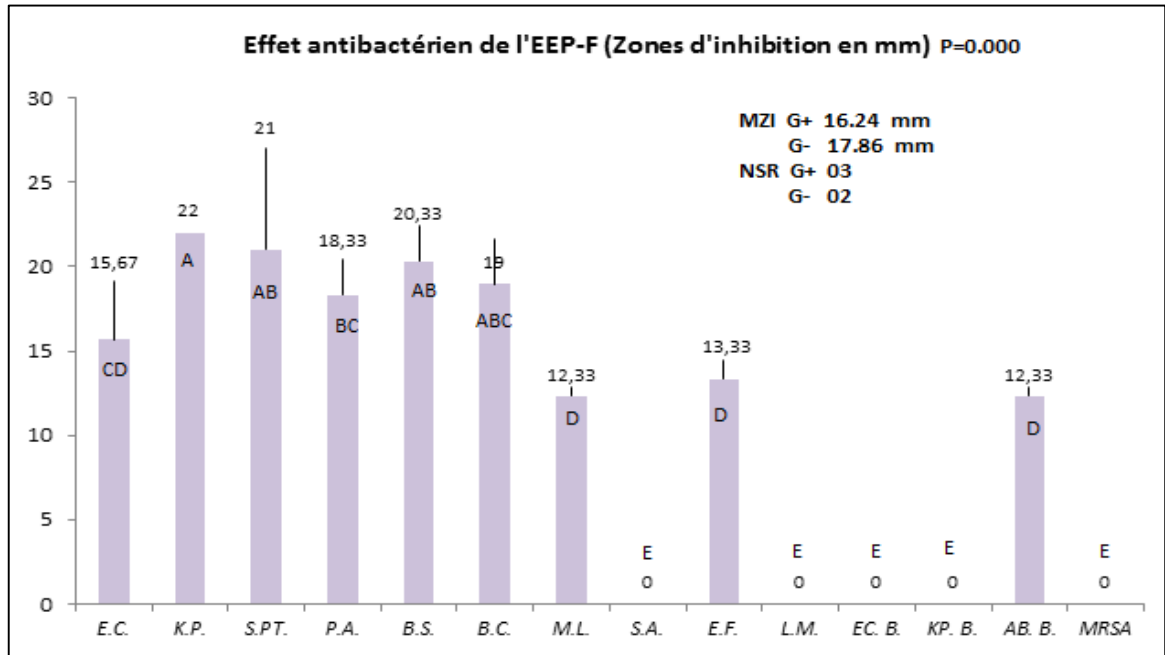
MZI : Moyenne des zones d'inhibition, NSR : Nombre de souches résistantes, G+ : Gram positif, G- : Gram négatif. A, B, C, D, E, ... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17)

Figure 3.58 : Effet antibactérien de l'EE-F à 100 mg/ml.

c. Effet antibactérien de l'extrait étheropétrolique de feuilles, EEP-F

Comme le montrent les résultats présentés sur la figure 3.61, l'EEP-F à 100 mg a été largement actif sur la totalité des bactéries référencées (ATCC) à Gram négatif. Le test de regroupement nous montre qu'il y a une certaine similarité de l'effet de l'EEP-F sur les souches sensibles. Il ressort que *Pseudomonas aeruginosa* se révèle très résistante à la plupart des extraits utilisés, alors qu'elle est fortement inhibée par cet extrait avec une inhibition de 18.33 mm. L'EEP-F n'a prouvé aucun pouvoir antibactérien sur *Staphylococcus aureus* qui a été fortement inhibé par l'EE-F (Figure 3.59).

On rappelant que les résultats nuls de l'effet de l'EEP-F à 20 mg/ml sur toutes les souches testées n'ont pas été figurés dans le graphe ci-dessous.

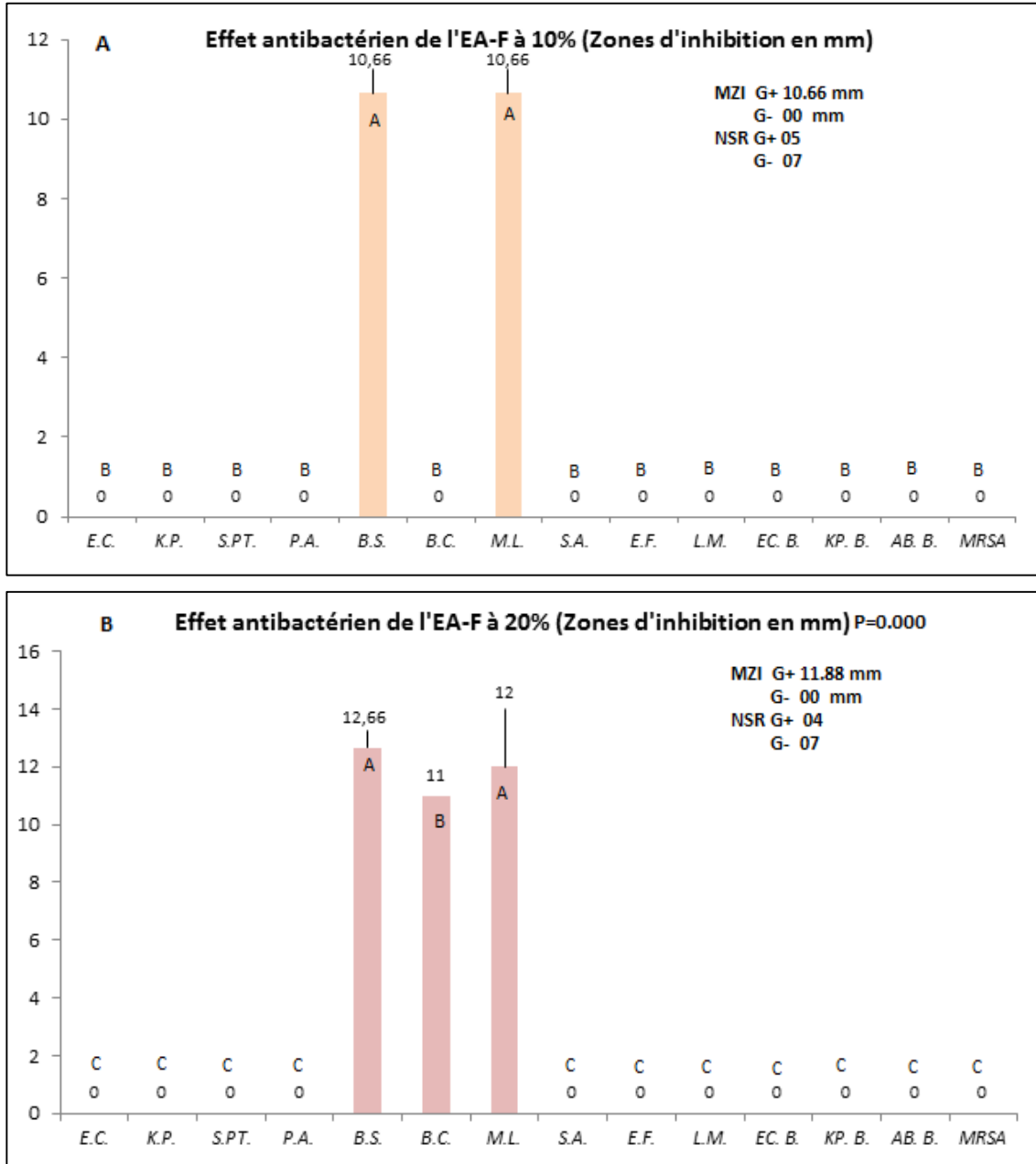


MZI : Moyenne des zones d'inhibition, NSR : Nombre de souches résistantes, G+ : Gram positif, G- : Gram négatif. A, B, C, D, E, ... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17)

Figure 3.59 : Effet antibactérien de l'EEP-F à 100 mg/ml.

d. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de feuilles, EA-F

La figure 3.60 nous montre la très faible activité antibactérienne de l'infusé de feuilles par ces deux concentrations testées ; avec une légère efficacité sur trois bactéries à Gram positif ; bien que *Bacillus subtilis* a été la souche la plus sensible.



MZI : Moyenne des zones d'inhibition, NSR : Nombre de souches résistantes, G+ : Gram positif, G- : Gram négatif. A, B, C, D, E, ... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17).

Figure 3.60 : Effet antibactérien de l'EA-F : A : EA-F à 10%, B : EA-F à 20%.

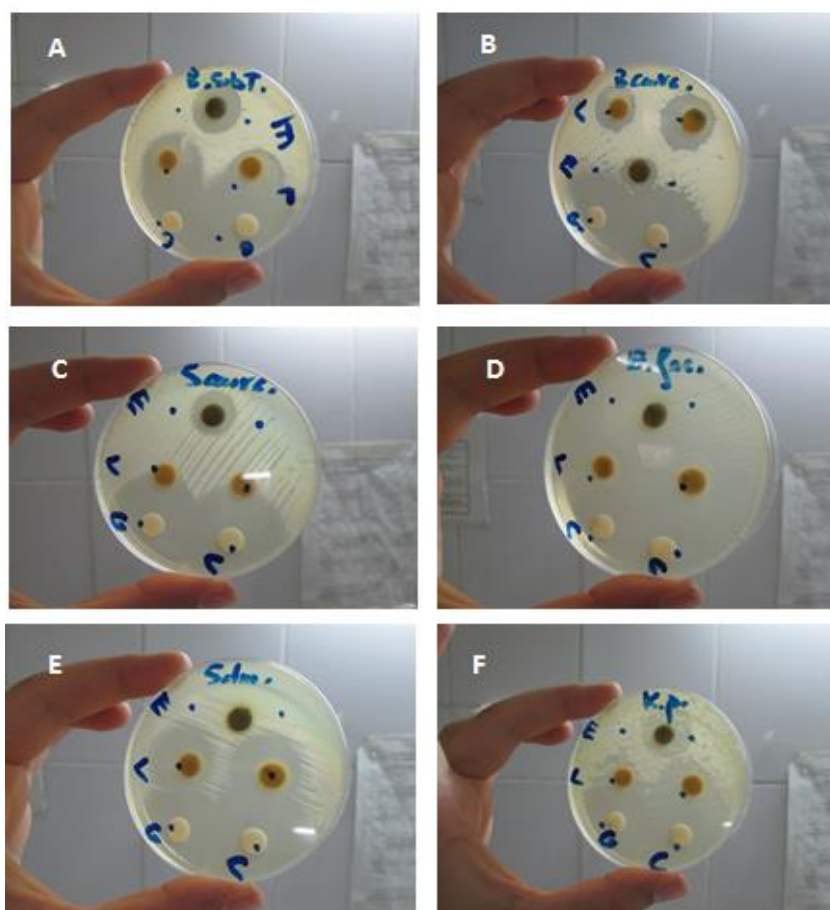


Figure 3.61 : Effet de l'EE-F et l'EEP-F à 100 mg/ml sur quelques souches:
 A : *Bacillus subtilis*, B : *Bacillus ceureus*, C : *Staphylococcus aureus*, D : *Enterococcus faecalis*, E : *Salmonella paratyphi*, et F : *Klebsiella pneumoniae*

Selon [356], une zone d'inhibition supérieure ou égale à 15mm confirme l'efficacité de l'extrait comme agent antibactérien (Disque de 9mm). D'après les résultats présentés ci-dessus, on constate que l'EEP-F est l'extrait le plus actif avec une moyenne des zones d'inhibition (MZI) de 16.24 mm pour les bactéries à Gram positif et 17.86 mm pour les bactéries à Gram négatif, par rapport aux moyennes moins importantes de l'effet de l'EE-F et de l'EA-F.

D'une façon générale, la sensibilité des bactéries à Gram positif a été la réponse la plus marquée dans tous les tests réalisés avec les différents produits. La différence de la sensibilité des souches aux extraits testés pourraient être dues à la variation du taux de pénétration des échantillons à travers la paroi et la membrane cellulaire des structures [357], [358]. Les bactéries à gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50 KD [359]. D'autre part, nous avons

constaté que l'EE-F à 100 mg/ml a un effet antibactérien qui peut être attribuée à la présence des polyphénols, des alcaloïdes, des saponines ; des alcools et des aldéhydes dans les feuilles de *C.parqui* Ces composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [360], [361], [362].

La bonne activité antibactérienne de l'extrait lipidique (EEP-F) peut être expliquée par l'effet synergique des molécules connus comme agents antibactériens qui le contiennent ; principalement les stérols, les triterpènes, et les alcaloïdes [363], [364], ces molécules peuvent avoir une affinité d'interaction avec les membranes des bactéries à Gram négatif, expliquant la fixation, et la pénétration de ces derniers à travers la double couche peptidoglycane qui confère dans la plus part des cas la résistance à la bactérie Gram négatif.

L'inactivité de l'extrait aqueux peut être expliquée par différentes hypothèses dont ; la non diffusion de l'extrait dans le milieu de culture, la réactivité de ses composants avec ceux du milieu de culture, l'absence de l'expression de ses molécules actives. Donc cette dernière hypothèse est controversée. Peut-être qu'il faudrait fractionner cet infusé puisqu'il y aurait des composés inhibiteurs masquant les composés actifs [365], [366].

Du fait de la variabilité des résistances des souches testées et des profils des composants des trois extraits, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [367].

Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont négligeables. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des feuilles de *C.parqui* sur les bactéries. Peu des travaux publiés sont rapportés sur l'activité antimicrobienne des extraits de *C.parqui*, en 2007 ; [273] (Bolivia) a montré que l'extrait éthanolique à 95° de feuille à 400 ug/ml été actif seulement sur une Gram positif testée ; *Enterococcus faecalis*. Une autre étude en Danmark ; où [314], ont rapporté que l'extrait méthanolique de feuille 1mg/ml de *C.parqui* été actif seulement sur une Gram négatif qui est l'*Escherichia coli*.

3.5.5.2. Résultats de l'activité antifongique de l'EE-F, L'EEP-E, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

Les analyses statistiques ont montré que les mesures effectuées sur les diamètres des halos d'inhibitions mesurés des différentes souches fongiques testées se sont révélées significativement discriminantes ($P=0.000$). De plus, l'effet de DMSO et l'eau distillée stérile est vérifié sur toutes les souches fongiques testées.

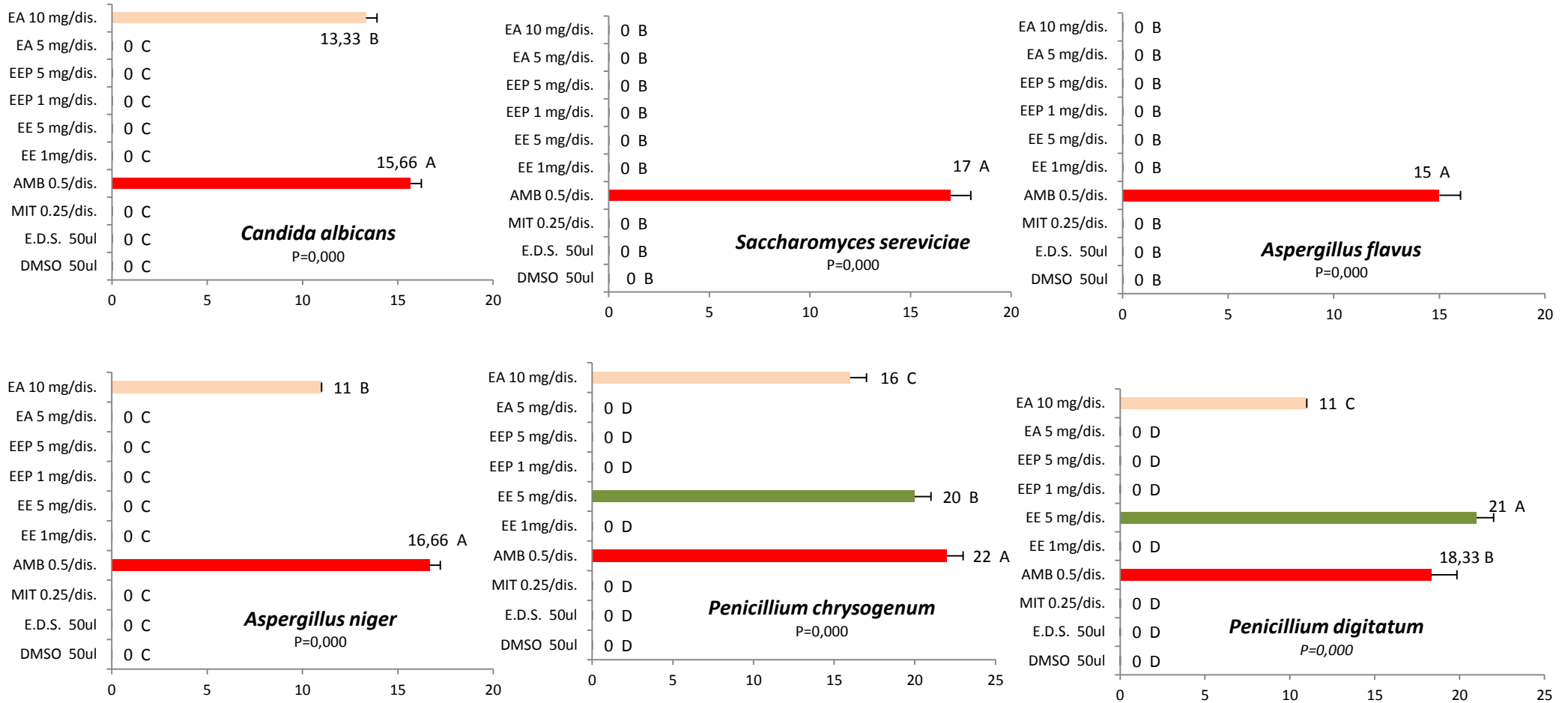
a. Effet antifongique des témoins positifs ; l'Amphotéricine-B 0.5 mg, et le Métronidazole à 0.25 mg

D'après la figure 3.62, et le test de regroupement, l'Amphotéricine B à 0.5 mg semble avoir pratiquement une activité semblable contre les différentes souches fongiques, avec une sensibilité plus observée des deux souches de *Penicillium*. Par contre le Métronidazole à 0.25mg n'a pas induit aucun effet inhibiteur sur toutes les souches fongiques (Figure 3.63).

b. Effet antifongique de l'EE-F, L'EEP-E, et l'EA-F

Selon la figure 3.62, L'EE-F à 100 mg/ml et l'EA-F à 20% témoignent d'un pouvoir antifongique modéré sur les souches fongiques testées, avec un pouvoir antifongique de l'EA-F à 20% plus marqué que celui de l'EE-F à 100 mg/ml, tandis que l'EEP-F à 20 et 100 mg, l'EA-F à 10%, et l'EE-F à 20 mg/ml se sont énoncés les doses inactifs dans cette activité (Figure 3.62, et 63).

L'étude statistique a montré que les souches étudiées répondent différemment à l'effet antifongique des produits testés. En effet, alors que *Saccharomyces cereviceae* et *Aspergillus flavus* ne semblent être objet d'aucun effet inhibiteur des trois extraits étudiés. En effet, *Penicillium chrysogenum* semble être plus sensible à l'effet des deux extraits actifs par rapport au *Penicillium digitatum* (Figure 3.62).



EA : Extrait aqueux, EEP : Extrait étheropétrolique, EE : Extrait éthanolique, AMB : Amphotéricine B, MITO : Métronidazole, EDS : Eau distillée stériles, DMSO : Diméthylsulfoxyde, A, B, C, D, E, ... : Regroupement par le test de Fisher (Minitab 17).

Figure 3.62 : Effet antifongique de tous les produits testés.

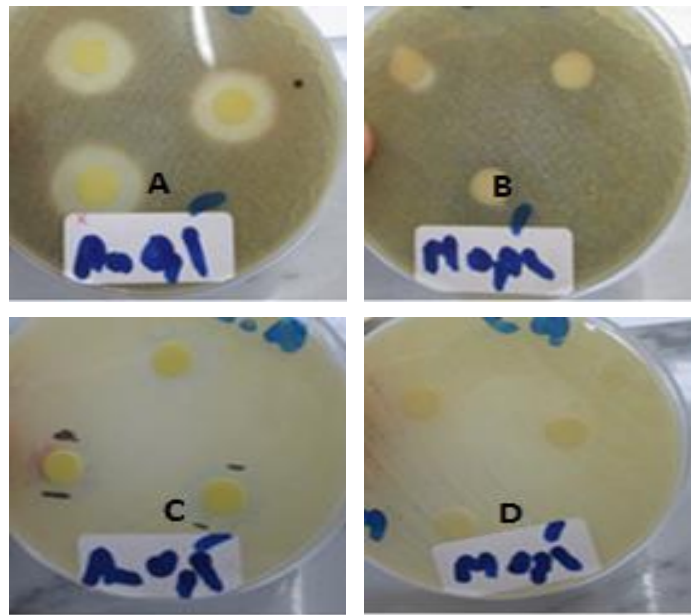


Photo 3.63 : Effet de l'Amphotéricine B 0.5 mg, (A et C) et le Métronidazole 0.25mg (B et D) sur *Aspergillus niger* (Haut), et *Candida albicans* (En bas).



Photo 3.64 : Effet de l'EE-F et l'EEP-F de 20 mg/ml de *C.parqui* sur *Candida albicans* (gauche) et *Aspergillus niger* (Droite).

Cette activité montre un profil variable sur toutes les souches fongiques utilisées, ce qui se traduit par des concentrations d'inhibition différentes et donc une différence de sensibilité vis-à-vis des extraits de feuilles de *C.parqui* et les témoins de références testés.

L'Amphotéricine B a présenté une large efficacité antifongique sur toutes les formes levuriformes et filamenteuses, cela dévoile son large spectre et son pouvoir inhibiteur sur la croissance des levures et des champignons. La relative sélectivité de la toxicité de l'Amphotéricine B pour les cellules fongiques s'explique de la manière suivante : La fixation de l'Amphotéricine B sur la cellule fongique augmente la perméabilité transmembranaire en formant des canaux favorisant le passage des cations monovalents (Na^+ , et K^+) à l'espace intracellulaire, cette

charge interne de ces ions entraîne secondairement la mort cellulaire [195]. L'évaluation de l'activité antifongique des trois extraits de feuilles de *C.parqui* a mis en évidence une activité modérée à inexistante sur les levures et les champignons du genre *Aspergillus*, mais des activités beaucoup plus intéressantes dans le cas des deux espèces de *Penicillium* testés.

D'une manière générale, aussi bien pour les levures que pour les moisissures, l'extrait le plus actif est l'extrait aqueux de feuilles (EA-F). Cette activité antifongique est non seulement en fonction de la nature chimique de l'extrait, mais aussi de type des souches utilisées [368]. Ainsi, Cette efficacité serait liée au pouvoir du solvant qui est l'eau, à solubiliser plusieurs composés chimiques majeurs contenus dans le broyat de la plante, ce qui laisse supposer que l'effet antifongique de l'EA-F est dû en partie, au bon passage de composés antifongiques dans l'extrait au cours de l'infusion [369]. En revanche, l'EA-F contient, entre autres, des composés polyphénolique, des saponines, des terpénoïdes et des alcaloïdes ; ces substances ont été identifiées comme produits antimycotoxiques et/ou antifongiques. En effet, les saponines se sont montrées capables d'inhiber la croissance fongique [370]. On outre, et au vue des résultats obtenus, l'EE-F à 100 mg/ml a prouvé d'un autre coté son pouvoir antifongique seulement sur les souches de *Penicillium*, cette activité rétrécie peut être expliqué soit à cause de la faible concentration testée envers les souches fongiques choisies, ou bien par une certaine affinité structurelle entre les molécules actifs de l'extrait et les membranes des *Penicillium*. Sachant que le screening chimique de l'EE-F a révélé sa richesse en alcaloïdes, en saponines, en tanins, et en polyphénols.

En effet, le nombre élevé et les sites des groupements hydroxyle détectés par infrarouge dans l'EA-F par rapport à l'EE-F, pouvant être des facteurs responsables de la toxicité envers les microorganismes [371]. Ce même auteur a montré que l'augmentation de l'hydroxylation induit l'augmentation de cette toxicité.

L'inefficacité l'EEP-F sur toutes les souches fongiques utilisées est probablement due à l'absence des saponines, des flavonoïdes, des tanins, et d'autres composés polyphénoliques ; qui sont doués d'une forte toxicité sur les levures et les champignons [372] et [373].

Concernant les données de la littérature, une seule référence a été trouvée donnant un effet inhibiteur de l'extrait saponique brut de feuilles de *C.parqui* sur *Trichoderma virideae* à partir de 1 mg/ml [374].

3.5.6. Résultats de l'activité antioxydante *in vitro* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

La capacité antioxydante des extraits de plante sont largement dépendant de la composition de ces extraits ainsi que les conditions de manipulation des tests *in vitro*, l'évaluation de l'activité est donc nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes [375].

3.5.6.1. Résultats de la méthode de piégeage du radical libre ; le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant, nous avons établi les profils d'activité antiradicalaire présentés dans la figure 3.65, et c'est à partir de ces profils que nous avons déduit la valeur correspondante à la CI50 (la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer 50% du taux de DPPH).

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus (ANNEXE 12) révèlent que les extraits testés ainsi les témoins positifs possèdent une activité dose-dépendante avec une différence hautement significative entre les concentrations du même produit ($P=0.000$) (Annexe 10), une seule similarité entre l'effet de EEP-F à 300 ug/ml et la 600 ug/ml du même extrait a été notée (test de regroupement).

En comparaison avec les antioxydants standards, les extraits bruts testés s'avèrent moins actifs ; l'acide gallique a montré un pouvoir réducteur plus important avec une réduction presque optimale (95.68%) à la concentration de 75 ug/ml par rapport à la vitamine E qui a réduit 88.56% de DPPH par la même concentration. De plus, le test de DPPH a mis en évidence une activité antioxydante très marquée pour l'EA-F et l'EE-F par rapport à l'EEP-F, En effet, à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de l'EA-F testé a réduit plus de 50% des radicaux libres, par contre l'EE-F à 3000 ug/ml a présenté le pouvoir d'inhibition le plus important avec une réduction de 63.17% de DPPH (Figure 3.65).

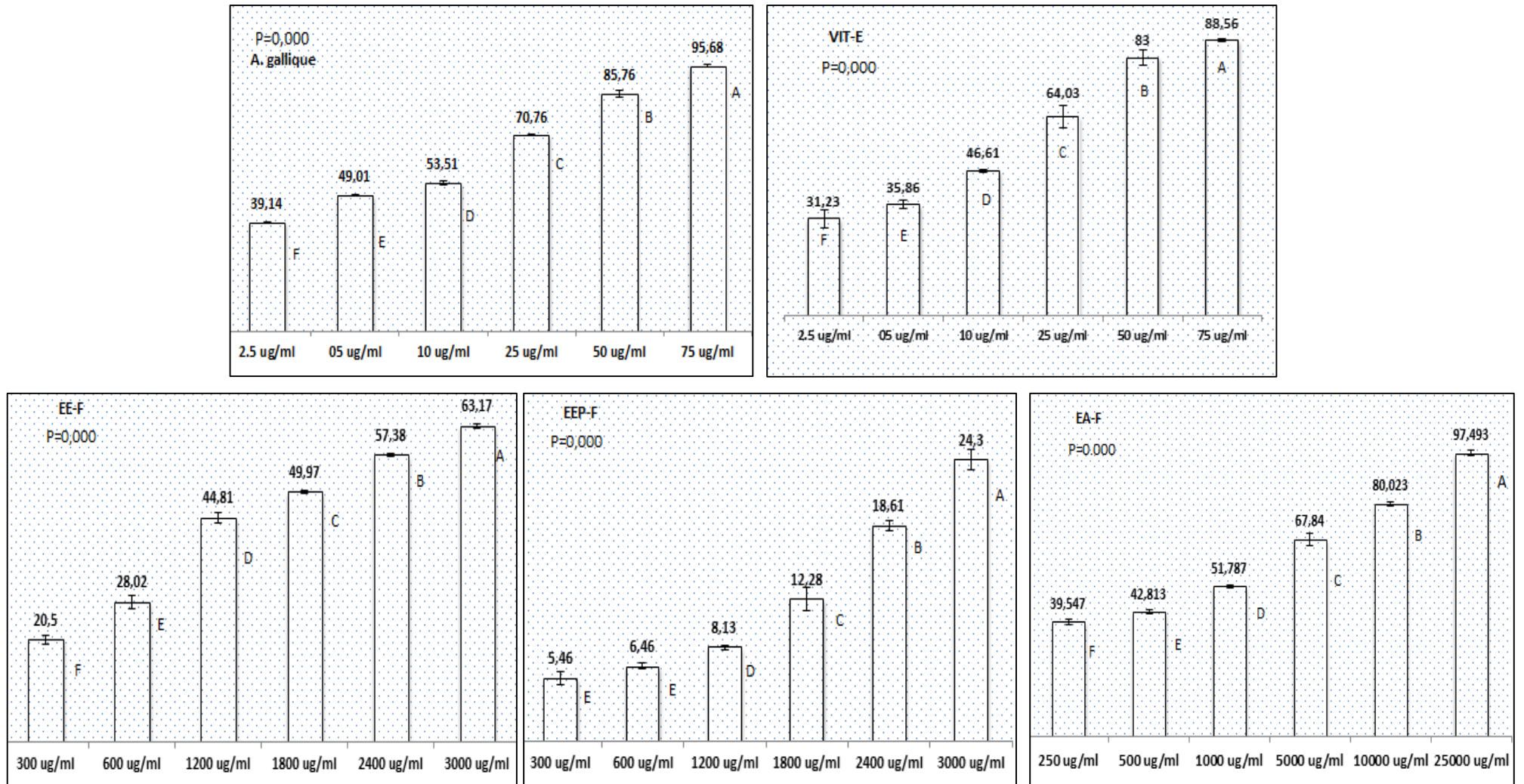


Figure 3.65 : Pourcentages d'inhibition (%) de DPPH des trois extraits et les témoins positifs.

Les valeurs des CI50 représentées dans le tableau 3.19 nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la CI50 est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres. On constate que l'EA-F qui est riche en polyphénols, saponines et alcaloïdes est l'extrait le plus actif par rapport aux deux autres extraits des feuilles testés avec une CI50 de 967 ug/ml. De même la comparaison globale intergroupe des différents effets par le test de Fisher (Minitab 17) nous a montré aussi une similarité de l'effet de la plus forte concentration testée de l'EA-F et la concentration maximale de l'acide gallique utilisée (test de regroupement) (Figure 3.66).

Tableau 3.19 : Résultats de la capacité antioxydante et les CI50 des différents produits par la méthode de réduction de DPPH :

Produits	Valeur de P	Equation de la courbe	R ²	CI50% (ug/ml)
Vitamine E	P=0.000	$y = 35.87 + 0.8002 \times (x)$	0.958	17.65
Acide gallique	P=0.000	$y = 44.96 + 0.7409 \times (x)$	0.968	06.80
EE-F	P=0.000	$y = 19.94 + 0.0155 \times (x)$	0.972	1930.00
EEP-F	P=0.000	$y = 1.694 + 0.006998 \times (x)$	0.973	6900.00
EA-F	P=0.000	$y = 47.86 + 0.0022 \times (x)$	0.933	967.00

EE-F : Extrait éthanolique de feuilles, EEP-F : Extrait étheropétrolique de feuilles, EA-F ; Extrait aqueux de feuilles, y : Pourcentage de réduction de DPPH, x : concentration du produit, R² : Coefficient de corrélation, CI50 : Concentration qui inhibe 50 % de DPPH.

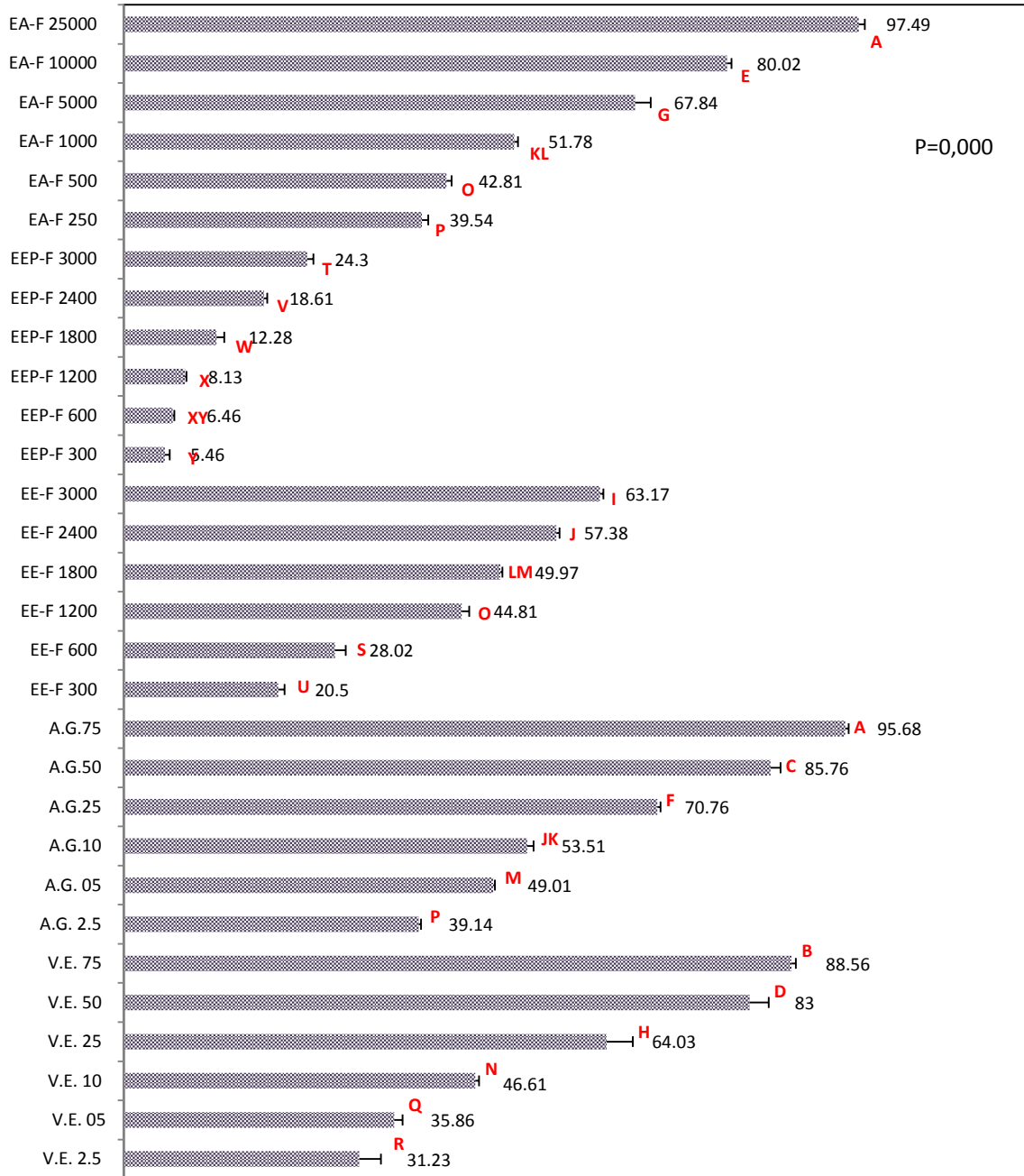


Figure 3.66 : Comparaison intergroupe globale de pouvoir antioxydant sur le DPPH des différentes concentrations des différents produits testés (Regroupement par le test de Fisher).

3.5.6.2. Résultats de la méthode de réduction de fer ferrique ; FRAP

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs [376].

Par analogie à la capacité antiradicalaire, la comparaison des concentrations efficaces (CE50) des extraits a révélé une variabilité significative corroborée à l'effet du solvant et le type d'extraction. L'absorbance mesurée des différentes concentrations des différents produits à 700 nm est proportionnelle au pouvoir réducteur sur les ions ferriques. Une différence fortement significative entre les effets des différentes concentrations des différents produits a été notée ($P=0.000$), avec un effet réducteur dose-dépendant de tous les tests. L'acide gallique a gardé sa puissance antioxydante la plus marquée par rapport à la vitamine E avec des absorbances importantes dès les moindres doses testées. L'EA-F à son tour est resté l'extrait le plus actif par rapport à l'EEP-F et l'EE-F (Figure 3.67) (ANNEXE 12).

La comparaison des CE50 de ces produits révèle que l'acide gallique a montré un effet réducteur important comme témoin de référence, alors que l'EA-F est prouvé comme l'extrait antioxydant le plus important avec une $CE50=1218.75$ ug/ml (Tableau 3.20). La comparaison intergroupe par le test de Fisher dévoile aussi l'efficacité de l'EA-F par rapport à la vitamine E, l'EE-F, et l'EEP-F, avec une similarité de l'effet avec l'acide gallique ; qui est le témoin de référence le plus actif (Figure 3.68).

Tableau 3.20: Pouvoir réducteur des ions ferriques et les CE50 des trois extraits et des témoins positifs :

Produits	Valeur de P	Equation de la courbe	R ²	CE50%(ug/ml)
Vitamine E	P=0.000	$y = 0.05825 + 0.00495 \times (x)$	0.971	89.09
Acide gallique	P=0.000	$y = 0.4264 + 0.01330 \times (x)$	0.959	5.53
EE-F	P=0.000	$y = 0.1004 + 0.000202 \times (x)$	0.973	2972.27
EEP-F	P=0.000	$y = 0.03809 + 0.000107 \times (x)$	0.963	5028.87
EA-F	P=0.000	$y = 0.4610 + 0.000032 \times (x)$	0.839	1218.75

EE-F : Extrait éthanologique de feuilles, EEP-F : Extrait étheropétrolique de feuilles, EA-F ; Extrait aqueux de feuilles, y : Pourcentage de réduction de Fe⁺³, R2 : Coefficient de corrélation, CE50 : Concentration efficace qui inhibe 50 % des ions ferriques.

Il est évident que tous les extraits testés inhibent l'oxydation avec une nette hétérogénéité de l'efficacité aussi bien en fonction du solvant utilisé, que la méthode d'extraction. L'EA-F par les deux méthodes testées a présenté le pouvoir le plus important. Les taux de réduction antioxydante obtenus par la méthode de FRAP sont similaires aux résultats obtenus par le test de réduction de DPPH ; cette ressemblance est due certainement aux mécanismes des réactions mises en jeu (transfert d'électrons), et indique que les activités antioxydantes prouvées par ces deux tests sont assurées probablement par les mêmes molécules actives. L'EEP-F a présenté un effet antioxydant trop faible par les deux méthodes par rapport aux deux autres extraits testés ; cet extrait ne contiendrait pas de polyphénols du fait du caractère peu apolaire de l'éther de pétrole.

De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leur activité antioxydante. Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles détectés par l'infrarouge dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants [377], [378], et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la potentialité antioxydante [379]. Pour les flavonoïdes, les formes aglycones détectées par l'analyse UV-Visible sont plus actives que les formes glycosylées [380].

Concernant les travaux antérieurs réalisés sur cette activité ; rien n'a été rapporté dans la littérature sur le pouvoir antioxydant de n'importe quelle partie de *C.parqui* ; dont les choix des concentrations et les modes opératoires ont été inspirés d'une étude réalisée en Bangalore sur trois espèces apparentées ; où l'équipe de [299] a testé les extraits alcooliques de *C. aurantiacum*, *C. nocturnum* et *C. diurnum*.

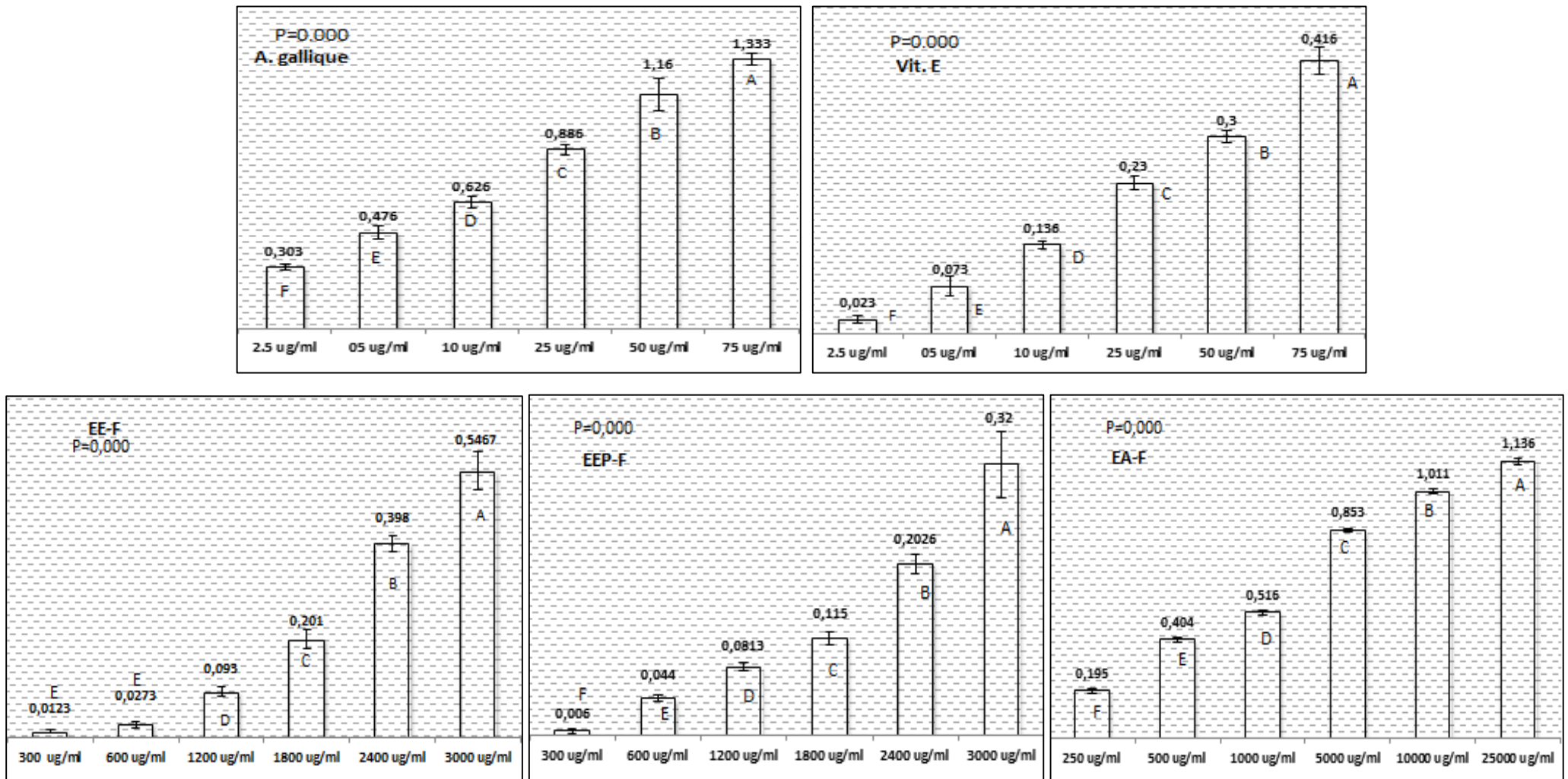


Figure 3.67 : Pouvoir réducteur des ions ferriques des trois extraits et les témoins positifs (Absorbance à 700 nm).

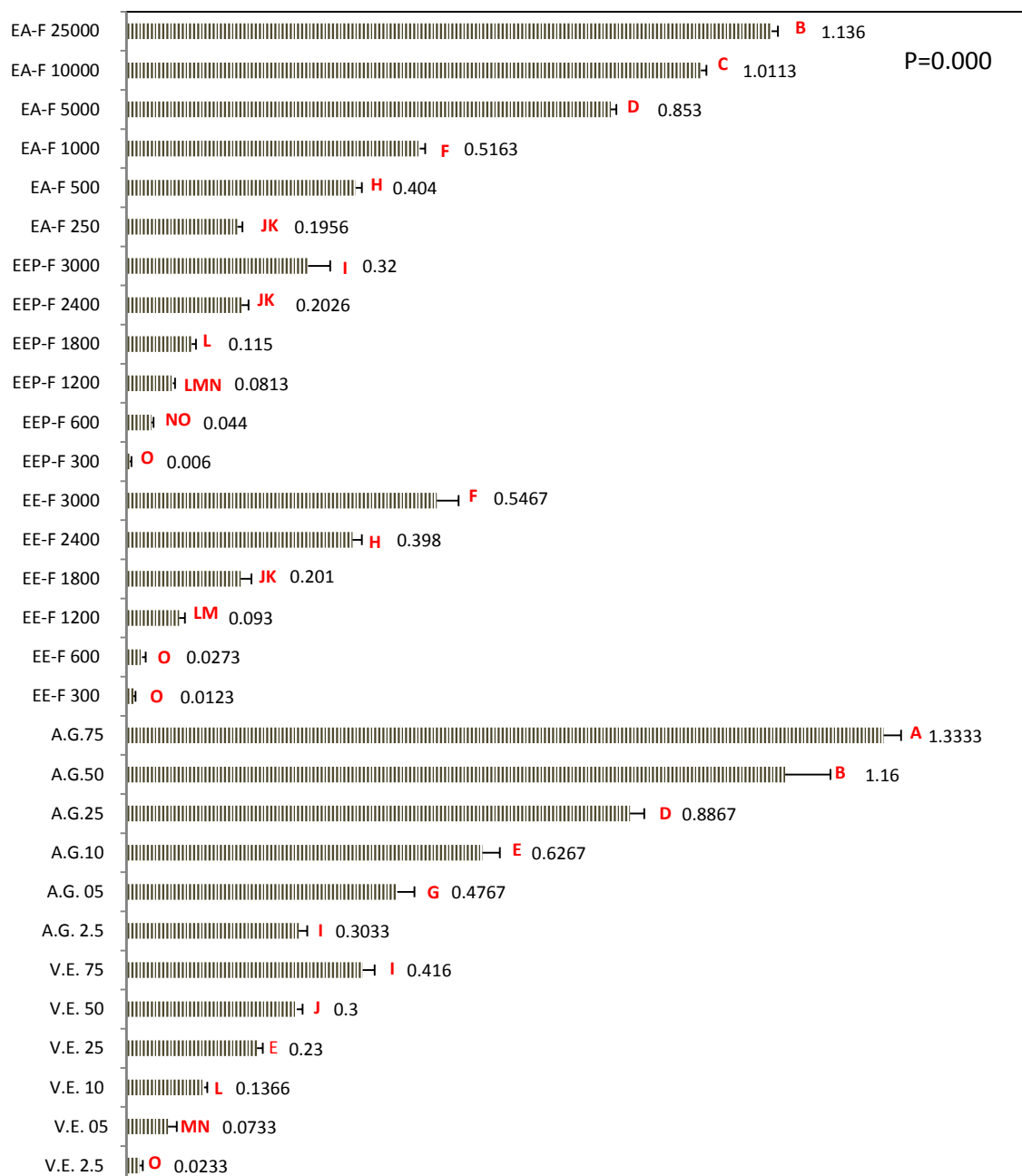


Figure 3.68 : Comparaison intergroupe globale de pouvoir antioxydant sur les ions ferriques des différentes concentrations des différents produits testés (Test de Fisher).

3.5.7. Résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'EE-F, L'EEP-F, et l'EA-F de feuilles de *C.parqui*

Le test de l'œdème de patte est un modèle de l'inflammation aiguë, il donne des résultats facilement exploitables. Les résultats obtenus à l'issu de ce test (ANNEXE 13)

sont exprimés par le pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris (Photo 3.69). La comparaison de l'effet anti-œdémateux des différents extraits de *C.parqui* est calculée par rapport aux témoins physiologiques, et contrôlé par la Diclofénac sodique à 3 mg/ml (AINS), et l'Hydrocortisone à 1 mg/ml (AIS).



Photo 3.69 : Œdème de la patte gauche de souris (Originale).

3.5.7.1. Résultats du pourcentage de formation de l'œdème des lots témoins

L'administration de la carraghénine a entraîné une augmentation significative du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris témoins ($P=0.000$) (Tableau 3.21). De plus la formation de l'œdème de patte de groupe traité par l'eau distillée stérile (30.32%) est révélée plus importante que celle de groupe injecté par l'huile de maïs (21.85%) ; cette différence est fortement liée à la différence du profil chimique des deux véhicules, on s'est référencié par ces deux taux de formation de l'œdème à fin de négliger leur effet et de se rapprocher réellement de l'effet des trois extraits testés.

Par ailleurs, l'administration du Diclofénac à la dose de 03 mg/kg *p.c.* et de l'hydrocortisone à 1 mg/kg *p.c.* par voie orale prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte des souris. Ces résultats sont significativement différents de ceux du contrôle physiologique (Tableau 3.21).

Tableau 3.21 : Comparaison de pourcentage de formation de l'œdème de patte entre les produits témoins :

Lots* P=0.000	Moyenne**	Médiane	IC 95%
E.D.S.	30,748 ^A ± 1,710	30,32	(28,062; 33,434)
Huile de maïs	21,85 ^B ± 8,36	19,80	(19,17; 24,54)
Dic 3mg/kg c.p	4,660 ^C ± 0,466	4,67	(1,974; 7,346)
HHC 1mg/kg c.p.	2,580 ^D ± 0,462	2,77	(-0,106; 5,266)

E.D.S. : Eau distillée stérile, Dic : Diclofénac sodique, HHC : Hydrocortisone, IC : Intervalle de confiance, * : Six répétitions pour chaque test, ** : Regroupement (A, B, ...) par le test de Fisher (Minitab17).

3.5.7.2. Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'EE-F

D'après la figure ci-dessous, on remarque un effet dose-dépendant de l'EE-F, et une différence hautement significative entre le pouvoir anti-inflammatoire des différentes doses des produits testés (P=0.000) (Figure 3.70 A). De même, la comparaison individuelle par le test de Fisher entre les différents produits a montré que l'effet de l'EE-F à 400 mg/kg p.c. a une efficacité importante presque comparable à celle du Diclofénac sodique (Figure 3.70 B). Cela signifie la bonne action anti-inflammatoire de l'EE-F sur l'œdème de patte.

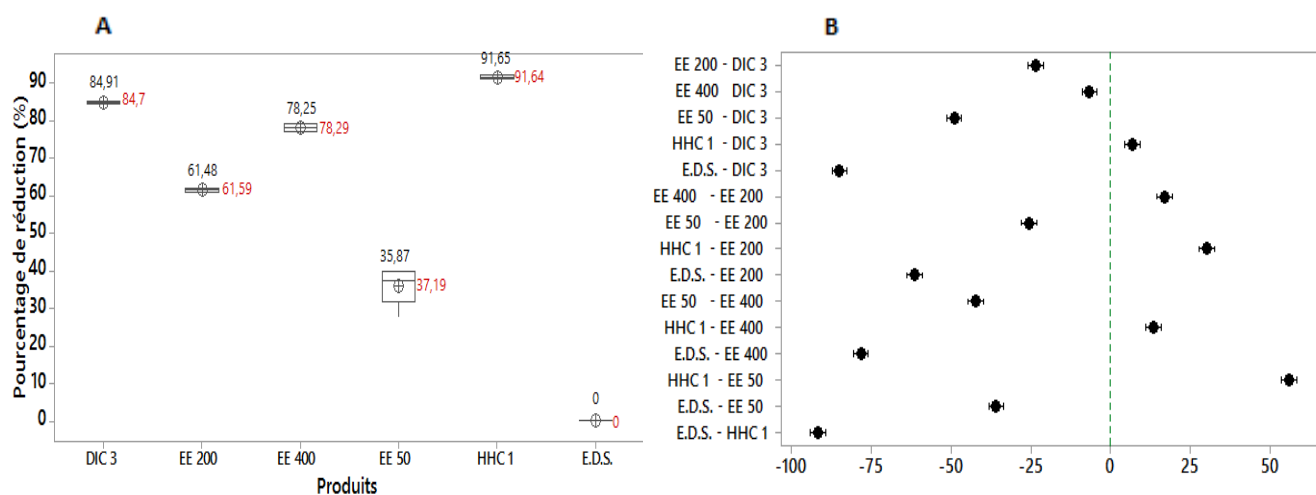


Figure 3.70 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème des pattes des souris de l'EE-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits (Test de Fischer) P=0.000.

3.5.7.3. Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'EEP-F

L'activité inhibitrice de l'EEP-F de l'œdème de patte est moins importante que celle de l'EE-F avec un taux de réduction maximal de 63.51% (400 mg/kg p.c.)

(Figure 3.71 A), cette activité est faiblement dose-dépendante suite à la similarité remarquée entre l'effet de la dose de 200 et de 400 mg/kg *p.c.* (Figure 3.71 B). La différence des valeurs autour des moyennes de chaque lots traité par l'EEP-F a été clairement observé dans la figure A par des écarts importants entre les moyennes et les médianes. Cela signifie une faible reproductibilité du test et probablement due à l'effet synergique entre l'EEP-F et l'Huile de maïs.

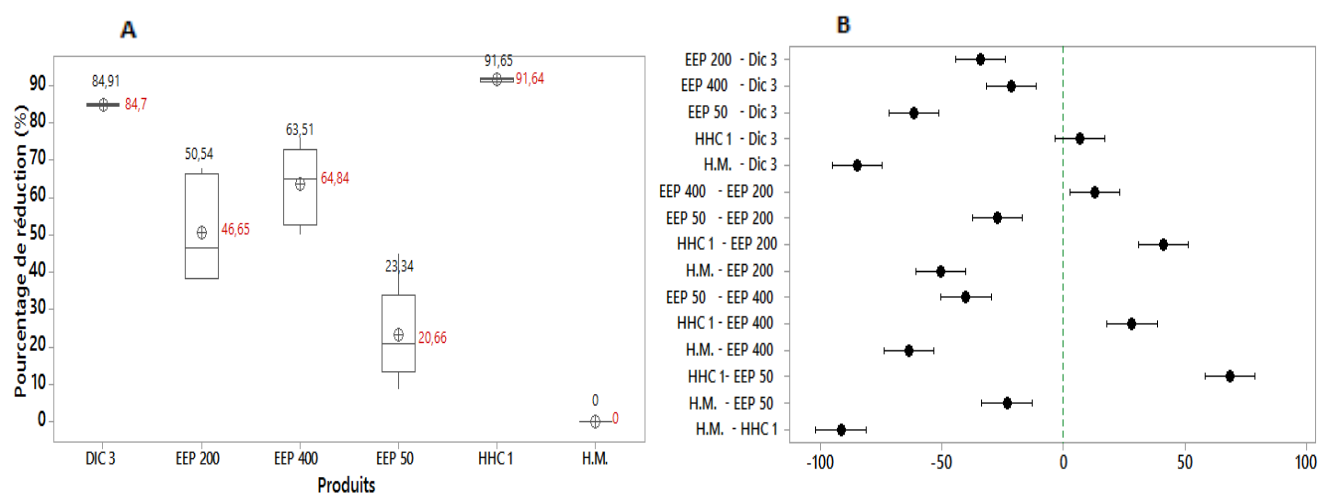


Figure 3.71 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris de l'EEP-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits (Test de Fischer) $P=0.000$.

3.5.7.4. Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'EA-F

Les volumes des pattes sont faiblement réduits par l'EA-F avec des taux de réductions trop négligeables par rapport à l'EE-F et l'EEP-F ; où le taux de réduction n'a pas dépassé 36% pour la concentration la plus élevée (Figure 3.52 A), de plus, la comparaison individuelle des différents effets (Figure 3.72 A) a montré aussi une minime différence entre l'effet de l'eau distillée qui est sensé être un solvant inerte et la faible concentration testée de l'EA-F (50 mg/kg *p.c.*).

L' EA-F s'est révélé un produit antiinflammatoire faible par rapport aux deux autres extraits testés ; malgré sa richesse en molécules formement connues comme agents antiinflammatoires (polyphénols, tanins, et en saponines) [28],[336]. Cette faible activité de l'EA-F peut être expliquée par le fait que la préparation à l'ordre de mg par rapport au poids corporelle d'une souris n'est pas probablement la préparation adéquate pour ce genre d'infusé : une application directe sur les

souris à partir de la préparation traditionnelle de cet extrait (g/ml) est fortement recommandée pour ce rapprocher à son effet antiinflammatoire réel.

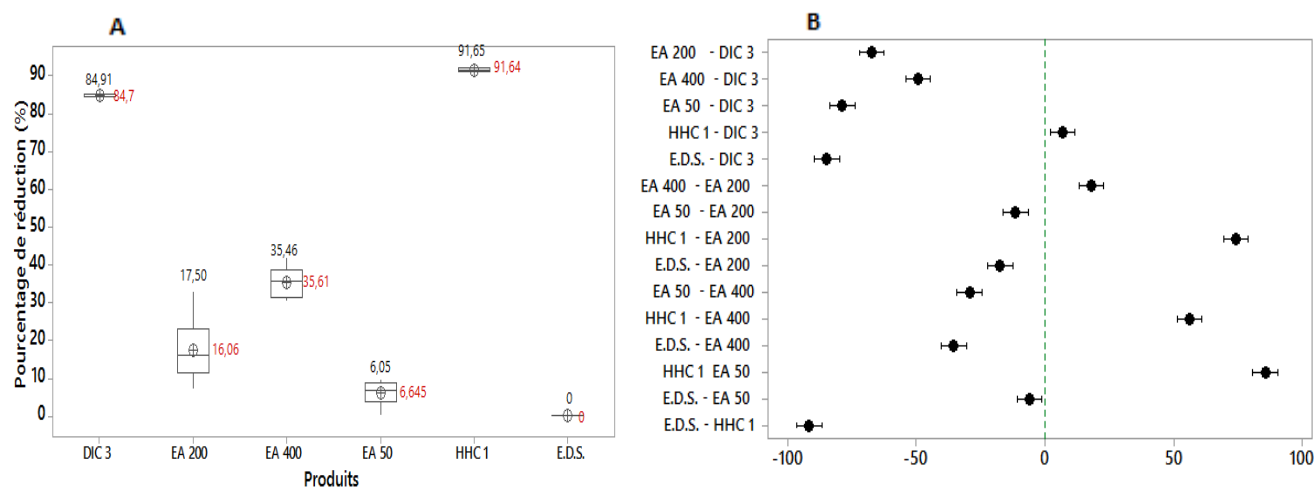


Figure 3.72 : A : Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris de l'EA-F par rapport aux lots témoins. B : Comparaison individuelle de l'effet anti-inflammatoire de tous les produits (Test de Fischer) $P=0.000$.

L'étude intergroupe globale comparative de l'effet anti-œdémateux des différents produits par le test de Fisher (Minitab17) dévoile une différence significative de l'efficacité des différentes concentrations utilisées avec un $P=0.000$ (Figure 3.73) : la Diclofénac sodique et l'hydrocortisone se positionnent en premier avec des taux de réductions très importants (84.91, 91.65%) respectivement, suivis par l'EE-F à 400 mg/kg *p.c.* qui a apparue plus efficace que l'EEP-F à 400 mg/kg *p.c.*, en plus, la similarité de l'effet de l'EE-F à 400 mg/kg *p.c.* avec celui du Diclofénac sodique (3 mg/kg) (Test de regroupement), et l'effet de l'EE-F à 200 mg/kg *p.c.* avec celui de l'EEP-F à 400 mg confère à l'EE-F le pouvoir anti-inflammatoire le plus marqué par rapport aux deux autres extraits de feuilles testés dans cette activité.

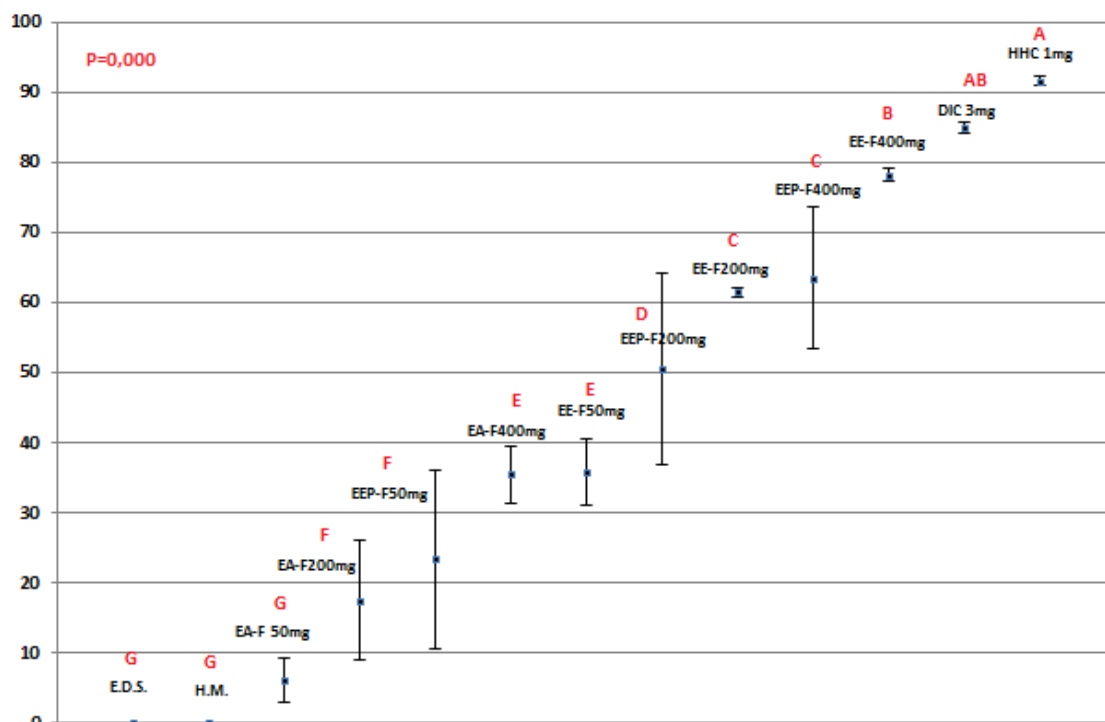


Figure 3.73 : Comparaison intergroupe de pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris entre les différentes concentrations des différents lots.

En effet, l'injection de la carraghénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5–3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat explique la cause de l'œdème localisé [240].

L'activité anti-inflammatoire de *Cestrum vert* pourrait s'expliquer par une inhibition de certains de ces médiateurs de l'inflammation par exemple la production de prostaglandines, les flavonoïdes retrouvés dans les feuilles qui sont des inhibiteurs de la 5-lipoxygénase sont doués d'activité anti-inflammatoire [381]. Les saponosides, et les stéroïdes trouvés dans les feuilles, seraient aussi responsables d'activité anti-inflammatoire [281], [33].

La richesse de l'EE-F en constituants polyphénoliques pourrait en partie expliquer son activité d'où la capacité de piéger les radicaux libres, empêcherait la formation des prostaglandines qui provoquent l'inflammation, et ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires. Les tanins et les flavonoïdes contribuent à cet effet anti-inflammatoire, ces composés ont le pouvoir d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tel que les leucotriènes, et les prostaglandines [382].

Par ailleurs, la présence de substances anti-radicalaires dans les feuilles de *C. parqui* (tanins, alcaloïdes...) pourrait empêcher la production des espèces réactives à l'oxygène qui favorisent la formation de médiateurs de l'inflammation.

Malgré la grande utilité traditionnelle de *Cestrum parqui* sur l'inflammation ; mais les travaux sur cette plante sont trop limités. Deux études seulement sont retrouvées dans la littérature et qui ont montré l'effet anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait alcoolique et l'infusé de cette plante ; l'équipe de [336] en Chili (1996) ont révélé un effet de 46.7% de l'extrait méthanolique de feuille à 1000 mg/kg sur l'inhibition de l'œdème de pattes induit par la carraghénine à 1% sur les cochons d'Inde pir-brillant (200-300g) , et un taux d'inhibition de 46.2% pour l'infusé à 800mg/kg. En 1999 ; l'équipe de [360] au Pakistan, ont rapporté que la même concentration de l'extrait méthanolique testée par [336], avait un pourcentage d'inhibition de l'œdème de patte des rats (120-150g) de 55%.

Les taux de réduction de l'œdème de patte obtenus au cours de cette étude représentent les résultats les plus importants par rapport à ces travaux antérieurs ; cela peut signifier par la méthode de l'extraction effectuée par le Soxhlet qui permet un épuisement total de la matière végétale en molécules actives.

CONCLUSION

Le travail réalisé dans cette thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé. L'objectif était d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés biologiques de *Cestrum parqui*.

Pour ce faire, nous avons au préalable essayé d'extraire des molécules actives à partir des feuilles de *Cestrum parqui* par trois solvants choisis en fonction de leur polarité, de manière à solubiliser un maximum de composés. Cette étape cruciale nous a permis de déterminer la nature des métabolites secondaires contenus dans ces extraits par un criblage chimique préliminaire. La nature des principes chimiques mis en évidence, nous a laissé prévoir des activités pharmacologiques intéressantes ; ainsi que l'extrait le moins polaire (Extrait étheropétrolique) avait un large profil d'efficacité par rapport aux deux autres extraits (Extrait éthanolique et l'extrait aqueux).

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel de *Cestrum parqui*, et confirme encore une fois la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux. Nos résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine de recherche des biomolécules actives. Cette étude pourrait éventuellement être complétée par des études complémentaires qui seront nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un phytomédicament à base de feuilles de *Cestrum parqui* ; citant par exemple :

- Des purifications et des fractionnements des extraits testés par une caractérisation des structures chimiques responsables des activités biologiques prouvées.

- Extraction avec d'autres types de solvants ; et même d'essayer d'autres types d'extraction (macération, décoction, extraction d'huile essentielle...), afin de connaître les meilleurs rendements, ainsi les résultats les plus prononcés.
- Etude comparative des différents effets testés dans ce travail entre les feuilles séchées et les feuilles fraîches.
- Tester la toxicité chronique et sub-chronique de la plante afin de la mise au point de l'atteinte physiopathologique et biochimique si elle existe, principalement l'hépatotoxicité, avec la détermination de la DL50 de chaque extrait testé.
- Tester d'autres méthodes que les activités réalisées dans notre travail ; afin d'élargir les points de connaissance sur la réelle efficacité des extraits testés (Activité anti-inflammatoire *in vitro*, activité antioxydante sur lignée cellulaire, activité antileishmanienne sur des formes amastigotes...).

REFERENCES

01. Mohammedi, Z., "Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie". Thèse de Doctorat en Biologie, Univ. de Tlemcen, (2013), 20 p.
02. Vines, G., "Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants". Plant life International, www.plantlife.org.uk. (2004).
03. Macheix, J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., "Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique", Presses polytechniques et universitaires romandes, Italie, 1^{er} Edition, (2005), 192 p.
04. Newman, D.J., Cragg, G.M., "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010", Journal of Natural Products, Vol. 75, n°3, (2012), 311- 335.
05. Cheriti, A., Belboukhari, N., Sekkoum, S., Hacin, I. S., "Plants of Algerian semi-arid regions used for the treatment of gastro-intestinal disorders", Journal Algerien des Regions, Arides, Vol 5, (2006), 07- 10.
06. Saad, A., Cheriti, A., Belboukhari, N., "L'apport des NTIC à l'Ethnopharmacologie du Sud Algérien". Annales de l'Université de Bechar, (2006), 149- 154.
07. Cheriti, A., Belboukhari, M., Belboukhari, N., Djeradi, H., "Phytochemical and biological studies on *Launaea* Cass. genus (Asteraceae) from Algerian Sahara", Current Topics in Phytochemistry, Vol.11, (2012), 67- 80.
08. Benkik, N., "Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*", Thèse de doctorat ; université Elhadj lakhder-Batna, (2006), 182 p.
09. Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., "Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen", Springer-Verlag, France, Paris, (2013), 123 p.
10. Strang, C., "Larousse medical". Ed Larousse, (2006).
11. Baba aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles", (2000), p : 2-3.
12. Mahmoudi, Y.L., "Thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie", Palais du Livre, Blida, Algeria, (1988), 214p.
13. Mpondo, E.M., Dibong, D.S., Flora, C., Yemeda, L., Priso, R.J., Ngoye, A., "Les plantes à phénols utilisées par les populations de la ville de Douala", Journal of Animal & Plant Sciences, Vol.15, (2012).
14. Garcia, J., "Plantes médicinales [en ligne]". Lattes : Chambre Régionale d'Agriculture du Languedoc-Roussillon, (2008).
15. Botineau, M., "Guide des plantes médicinales" (collection des guides des fous de nature), Paris : Belin, (2011), 239 p.
16. Organisation Mondiale De La Santé, "Directives OMS sur les Bonnes Pratiques Agricoles et les Bonnes Pratiques de Récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales" [en ligne]. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, (2003). Disponible sur : <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5526f/s5526f.pdf> (consulté le 14.11.2013).
17. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., "Botanique systématique. Une perspective phylogénétique". 1^{ère} Edition De Boeck Université. Paris, (2002), 383 p.

18. Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P., "Biogénèse des monoterpènes II- La chaîne isoprénique". Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux, Vol. 133, (1994), 79-99.
19. Aniszewski, T., "Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role". 1st Edition, Elsevier, (2007), 334 p.
20. Evans, C. W., "Alkaloids. In: Trease and Evans' pharmacognosy", 16th edition, (2009), 353- 415.
21. Walton, N.J., et Brown, D.E., "Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products", Ed: WORLD SCIENTIFIC, (1999),1-14.
22. Daayf, F., et Lattanzid,V., "Recent Advances in Poly phenol Research 1"; Ed: WILEY-BLACKWELL, (2008), 1- 24.
23. Rice-Evans, C. A., et Packer, L.," Flavonoids in Health and Disease", Ed: MARCEL DEKKER, (1998), 61- 160.
24. Walsh, G., "Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology", Ed2: WILEY & SONS, (2003), 23- 40.
25. Crozier A., Clifford, M.N., et Ashihara., H.,"Plant Secondary Metabolites", Ed: Oxford BLACKWELL, (2006), 1–24, 102-105.
26. Beddou, F., "Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes ; Rumex visicarius L. et Anvillea radiata Coss. Et Dur". Thèse de Doctorat ; Biologie cellulaire et biochimie. Université Aboubakr belkaid, Tlemcen, (2015), 162 p.
27. Cseke L, J., Kirakosyan, A.,et al., "Natural Products From Plants"; Ed2 : TAYLOR & FRANCIS ,CRC Press, (2006), 22- 25.
28. Di Carlo, G., MascoJo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs". Life Sci, (1999), Vol. 65, 337-353.
29. Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., et Varma, S.D., "Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin". Biochem Pharmacol, (1983), 32 p.
30. Woodman, O.L., Chan, ECh., "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II". Review of 93 intervention studies. Am. J. Clin. Nutr., Vol. 81, (2004), 243S-255S.
31. Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W., "Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids". Pharmacol. Ther., Vol. 90, n°3, (2001), 157-177.
32. Yang, C., Landau, M., Huang , M.T., Newmark, H.L., "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds". Anna. Rev. Nutr., Vol. 21, (2001), 381- 406.
33. Bruneton, J., "Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales". 4ème édition. Paris : édition Lavoisier, (2009), 65-169 p.
34. Bruneton, J., " Elément de Phytochimie et de Pharmacognosie ", édition Tec & Doc, Paris, Lavoisier, (1987), 199 p.
35. Borchers, A.T., Keen, C.L., Hannum, S.M., Gershwin, E.M., "Cocoa and chocolate : Composition", Bioavailability and Health implications.Journal of Medicinal Food, vol. 3, n°2,(2000),77-105.
36. Jalal, M.A.F., Collin, H.A., "Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of Theobroma cacao. Phytochemistry", vol. 16, n°9, (1977),1377-1380.
- 37 Borchers, A.T., Keen, C.L., Hannum, S.M., Gershwin, E.M., "Cocoa and chocolate : Composition", Bioavailability and Health implications.Journal of Medicinal Food, vol. 3, n°2,(2000),77-105.

38. Vivas de gaulejac, N., "Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox". Bordeaux : Féret, (2001).
39. Krief, S., "Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées". Thèse de Doctorat. Gif-sur-Yvette : MNHN, (2003).
40. Kim, J.Y., Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, D.H., Jeon, R., Ryu, J.H., "In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*" , (2009), Vol. 19, 937 -940.
41. Moss, G.P., "Nomenclature of lignans and neolignans" (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 72, n°8, (2000),1493-1523.
42. Catier, O., Roux, D., "Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie". 3^{ème} ed. France : Wolters Kluwer, (2007).
43. Iserin, P., "Larousse Encyclopédie des plantes médicinales". Edition Larousse, (2001), 10-17, 132.
44. Collin, S., Crouzet, J., "Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentation". Paris : Tec and Doc Lavoisier, (2011).
45. Paolini, V., Dorchies, Ph., Hoste, H., "Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre". *Alter. Agri.*,(2003), 17-19.
46. Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G.I., et Nishioka, I., "Phytochemistry" , Vol. 24, n°10, (1985), 2245-2250.
47. Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers S., et Pieters, L.A., "Planta. Medica"., Vol. 64, (1997), 79-109.
48. Bruneton, J., "Pharmacognosie". Edition Tech & Doc, Lavoisier, Paris, (1985), 226 p.
49. Bhat, S.V., Nagasampigi, B.A. ,et Sivakumar, M., "Chemistry of Natural Products"; Ed 1: NAROSA, SPRINGER, (2005), 115-252.
50. Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E., Croteau, R., "Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*", Vol. 120, n°3, (1999), 879-886.
51. Zenk, M.H., Juenger, M., "Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds". *Phytochemistry*, Vol. 68, n° (22-24), (2007), 2757-2772.
52. Roberts, M.F., Wink, M., "Alkaloids : Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications". New York : Plenum Press, (1998).
53. Stockigt, J., Sheludk ,Y., Unger M. Gerasimenko I., Warzecha H., Stockigt D.," High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups". *Journal of chromatography A*, Vol. 967, n°1, (2002), 85-113.
54. Badiaga, M., " Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali". Thèse de Doctorat. Mali : Université de Bamako, (2011).
55. Adjanohoun, E., et al., "Contribution aux études ethnobotanique et floristique en république populaire du Bénin, Médecine traditionnelle et Pharmacopée", ACCT, (2006),
56. Wyllie, M.G., "A groundswell for phytotherapy?" *BJU International* , 97, (2006),1345-1346.
57. Jekyll, D.R., et Hyde, M.R., "Les toxines", ed. Bio future, (2006),1-34.

58. Alalaoui, M.D., "Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Nigella sativa*", (2015),
59. Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O., "Safety of traditional Arab herbal medicine, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine", Vol. 3, (2006),
60. Tarantino, G., et al., "Drug-induced liver injury due to "natural products" used for weight loss: a case report". *World journal of gastro-enterology* , Vol. 15, (2009), 2414 p.
61. Gilles, C., "Bien choisir ses plantes", *Biocontact*, (2010).
62. Bruneton, J., "Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux". 3ème édition, Lavoisier, (2007).
63. Skalli S., Zaid, A., Soulaymani, R., "Drug interactions with herbal medicines". *Therapeutics drug monitoring* ,Vol. 29, n° 6, (2007), 679 p.
64. Stedman, C., "Herbal hepatotoxicity". *Seminars in liver disease* , Vol. 22, (2002),195 p.
65. Berrin, Y., Ali, Ö., Umut, S., Meltem, E., Murat, B., Barut, Y., "Multi-organ toxicity following ingestion of mixed herbal preparations. An unusual dangerous adverse effect of phytotherapy". *European journal of internal medicine* , Vol. 17, (2006), 130-132.
66. Flesch, F., (Praticien hospitalier), "Intoxications d'origine végétale Plant poisoning". *EMC-Médecine*, Vol. 2, (2005), 532–546.
67. Huxley, A., Griffi, T.M., "The New Royal Horticultural Society". *Dictionary of Gardening*. Macmillan Press , London, (1992).
68. Hunziker, A.T., "Genera Solanacearum: the Genera of Solanaceae. Illustrated, Arranged According to a New System. A.R.G." Gantner , Königstein, Germany , (2001).
69. Hallé, F., Danton, P., et Perrier, C., "Architectures de plantes de l'Île Robinson Crusoe", (2007).
70. Hashimoto, G., "Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants," Aboc-sha, Kanagawa, (1996), 1120-1124.
71. Sharif, M., Rahman, A., Kang, S.C., "Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. on food-borne pathogens", *Int J Food Sci Tech*, Vol. 44, (2009), 1176–1182.
72. Mello, J.R.B., "Calcinosis-calcinogenic plants" (Review), *Toxicon*, Vol. 41, n°1, (2003),1-12.
73. Stone, B., "The flora of Guam", *Micronesica*, Vol. 6, (1970), 516 p.
74. Barbouche, N., Hajjem, B., Lognay, G., Ammar, M., "Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.)". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, Vol. 5, (2001), 85-90.
75. Croft, D., et Holding, D., "A community approach: Green *Cestrum*. factsheet. cooperative research centre for australian Weed management". www.weeds.crc.org.au, (2004).
76. Aguilar, R., et Galetto, L., "Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae)", *Oecologia*, Vol.138, (2004), 513–520.
77. Reid, S., et Armesto, Juan, J., "Avian gut-passage effects on seed germination of shrubland species in Mediterranean central Chile", *Plant Ecol.*, Vol. 212, (2011), 1–10.
78. <http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/weeds/a-z-of-weeds/chilean-cestrum>.

79. Canham, P., Warren, F.L., "Saponins.- II. Isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum parqui*". J South African Chem Inst, Vol. 3, (1950), 63–65.
80. Cabrera, A.L., et al., "Flora de la Provincia de Jujuy, República Argentina. Parte VIII. Clethráceas a Solanáneas". INTA, Buenos Aires, Argentina, (1983).
81. Ratsch, C., "The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications". Rochester: Park Street Press, (1998).
82. Stabolone, L., Ragozzino, A. et Thomas H., "Characterization of *Cestrum* yellow leaf curling virus: a new member of the family Caulimoviridae", Journal of General Virology Vol. 84, (2003), 3459–3464.
83. Ernest, E., "Arbres, Arbustes et Arbrisseaux". OPU, (1988), 126 p.
84. Matthew, B., "Year 9 St Ignatius College - Riverview , Green *Cestrum parqui*" , (2005), 1-10.
85. Riaz, M., Chaudhary, F., "Chemistry of the medicinal plants of the genus *C e s t r u m* (Family Solanaceae)". Hamdard-Medicus, Vol. 36, (1993), 128–134.
86. Silva, M., Mancinelli, P., and Cheul, M., "Chemical Study of *Cestrum parqui*", (1961).
87. Ragonese, A.E., Milano, V.A., "Vegetales y Substancias Toxicas de la Flora Argentina", Ed. Acme, Buenos Aires, (1984).
88. Lopez, T., Keeler, R.F., Sharma, R.P., Shupe, J.L., "Algunas sustancias quimicas vinculadas con la toxicidad de *Cestrum parqui* L'Heritier". Vet. Argent. Vol. 1, (1984), 966–967.
89. Gloria, C., Rodrigo, Giovanna, R., Almanza, Bjorn A., and Rui-Dong, Duan., "Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants". Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4, n°21, (2010), 2204-2210.
90. Ikbil, C., "Pesticidal potentialities of *Cestrum parqui* Saponins", International journal of agricultural research, Vol. 2, n°3, (2007), 275-281.
91. Ben Ahmed, D., Ikbil, C., Belhadj Salah, K., Boukamch, H., Ben Jannet, H., Mighri, Z., and Daami-Remadi M., "Antibacterial and antifungal activities of *Cestrum parqui* saponins: possible interaction with membrane sterols", International Research Journal of Plant Science, Vol. 3, (2012), 1-7.
92. Khaled, R., Ching-Wen, C., Lung-Yuan, W., Wen Yueng, P., "Hepatoprotective effect of *cestrum parqui* L. aerial parts and phytochemical profil". Word journal of pharmaceutical sciences, Vol. 1 n°2, (2013), 39-46.
93. Silva, M., Mancinelli, P., Cheul, M., "Chemical study of *Cestrum parqui*". Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 5, (1962), 289.
94. Pearce, C.M., Skelton, N.J., Naylor, S., Kanaan, R., Kelland, J., Oerlich, P.B., Sanders, J.K.M., William, D.H., "Parquin and Carboxyparquin, Toxic Kaurene Glycosides from the Shrub *Cestrum parqui*". Journal of the Chemical Society, Vol. 1, (1992), 593-600.
95. Echeverría, J., Niemeyer, H.M., "Alkaloids from the native Flora of Chile: a review Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas", Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile. Vol. 11, n° 4, (2012), 291-305.
96. George, E., Burrows, K., and Ronald, J., Tyrl. "Toxic Plants of North America", Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. (2013), 1131.1138-1141.
97. Eckart, E., "Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites Biosynthesis, hemotaxonom"y, Biological and Economic Significance (A Handbook). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2008), 4-644.

98. D'Abrosca B., DellaGreca M., Fiorentino A., Pietro M., Natale A., Oriano P., Zarrelli. A., "Structural characterization of phytotoxic terpenoids from *Cestrum parqui*". *Phytochemistry*, Vol. 66, (2005), 2681–2688.
99. Monroe, E., Wall, C.S., Fenske, J.W., Garvin, J.J., Willaman, D., Quentin, J., Bernice, G., Schubert, and Gentry, H.S., "Survey of Plants for Steroidal Sapogenins and Other Constituents". *Journal of american pharmaceutical association* VXLVIII, n°12, (1959).
100. D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Zarrelli, A., "Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*". *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 52, n°13,(2004),4101–4108
101. Kip, E., Panter, D.R., Gardner, S.T., Lee, J.A., Pfister, M.H., Ralphs, B.L., Stegelmeier, and James, L.F., "Important poisonous plants of the United States". *Veterinary Toxicology*, Edited by Ramesh C. Gupta ISBN: 978-0-12-370467-2 , Vol. 66,(2007), 863-864.
102. Descazeaux, J., "Intoxicación des ruminants par *Cestrum parqui*". *Comptes Rendues Société de Biologie* Vol. 3, (1930), 240-241.
103. Franco, E.D., "Sul *Cestrum parqui*. Pianta venenosa per i nostri animali domestici. Zooprofilasi" Vol. 7, (1952), 726-729.
104. Pérez, M., Anderson, H., "Intoxicación de los animales con *Cestrum parqui* (L'Herit)". *Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria de Chile*, Vol. 4, 1-6, (1953).
105. Garay, J., Sager, R., "El palque o Duraznillo negro. Revista Sociedad Rural de Jesús María" (Argentina), Vol. 124, (2001), 24-25.
106. Gallo, G., "Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América. 2a ed. Buenos Aires", Hemisferio sur, (1987), 213 p.
107. Méndez, M.C., "Intoxicação por *Cestrum parqui*. En: Riet-Correa, F.; Méndez, M.C.; Schild, A.L., *Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos*. Montevideo", Hemisferio Sur, (1993), 64-71.
108. Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Peixoto, P.V., "Plantas tóxicas do Brasil". Río de Janeiro. *Helianthus*, (2000), 310 p.
109. Riet-Correa, F., Schild, A., Méndez, M.C., Pinheiro, M., "Intoxicación por *Cestrum parqui* (Solanaceae) en bovinos en Río Grande del Sur". *Pesquisa Veterinaria Brasileira* Vol. 6, (1986), 111-115.
110. Mc Lennan, M.W., Kelly, W.R., "Cestrum parqui (Green Cestrum) poisoning in cattle". *Australian Veterinary Journal* , Vol. 61, (1984), 289-291.
111. Myler, P.J., and Fasel, N., "Leishmania : after the genome", british ed., Caiser Academic Press. (2008).
112. OMS,"La lutte contre la leishmaniose" ; Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22 - 26 mars, n°949, (2010).
113. Barker, D.C., and Butcher, J., "The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 77, n°3, (1983), 285-297.
114. Mendoza-Leon, A., et al., "Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 96, n°1, (2002),5-70.
115. Sacks, D.L., "Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence". *Cell Microbiol*, Vol. 3, n° 4, (2001),189-196.
116. Killick-Kendrick, R., "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review". *Med Vet Entomol*, Vol. 4, n°1, (1990),1-24.

117. Castellon, A., "Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms". Thèse de DOCTORAT ; Institut National Polytechnique de Toulouse, (2007).
118. Ouellette, M., et al., "Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era". *Med Sci (Paris)*, Vol. 19, n°10, (2003), 900-909.
119. Dedet, J.P., "Les Leishmanioses". France ed, Ellipses Paris, (1999), 1-6.
120. Schlein, Y., "Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission". *Parasitol Today*, Vol. 9, n° 7, (1993), 255-258.
121. Killick-Kendrick, R., and Molyneux, D.H., "Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 75, n°1, (1981), 152-154.
122. Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaid, M., et Tabet-Derraz, O., "Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie". *Bull. Soc. Pathol. Exot*, Vol. 88, (1995), 180-184.
123. Bachi, F., "Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie" Vol. 21, (2006), 9-15.
124. Epelboin, L., "Prise en charge des leishmanioses en Algérie" ; Journées d'échanges scientifiques de l'Ouarsenis Tissemsilt, Algérie, (2012).
125. Cherif, K., "Etude Eco-Epidémiologique De La Leishmaniose Cutanée Dans Le Bassin Du Hodna (M'SILA)", Université Ferhat Abbas Sétif 1, (2014).
126. Institut National De Sante Publique, (INSP ALGERIE), "Situation Epidémiologique provisoire de l'année 2011 sur la base des cas déclarés à l'I.N.S.P". Relevés épidémiologiques mensuels, (2011).
127. Banuls, A.L., Hide, M., and Prugnotte, F., "Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans". *Adv Parasitol*, Vol. 64, (2007), 1-109.
128. Reithinger, R., et al., "Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*", Vol. 7, n° 9, (2007), 581-596.
129. Banuls, A.L., Hide, M., and Prugnotte, F., "Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans". *Adv Parasitol*, Vol. 64, (2007), 1-109.
130. Grevelink, S.A., and Lerner, E.A., "Leishmaniasis". *J Am Acad Dermatol*, Vol. 34(2 Pt 1), (1996), 257-272.
131. Grogil, M., Thomason, T.N., and Franke, E.D., "Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease". *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 47, n°1, (1992), 117-126.
132. Baiocco, P., et al., "Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis". *J Med Chem*, Vol. 52, n°8, (2009), 2603-2612.
133. Basselin, M., et al., "Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion". *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 46, n°12, (2002), 3731-3738.
134. Mukherjee, A., et al., "Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*". *Mol Biochem Parasitol*, Vol. 145, n°1, (2006), 1-10.
135. Sundar, S., et al., "Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India". *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 65, n°3, (2001), 193-196.

136. Organisation Mondiale de Santé O.M.S., "Lutte contre la leishmaniose". in SOIXANTIEME ASSEMBLEE MONDIALE DE LA SANTE, (2007).
137. Croft, S.L. and Coombs, G.H. "Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs". Trends Parasitol, Vol. 19, n°11, 2003, 502-508.
138. Berman, J., "Clinical status of agents being developed for leishmaniasis". Expert Opin Investig Drugs, Vol.14, n°11, (2005),1337-1346.
139. Soto, J., et al., "Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis". Am J Trop Med Hyg, Vol.78, n°2, (2008), 210-211.
140. Yardley, V., et al., "The sensitivity of clinical isolates of Leishmania from Peru and Nepal to miltefosine". Am J Trop Med Hyg, Vol.3, (2005), 272-275.
141. Wasunna, M.K., et al., "A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya". Am J Trop Med Hyg, Vol. 73, n°5, (2005), 871-876.
142. Jha, T.K., et al., "A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India". Am J Trop Med Hyg, Vol.73, n° 6, (2005),1005-1011.
143. Buates, S., and Matlashewski, G., "Identification of genes induced by a macrophage activator, S-28463, using gene expression array analysis". Antimicrob Agents Chemother, Vol.45, n°4, (2001), 1137-42.
144. Arevalo, I., et al., "Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator". Clin Infect Dis, Vol. 33, n°11, 2001, 1847-51.
145. Miranda-Verastegui, C., et al., "Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru". Clin Infect Dis, Vol. 40, n°10, (2005),1395-403.
146. Berman, J., "Current treatment approaches to leishmaniasis". Curr Opin Infect Dis, Vol.16, n°5, (2003), 397-401.
147. Chan-Bacab, M. J., Peña-Rodríguez, L.M., "Plant natural products with leishmanicidal activity". Nat. Prod. Rep, Vol.18,(2001), 674-688.
148. Carvalho, P.B., Ferreira, E.I., "Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-Review". Fitoterapia, Vol. 72, (2001), 599-618.
149. Fournet, A., Munoz, V., "Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs". Curr. Top. Med. Chem. Vol.2, (2002),1215-1237.
150. Fey, M.F., Dreyling, M., "On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Acute myeloblastic leukaemias and myelodysplastic syndromes in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". Ann Oncol, May,Vol.158,(2010),1-61.
151. Foucar, K., Reichard, K., Czuchlewski, D., "Bone marrow pathology". Chicago: ASCP Press, (2010).
152. Hodgson, C.S., et al., "Le cancer du sang au Canada, Faits et statistiques", Rapport annuel de société de leucémie et lymphome de Canada, (2016), 1-16.
153. LSC., (Ligue suisse contre le cancer), 3ème Ed. Ast & Fischer SA, Wabern, revue, (2016), 52.
154. Nieboer, E., and Jusys, A.A., "Biologic chemistry of chromium", Advances in nvironmental sciences and technology, Vol. 20, (1988), 21-81.
155. Johnson, J.J., and Mukhtar, H., "Curcumin for chemoprevention of colon cancer". Cancer Letter, Vol. 255, (2007),170-181.

156. Giacomelli, C., Natali, L., Letizia, Trincavelli M., Daniele, S., Bertoli, A., Flamini, G., et al. "New insights into the anticancer activity of carnosol: p53 reactivation in the U87MG human glioblastoma cell line". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 74, (2016), 95-108.
157. Ainane, T., "Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*". Thèse de doctorat. Université Hassan II – Casablanca, Maroc, (2011), 62-64.
158. Mann, J., "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future". *Nat Rev Cancer*, Vol. 2, n °2, (2002), 143-148.
159. Barlo, vatz-Meimon, G., and Adolphe, M., "Cultures de cellules animales, Méthodologies - App lications". *Techniques en ...*, Paris: Editions INSERM,(2003).
160. Jacolot, M.C., "LES CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES, ORIGINES DU CANCER ? HYPOTHÈSES, CARACTÉRISTIQUES ET IMPLICATIONS. THÉRAPEUTIQUES EN MÉDECINE HUMAINE ET VÉTÉRINAIRE". THÈSE Pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE. (2013),53-55.
161. Degos, L., "Les cultures de cellules leucémiques", (1985), 43-44.
162. Jeannesson, E., "PROFILS GENETIQUES DE LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES MODELES EN PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOTOXICOLOGIE CARDIO-VASCULAIRES", THESE pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR en PHARMACIE, UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1, FACULTE DE PHARMACIE, (2007),1-85.
163. Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., "Steinman RM, Muller W.A.,"Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*". *Immunity*, Vol.11, (1999), 753-761.
164. Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties". *Immunity*, Vol.19, (2003), 71-82.
165. Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., Jung, S., "Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells". *The Journal of experimental medicine*, Vol. 204, (2007), 171-180.
166. Strauss-Ayali, D., Conrad, S.M., Mosser, D.M., "Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection". *Journal of leukocyte biology*, Vol. 82, (2007), 244-252.
167. Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G.,"Monocyte-mediated defense against microbial pathogens". *Annual review of immunology* , Vol. 26, (2008), 421-452.
168. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior". *Science*, Vol. 317, (2007), 666-670.
169. Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A., "Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*", Vol. 4, (1996), 431-443.
170. Williams, M.J., "Drosophila hemopoiesis and cellular immunity". *Journal of immunology*, Vol. 178, (2007), 4711-4716.
171. https://de.123rf.com/photo_54511470_monozyt-art-von-wei%C3%9Fen-blutk%C3%B6rperchen-die-in-makrophagen-dendritischen-zellen-und-chaumzellen-untersche.html.

172. Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al., "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)". *Int J Cancer*, Vol. 26, n°2, (1980), 171-6.
173. Bosshart, H., and Heinzelmann M., "THP-1 cells as a model for human monocytes", *Ann Transl Med*, Vol.4, n°21, (2016), 438.
174. Auwerx, J., "The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation". *Experientia*, Vol. 47, n°1, (1991), 22-31.
175. Kremlev, S.G., and Phelps, D.S., "Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line". *Am J Physiol*, Vol. 272, n°6, (1997), 1070-1077.
176. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., and Dieter, P., "Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3", *J Leukoc Biol*, Vol. 59, n°4, (1996), 555-561.
177. Tsuchiya, S., Yamabe, M., et al., "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)". *Int J Cancer*, Vol. 26, n°2, (1980), 171-6.
178. Besson, N., "Analyse biochimique du bis(monoacylglycérol)phosphate dans les cellules monocytiques THP-1 et étude de son rôle sur le trafic intracellulaire du cholestérol". Thèse de doctorat., INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON, (2006).
179. Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., and Kodama, T., "A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage". *J Atheroscler Thromb*, Vol. 11, n°2, (2004), 88-97.
180. Hart, T., Shears, P., "Atlas de poche de microbiologie Médecine –Sciences-Flammarion", Casinir-Delarigne, Paris, (1997), 423 p.
181. Khiati, M., "Guide des maladies infectieuses et parasitaires", OPU, Alger, (1998).
182. Delamare, G., "Dictionnaire des termes de médecine". Editions Maloine, Paris, (1992).
183. Berche, P., Gaillard, J-L., Simonet, M., "Bactériologie: bactéries des infections humaines". Médecine-Sciences Flammarion, (1989).
184. Leclerc, H., Gaillard, J-L., Simonet, M., "Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien". Doin Editeurs, Paris, (1995).
185. Dupon, B., Drouhet, E., "Antifongiques. *Encycl. Méd. Chir*", Paris, (1987), 14.
186. Leminor, L., et Veron, M., "Bactériologie médiale". *Flamm. Méd. Sci*, (1989), 273-294.
187. Billib, J., Sherman, P.W., "Antimicrobial Functions of Spices ": Why Some Like it Hot. *Quarterly Review of Biology*, Vol. 73, n°1, (1998), 3-49.
188. Rybak, M.J., "Resistance to antimicrobial agents : an update". *Pharmacotherapy*, Vol.24 (2004), n°12 , 203S-215S.
189. Simonsen, G.S., Tapsall, J.W., Allergranzi, B., Talbot, E.A., Lazzari, S., "The antimicrobial resistance containment and surveillance approach"- a public health tool. *Bulletin of World Health Organisation*, Vol 82, n°12, (2004), 928-934.
190. Hulin, A., "Deguillaume AM, Bretagne S. Bézie Y. Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et Aspergilloses invasives"- *J Pharm Clin* ; Vol.24, n°3, (2005). 125-38.
191. Ann, D.V., "Examen mycologique en dermatologie" Vol.132, (2005), 8S89-104.
192. Alcamo, E., "Fundamentals of microbiology (5^{ème} édition) : The Fungi- Adison Wilsey Longman Inc, (1997), 429-461.

193. Prasad, R., Kapoor, K., "Multidrug resistance in yeast *Candida*- *Int. Rev. Cytol*", Vol. 242, ,(2004),215-248.
194. APC., Association pharmaceutique canadienne, Compendium of nonprescription products : summer, Canadian Pharmacists Association, 8th ed., Ottawa, (2001).
195. Aguilar, C., Jullien, V., Alanio, A., Bretagne, C., Frange, B., Lanternier, F., Lortholary, O., "EMC-Maladies infectieuses". Vol.12, n° 1,(2015). 1-5.
196. White, T.C., Marr, K.A., and Bowden, R.A., "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance". *Clin. Microbiol. Rev*, Vol.11, (1998), 382-402.
197. Baixench, M.-T., Aoun, N., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Ramires, S., Piketty, C. and Dannaoui, E., "Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*": case report and review. *J. Antimicrob. Chemoth.* Vol. 59, (2007), 1076-1083.
198. Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K.,"Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of plant antimicrobials". *Antimicrobials agents aand chemotherapy*, Vol. 46, n°10,(2002), 3133-3141.
199. Lewis, K., Ausubel, F.M., "Prospects for plant-derived antibacterials". *Nature biotechnology*, Vol.24, n°12, (2006),1504-1507.
200. Lewis, K., "In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps". *Journal of molecular microbiology and biothechnology*, Vol. 3, n°2, (2001), 247-254.
201. Glordani, R.,Kaloustian, J., "Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques-Phytéthérapie", Vol.3 , (2006), 121-124.
202. Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., O'Brien, P.J., "Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*", Vol. 12, n° 22, (2005), 2601-2623.
203. Droge, W., "Free radicals in the physiological control of cell function". *Physiological reviews*, Vol. 82, n°1, (2002), 47-95.
204. Favier, F., "Le stress oxydant. L'actualité chimique", (2003) ,108-115.
205. Halliwell, B., "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)". *Free Radical Research*, Vol. 31, n°4, (1999), 261-272.
206. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 39, n°1, (2007), 44-84.
207. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh Z., and Jore, D., "Espèces réactives de l'oxygène". *L'actualité chimique*,(2003), 91-96.
208. Zhang, D.X., and Gutterman, D.D., "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 292, (2007), 2023-2031.
209. Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D., "Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*", Vol. 78, n°13, (2013),1490-1511.
210. Guzik, T.G., "Functional studies of NADPH oxidases in human vasculature. In: studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice". Springer Science Business Media, (2010), 149-167.
211. Touyz, R.M., Chignalia, A., and Sedeek, M., "Reactive oxygen species, oxidative stress and hypertension. In: Studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice", Springer Science Business Media, (2010), 281-315.

212. Cai, H., "Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms and consequences". *Cardiovascular Research*, Vol. 68, n°1, (2005), 26-36.
213. O'Mahony, J.A., Fox, P.F. and Kelly, A.L., "Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry", 4th Edition, Springer Science Business Media New York, (2013), 337-385.
214. Sandalio, L.M., Rodriguez-serrano, M., Romero-puertas, M., and Ddel rio, L., "Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. In: peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, subcellular biochemistry". Springer Science Business Media Dordrecht, (2013), 233-249.
215. Wages, P.A., Silbajoris, R., Speen, A., Brighton, L., Henriquez, A., Tong, H., Bromberg, P.A., Simmons, S.O., and Samet, J.M., "Role of H₂O₂ in the oxidative effects of zinc exposure in human airway epithelial cells", *Redox Biology*, Vol. 3, (2014), 47-55.
216. Fontaine, E., "Radicaux libres. In: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer-Verlag France", (2007), 251-257.
217. Maccarrone, M., "Lipoxygenases, apoptosis and the role of antioxidants. In: Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment". Springer Science Business Media, (2008), 321-332.
218. Ouellet, C., Bilodeau, G., et Cantin, A.M., "Stress oxydatif, tabagisme et CFTR: est-ce que le tabagisme peut conduire à la mucoviscidose". *Nouvelle médecine*, Vol. 1, n° 23, (2007), 1-2.
219. Franco, Ro., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., and Panayiotidis, M.I., "Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis". *Mutation Research*, Vol. 674, (2009) ,3-22.
220. Mena, S., Ortega, A., and Estrela, J.M., "Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis". *Mutation Research*, Vol. 674, (2009) , 36-44.
221. Pickering, A.M., Vojtovich, L., Tower, J., and Davies, J.A., "Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress". *Free radical biology and medicine*. Vol.55, (2013), 109-118.
222. Burton, G., and Jauniaux, E., "Oxidative stress. Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology", Vol. 25, (2011), 287-299.
223. Charbon, G., Bjorn, L., Mendoza-Chamizo, B., Fridodt-Moller, J., and Lobner-Olesen, A., "Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, n°21, (2014), 13228-13241.
224. Důračková, Z., "Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Mitochondrial medicine". Springer Science and Business Media, (2008), 19-54.
225. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., and Dhama, K., "Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay". *BioMed Research International*, (2014), 1-14.
226. Kamal-Eldin, A., "Lipid oxidation pathways. American Oil Chemists", Society ed. Champaign, Illinois, (2003), 323p.
227. Bennamara, F. Z., "Stress oxydant Et pathologies humaine". Thèse de doctorat : pharmacie. UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT, (2017), 205 p.
228. Vansant, G., "Radicaux libres et antioxydants : principes de base". Ed Institut Danone. (2004), 83 p.
229. Halliwell, B., "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans". *Free Radical Research*, Vol. 25, (1996), 1-32.

230. Opara, E.S., "Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications". Journal of the Royal Society for the Promotion of Health, Vol. 122, (2002), 28-34.
231. Arora, A., Sairam, R., Srivastava, G., "Oxidative stress and antioxidative system in plants". Current Science, Vol. 82, (2002), 1227-1238.
232. Njus, D., Kelley, P.M., "Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*". FEBS Letters, Vol. 284, n°2, (1991), 147-151.
233. Pourrut B., "Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*". Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France, (2008).
234. Miller, N-J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls". FEBS Letters, Vol. 384, (1996), 240-242.
235. Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benayache, F., Leghouchi, E., et Bousseboua, H., "The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration". Thérapie, Vol. 61, n°4, (2006), 347-355.
236. Diallo, A., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie". Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako, Mali, (2005).
237. Lechat, P., Calvo, F., De Crémoux, P., Giroud, J.P., Lagier, G., Lechat, P.h., Rouveix, B., Weber, S., "Les médicaments de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie". Masson, Paris, (1990), 288-319.
238. Dieng, C., "Contribution à l'étude de *Khaya senegalensis*" (DESR.) A.JUSS. (Meliaceae). Thèse Pharmacie, Dakar, (1993), 109 p.
239. Weill, B., Batteux, F., Dhainaut, J., "Immunopathologie et réactions inflammatoires". Eds, De Boeck Université (Paris), (2003), 12-23.
240. Rousselet, M. C., Vignaud, J .M., Hofman, P., Chatelet, F. P., "Inflammation et pathologie inflammatoire" AFECAP, (2005), 1-57.
241. Cousins, M.J., and Power, I., "Acute and postoperative pain". In (P.D. Wall & R. Melzack Ed.). Textbook of Pain, 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, (1999), 447-491.
242. Charles, N.S., Peter, A .W., et Derek, W.G., "Fundamentals of Inflammation". Cambridge University Press, (2010), 2-3.
243. Bayes Ould, M., "Contribution à l'étude de l'activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de *Balanites aegyptiaca* L. (Zygophyllaceae)". Thèse pharmacie, Bamako, (1997), 67 p.
244. Schorderet, M., Dayer, J., et *al.*, "Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation ; Analgésiques, Antipyrétiques anti-inflammatoires et immuno supresseurs (in pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques) Slatkine", Paris-Génève, 1992, 932 p.
245. Haslett, C., et al., "Médecine interne, principe et pratique". Maloine, Paris, (2000), 1186 p.
246. Coyen, Y., "Abrégés de pharmacologie". Ed 4, Masson, Paris, (1981), 355p.
247. Capron, F., "Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive". Revue du praticien, Vol. 20, (1998), 2273-2276.
248. Diouf, A., "Etude des médiateurs et leurs rôles physiopathologiques". Thèse Pharmacie, Dakar, (1991), 44 p.

249. Serhan, C.N., Ward, P.A., Gilroy, D.W., "Fundamentals of inflammation". Hardback,USA, (2010),13-14.
250. Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., Rothenberg, M.E., Eosinophils: "Biological Properties and Role in Health and Disease". Clinical and Experimental Allergy, Vol. 38, (2008), 709–750.
251. Williams, C.M.M., et Galli, S.J., "The diverse potential effectors and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. The Journal of allergy and clinical immunology", Vol. 105, (2000), 847-59.
252. Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., "Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. Journal of Investigative Dermatology", Vol. 127, (2007), 514–525.
253. Aggarwal, B.B., et Shishodia, S., "Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer". Biochem Pharmacol. Vol. 71, (2006), 1397 -1421.
254. Botting, R.M., et Botting, J.H., "Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain": An overview. Clin Drug Investing. Vol. 19, (2000),1-7.
255. Steinhubl, S.R., "Platelets as Mediators of Inflammation. Hematology/Oncology" Clinics of North America, Vol. 21, (2007), 115-121.
256. Miossec, P., "Physiopathologie de l'inflammation". La revue du praticien, Vol. 53, (2003),1-7,
257. Rankin, J.A., "Biological mediators of acute inflammation". AACN Clin Issues, Vol. 15, (2004), 3 -17.
258. Meyer, R.A., Campbell, J.N., & Raja, S.N., "Peripheral neural mechanisms of nociception". Edinburgh, Chrchill-Livingstone, (1994).
259. Nathan, C., "Points of control in inflammation". Nature, (2002), 19-26,420, 846-852.
260. Das, K., Tiwari ,R.K.S., and Shrivastava, D.K., "Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trend"s. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 4, n° 2, (2010),104-111.
261. Bidaut-Russell, M., "Adverse gastrointestinal effects of nsaids: consequences and costs". Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Vol. 15, (2001), 739-753.
262. Wallace, M., Staats, P.S., "Pain medicine and management: just the facts. Mcgraw-Hill (New York)", (2004), 48 p.
263. Kessel, L., Tendal, B., Jorgensen, K.J., Erngaard, D., Flesner, P., andresen, J.L., and Hjortdal, J., "Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops". Ophthalmology, Vol. 121, n°10, (2014),1915-1924.
264. Henzen, C., "Traitement aux glucocorticoides: risques et effets secondaires". Forum médical suisse, Vol. 19, (2003), 442-446.
265. Chung, W.J., "Management of portal hypertensive gastropathy and other bleeding". Clinical and Molecular Hepatology, Vol. 20, (2014), 1-5.
266. <https://comersis.com/c-images/DZ/Alger-wilaya-municipalities.jpg>
267. Bensalem, M., Bendjelloul, D., " Technique histologique: théorie et pratique", Office des publications Universitaire(OPU), Alger, (1998), 56-57.
268. Zerrad, W., Hillali, S., Mataoui, M., El antris, B.S., Et hmeyen, A., "Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur, Laboratoire de Biochimie, d'environnement, Maroc, (2006), 1p.

269. Kouhila, M., "Etude expérimentale et théorique de cinétique de séchage convectif partiellement solaire des plantes médicinales et aromatiques de la région de Marrakech", Univ Marrakech, thèse doctorat, Marrakech, (2001), 170p.
270. Pinta, M., "Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux : Azote, phosphore, potassium, sodium, calcium, magnésium". Ji coloquio europeo y mediterraneo sobre el control de la alimentacion de plantas cultivadas, Sevilla, septembre, (1968), 20p.
271. Generalic, Eni. "Soxhlet ov ekstraktor." Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary. 29 Aug. 2017. KTF-Split. 19 Jan 2018. <<https://glossary.periodni.com>>.
272. Houghton, P. J., et Raman, A., "Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts". Chapman et Hall, Londres, 1ère éd, (1998), 29-3.
273. Velasquez, A., "Actividad antimicrobiana de extractos de *Frauseria artemisiaide*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *piper Asperifolium*". University of pharmacology, Bolivia, (2007), 30-65.
274. Lagnika, L., "Etude phytochimique et activité biologique des substances naturelles isolées de plantes Béninoises", Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, université Louis Pasteur Strasbourg, (2005), 268 p.
275. Castex, H., "Spectroscopie infrarouge et analyse élémentaire de quelques kérogènes". Campagne Joides-Ipod. OcéANOLOGICA ACTA , Vol 2 , n°1, (1979).
276. Ciulei, I., "Practical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants", Methodology for analysis of vegetable drugs. Bucharest: Ed. Ministry of chemical industry, (1982), 67-71.
277. Hegnauer, R., "Chemotaxonomie de Pflanzen", Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, Vol. 6 ,(1973), 761p.
278. Ciulei, I., "Practical Manuals On The Industrial Utilization Of Chemical And Aromatic plants". Methodology for analysis of vegetable drugs. Bucharest: Ed. Ministry of chemical industry.(1982), 67.
279. Ronchetti, F., et Russo, G., "A new alkaloid from *Rauvolfia vomitoria*". Phytochemistry, HEGNAUER, Vol. 10, (1971), 1385-1388.
280. Wagner, H., "Drogen analyse, Dünnschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen". Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, (1983), 522 p.
281. Trease, E., et Evans, W.C., "Pharmacognosy. Billiare.Tindall". London 13 Edn, (1987), 61-62.
282. Négue Diarra, M., "Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq (Asteraceae)", Université de Bamako, (2003).
283. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, Gmira N., "Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*" Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. Vol. 142, (2003), 61-78.
284. Bekro, Y.A., Bekro, J.A.M., Boua, B.B., Tra, B.F.H. ,et Ehile, E.E., "Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.)". Herend. et Zarucchi *Caesalpiniaceae*. Rev. Sci. Nat, Vol. 4, (2007), 217-225.
285. Journal officiel de la république algérienne populaire et démocratique N°35, 27, (Mai 1998), 22p.
286. O.E.C.D., "Guidance Document on Acute Oral Toxicity- Fixed Dose Procedure". Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N°240. (2001a) ,1-14.

287. O.E.C.D., "Guidance Document on Acute Oral Toxicity -Méthode par classe de toxicité aiguë". Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, N°423. (2001b), 1-14.
288. Warren, S., "Current Protocols in Immunology". John Wiley & Sons, Inc, (1997), A.3B.1–A.3B.2.
289. David, J., Satoskar, A.R., Brombacher, F., Shoemaker, C.B., Titus, R.G., et Boza, M., "Immunomodulatory properties of maxadilan, a peptide derived from sand fly saliva". Acta Parasitol Turcica, Vol. 21, (1997),174.
290. Sereno, D., et Lemesr,E J.L., "Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents". Antimicrobial Agents and Chemotherapy ,Vol. 41, (1997a), 972-976.
291. Sereno, D., et Lemesre, J.L., "Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigotes stage of Leishmania amazonensis *in vitro*". Parasitol Res, Vol. 83, (1997b), 401-403.
292. Castillo, D., et al., "Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with Himatanthus sucuuba (Apocynaceae)". J Ethnopharmacol., Vol.112, (2007), 410-414.
293. Mosmann, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". J. Immunol. Methods, Vol. 65, (1983), 55–63.
294. Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., "L'analyse quantitative et qualitative des flavonoides", Chimie analytique, (1967), 375-383.
295. NCCLS, "Standarisation de l'antibiogramme", IPA, 121-143, (1997).
296. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle national, 6ème édition, (2011).
297. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., "A procedure to measure the antioradical efficiency of polyphenols". J Sci Food Agric, Vol. 76, (1998), 270-276.
298. Molyneux, P., "The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl for estimating antioxidant activity", Songklanakarin journal science of technology, Vol. 26, (2004), 211-219.
299. Prasad, M.P. , Apoorva, P., Monica, S.T., and Yogesh, M., "ACTIVITIES IN THREE SPECIES OF CESTRUM PLANTS". International Journal of Pharma and Bio Sciences. Apr, Vol. 4, n°2, (2013), 673 – 678.
300. Torres, R., et al., "Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of Haplopappus multifolius"; Phytochemistry 67; Ed: ELSEVIER, (2006),984-987.
301. Samarth, R.M., Panwar, M., Soni, A., Kumar, M., Kumar ,A., "Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract Food Chemistry", Vol. 106, (2008), 868-873.
302. Yildirim, A., Mavi, A., et Kara, A., "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts"; Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49, (2001), 411-420.
303. Aldina, K., Ibrišimović-Mehmedinović N., and Šestan, A., "Phytochemical Profile of Honey". Chapitre 04, (2015), 101p.
304. Hubert, A.J., " Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation et nutrition et santé humaine". Thèse de doctorat. Toulouse, (2006).
305. Colot, M., "Notion de techniques pharmacologies générale Edition Masson" (1972),122-150.

306. Farnsworth Norman, R., Akerele, O., Bingel Audrey, S., Soejarto Djaja, D., Guo, Zhengang., "Medicinal plants in therapy", Bulletin of the world health organization, Vol. 63, (1985).
307. Catier, O., et Roux, D., "Botanique, pharmacognosie, phytothérapie", 3ème édition Wolters Kluwer France, (2007), 1-141p.
308. Iqbal, A., Farrukh, A., and Mohammad, O., "Modern phytomedecine", Turning medicinal plants into drugs. ED. Wiley VCH, (2006), 405 p.
309. Evert, T., Vandebroek, I., Goetghebeur, P., Sabino, S., Arrázola S., Patrick V.D., "The Relation ship Between Plant Use and Plant Diversity in the Bolivian Andes, with Special Reference to Medicinal Plant Use". Hum Ecol, Vol. 36, (2008), 861–879.
310. Houghton, P.J., Manby, J., "MEDICINAL PLANTS OF THE MAPUCHE", Journal of Ethnopharmacology, Vol. 13, (1985), 89-103.
311. Mendoza, A.C., "Plantas medicinales. La experiencia de Tinguipaya". 2da. Edición Edición © Alberto Camaqui Mendoza, (2009), 113 p.
312. Ceuterick, M., Vandebroek, I., Pieroni, A.," Resilience of Andean urban ethnobotanies: A comparison of medicinal plant use among Bolivian and Peruvian migrants in the United Kingdom and in their countries of origin". Journal of Ethnopharmacology, Vol.136, (2011) ,27–54.
313. Quiroga, R., Arrazola, S., et Torrez E., "Medicinal flora diversity and useful local in the weenhavek of Gran Chaco province", Tarija, Bolivia. Rev.Bol.Ecol. y Cons. Amb. Vol. 25, (2009), 25-39.
314. Mølgaard, P., Hollera, J.G., Betül, A., Libernaa,I., Bakkestrøm Rosenbæk L., Ploug Jebjerga, Lene Jørgensena, Jeanette Lauritzena, Alfonso Guzman, Anne Adsersena Antimicro, C., "bial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds, Henrik Toft Simonsenc",Journal of Ethnopharmacology, Vol.138, (2011) ,219– 227.
315. Martínez , G.J., "Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de la piel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba (República Argentina) Dominguezia" ,Vol. 24, n°1, (2008).
316. Toursarkissian, M., "Plantas Medicinales de la Argentina: Sus Nombres Botánicos, Vulgares, Usos y Distribución Geográfica" Hemisferio Sur. Buenos Aires, (1980).
317. Lahitte, H.B., et Hurrel, J.A., (Ed.). "Plantas medicinales rioplatenses utilizadas en medicina popular en la región del delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera platense". L.O.L.A., Buenos Aires, (1998).
318. Rubén, V.D., Rondina, A., Bandoni, L., and Jorge, D., "Argentine medicinal plants with potential antifungal activity. Dominguezia", Vol. 26, n°1, (2010).
319. Valadeau, C.B., Adrianac, P., Deharo, E.B.D., Castillo, J., Yannickb, E., Augustof, L.F., Rosariog, R., Dioniciag, G., Michelb, D. S., Castillo, D., et Genevieveb, B.D., "Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts". Journal of Ethnopharmacology, Vol.123, (2009)4, 13–422..
320. San Martin, A.J., "Medicinal Plants in Central Chile 1, Economic Botany", Vol. 37,n°2, (1983), 216-227.
321. Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J. I., Sierra, J., Retamal, R., and Rodriguez, J., "Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts". PHYTOTHERAPY RESEARCH, Vol. 6, (1992),184-188.
322. Maciaa M.J.,Garciab, E., Vidaurreb. P.J., " An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto", Bolivia. Journal of Ethnopharmacology,Vol. 97,(2005), 337–350.

323. Rivero, S.A., Margoth, A., Edwin, S., Alvaro, L., "MEDICINAL FLORA DIVERSITY AND ETHNOPHARMACOLOGICAL. POTENTIAL OF THE PLANTS FROM DRY VALLEY OF COCHABAMBA – BOLIVIA". RESUMEN Rev. Bol. Ecol. Vol. 12:, n°53 , 2002, 85-93,
324. Goleniowski, M.E., Bongiovanni, G.A., Palacio, L., Nunez, C.O., Cantero, J.J., "Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. Journal of Ethnopharmacology Vol.107, (2006), 324–341.
325. Campos-Navarro, A., Scarpa, G.F, "The cultural-bound disease "empacho" in Argentina". A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review. Journal of Ethnopharmacology, Vol, 148 ,(2013), 349–360.
326. Pharmacopée Européenne, 2° Edition, Paris. 1999.
327. Paris., R., et Moyse., M., " Précis de matière médicale ". Edit. Masson. Paris, (1965), 412 p.
328. Paris, R.R., Moyse, H., "Matière médicale", MASSON et Cie, Paris, (1976), 447p.
329. Iserin, P., "Encyclopédie de plantes médicinales : identifications préparations soins". Bordas : Larousse, (1996), 336 p.
330. Richter, G., "Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie". Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, (1993), 303 p.
331. Gratien, A., "Spectroscopie ultraviolet visible et infrarouge de molécules clés atmosphériques". Thèse de doctorat en sciences. Université Paris 12, (2008), 20.
332. Lafont, R., " Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ", (2005), <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>.
333. Boutiti A., "Etude phytochimique de l'espece Globularia alypum L., "Mémoire de magister". UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE, (2011), 22.
334. Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) : http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.
335. Beuchat, LR., "Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables". Microbes and Infection, Vol. 4, n° 4, (2002), 413-423.
336. Backhouse, N., Delporte, C., Negrete, R., Salinas, P., Pinto, A., Aravena, S., and Cassels, B.K., Antiinflammatory and antipyretic activities of Cuscuta chilensis, Cestrum parqui and Psoralea glandulosa. International Journal of Pharmacognosy, Vol. 34, n°1, (1996), 53-57.
337. Aïache, J.M., Devissaguet, J.P., Guyot-Hermann, A.M., "Galenica, biopharmacie". Tec and doc, Paris, (1978).
338. Madureira, M., Martins, A.P., Gomes, M., Paiva, J., Antonio, P.A., Da Cunha, A., Do Rosario, V., "Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands Journal of ethnopharmacology", Vol. 81, (2002), 23-29.
339. Kayser, O., Kinderlen, A.F., Croft, S.L., "Natural products as antiparasitic drugs". Parasitol Res, Vol. 90, (2003), 55-62.
340. Germonprez, N., et al., "In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from Maesa balansae and some chemical derivatives". J Med Chem, Vol. 48, (2003), 32-37.
341. Davis, A.J., Kedzierski, L., "Recent advances in antileishmanial drug development". Current Opinion in Investigational Drugs, Vol.6, n° 2, (2005), 163-169.
342. Rocha, L.G., Almeida, J. R. G. S., Macêdo, R. O., Barbosa-Filho, J. M., "A review of natural products with antileishmanial activity". Phytomedicine, Vol.12, (2005), 514-535.

343. Mishra, B.B., Kale, R.R., Singh, R.K., Tiwari, V.K., "Alkaloids: Future prospective to combat *Leishmaniasis*". *Fitoterapia*, Vol. 80, (2009), 81- 90.
344. Abdel-Sattar, E., Maesand, L., and Salama, M. M., "In Vitro Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis", *Sleeping Sickness and Chagas Disease. Phytother. Res*, 24, (2010), 1322–1328.
345. Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaib, N., and Guessous, I.N., *B*, *Soc Pathol*, Vol. 94, (2001), 29-31.
346. Tiunan, T.S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Morgado-Diaz, J. A., W., Nakamura, C.V., "Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*". *Antimicrobial Agents*, (2005).
347. Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., Kaneko, T., "Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells". *Biol. Pharm. Bull*, Vol. 28, n°2, (2005), 253—259.
348. Rajesh, M.P., and Sahil, K.P., "Cytotoxic activity of methanolic extract of *Artocarpus heterophyllus* against A549, Hela and MCF-7 cell lines". *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01, Vol. 07, (2011), 167-171.
349. Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.E., Lavoie, S., Longtin, A, Laprise, C., Legault, J., "Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius". *J. Ethnopharmacol.*, Vol.111, (2007), 22–28.
350. Duez, P., "Ethnopharmacologie, Médecines traditionnelles, thérapies du cancer en Afrique. Le cancer en Afrique. I. N. d. cancer". *Boulogne-Billancourt*, (2006).
351. Albanes, D., Hartman, T.J., "Antioxidants and cancer: evidence from human observational studies and intervention trials. Papas, A.M. (Ed.)", *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (1999), 497–544.
352. Gnoula, C., Mégalizzi, V., De Neve, N., Sauvage. S., Guissou. P., Duez, P., Dubois, J., Ingrassia, L., Lefranc, F., Kiss, R., Mijatovic, T., "Balanitins 6 and 7: Diosgenyl Saponins Isolated from *Balanites aegyptiaca* Del. Display Significant Anti-Tumor Activity In Vitro and *In Vivo*". *International Journal of Oncology*, Vol.32, (2008), 5-15.
353. Wahyuni, T.S., Tumewu, L., Permanasari, A.A., Apriani, E., Adianti, M., Rahman, A., Widyawaruyanti, A., Inge Lusida, M., Fuad, A., Hiroyuki, F., Kawahara, N., Shoji, I., Deng, L., Aoki, C., and Hotta, H., Wahyuni, et al., "Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus". *Virology Journal*, Vol.10, (2013), 259.
354. Russell, A.D., "Principles of antimicrobial activity and resistance". Chapter 3. In : Bblock, S.S. *Disinfection, sterilization and preservation*. USA : Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, (2001), 31-56.
355. Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'interrégion Paris-Nord. *Antiseptiques et désinfectants*. Paris, (2000), 7-8.
356. Leclerc, H., " *Précis de phytothérapie* ", Masson, (1975), 170 p.
357. Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.I., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., "The mode of action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*". *J. Appl. Microbiol*, Vol. 88, (2000), 170-175.
358. Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.I., "Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*". *J. Appl. Microbiol*, Vol. 91, (2001), 492-497.
359. Hogan, D., And Kolter, L., "Why are bacteria refractory to antimicrobials? Current Opinion in Microbiology", Vol. 5, (2003), 472-477.
360. Zhou, L., Li, D., Wang, J., Liu, Y., Wu, J., "Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam". *Natural Product Research*, Vol. 21, (2007), 283-291.

361. Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N., "Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L". extracts. LWT - Food Science and Technology Vol. 41, (2008), 2029-2035.
362. Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S., "Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten". Food Chemistry, Vol. 112, (2009), 874-879.
363. Pereira, P.S., França, S.C., Oliveira, P.V.A., Breves, C.M.S., Pereira, S.I.V., Sampaio, S.V., Nomizo, A., Dias, D.A., "Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark": a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. Quim. Vol.31, n°1, (2008), 20–24.
364. Rios, J. L., et Recio, M.C., " Medicinal plants and antimicrobial activity ". Journal of Ethnopharmacology, Vol.100, (2005), 80–84.
365. Sreenivasa, P.P., Sreenivasa, R.P., Karmarkar, S.M., "Antibacterial activity of species of *Sargassum*. Botanica Marina, Vol. 31, (1988), 295-298.
366. Arun, K., and Rengasamy, R., "Antibacterial activity of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*". Bit Mar , Vol.43, (2001), 417-421.
367. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., "Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salttoleranceassays and electronmicroscopy". Antimicrob. Agents Chemother., Vol.46, (2002), 1914-1920.
368. Kalemba, D., kunicka, A., "Antibacterial and antifungal properties of essential oils". Curr Med Chem, Vol. 10, (2003), 829–1813.
369. Suhr, Kl., Nielsen, P.V., "Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi". J Appl Microbiol, Vol. 94, 2003, 74–665.
370. Turner, R.B., Lindsey, D.L., Bishop, R.D., "Isolation and identification of 5,7 dimethoxyisoflavone". An inhibitor of *Aspergillus flavus* from peanuts. Mycopathologie Vol. 57, (1975), 39–40.
371. Cowan, MM., "Plants products as antimicrobial agents". Clinical Microbiology Reviews, Vol. 12, n°4, (1999), 564-582.
372. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et documentation". 3ème Ed. Lavoisier, Paris, (1999), 199-388
373. Kurkin, V.A., "Phenylpropanoids from medicinal plants : distribution, classification, structural analysis, and biological activity". Chemistry of Natural Compounds, Vol.39, n° 2, (2003).
374. Dorsaf, B.A., Ikbali C., Belhadj S.K., Boukamch, H., Ben Jannet, H., Mighri, Z., and Daami-Remadi, M., "Antibacterial and antifungal activities of *Cestrum parqui* saponins: possible interaction with membrane sterols", International Research Journal of Plant Science, Vol. 3, (2012), 1-7.
375. Wong, S.P., Leong, L.P., et Koh, J.H.W, "Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants"; Food Chemistry, Vol. 99, (2006), 775–783.
376. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., et Jiang, Y., Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae; Food chemistry, 102, (2007) , 771-776.
377. Heiguen, C.G.M., Haenon, G.R.M.M., Vekemans, J.A.J.M. et Bast, A., "Peroxy-nitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship", Environ. Toxicol. Pharmacol, Vol. 10, (2001),199-206.

378. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., et Bobilya, D.J., "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship", *Journal. Nutr. Biochem*, Vol.13, (2002) ,572-584.
379. Uri, N., "Mechanism of antioxidation"; Ed: SCIENCE PUBLISHERS, New York; (1961), 133-169.
380. Shahidi, F., et Naczk, M. "Extraction and analysis of phenolics in food", *Journal of Chromatography A* 1054; Ed: ELSEVIER, (2004), 95-111.
381. Huang, M.T., et Ferraro, T., "Phenolic compound in food and cancer prevention. Phenolic compounds in food and their effect on health", *American chemical Society, Washington*, Vol. II (1991), 8-34.
382. Bounihi,A., "Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées)". Thèse de doctorat nationale en Sciences du Médicament, (2016) ,1-199.

ANNEXE 01: FICHE DE L'ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

01-Données personnelles :

-Age : -Sexe : -Profession :

-Lieu d'habitation :

Niveau scolaire : -Pas d'école -E. primaire -E. moyenne -Lycée -Supérieur

Situation familiale : -Marié -Célibataire -Veuf -Divorcé

Enfants Oui Non

Niveau socio-économique (NSE) : Bas Moyen Elevé

02-Phytothérapie :

A- Connaissez-vous la phytothérapie Oui Non

-Si oui, comment vous la connaissez ?

-Entendu parler

- Lire et chercher des informations

- Déjà soigné par la phytothérapie

- Vend des remèdes traditionnels

B-Pour se soigner avez-vous :

-Vu un médecin -Vu un chaman -Vu un herboriste -Utilisé tout seul des remèdes

-Autres

C- Comment vous prenez les remèdes ?

-Médicament seul -Traitement traditionnel seul

-Médicaments et plantes en mêmes temps

-Médicament suivi par des plantes -Plantes puis médicament

-Autres

D-Chez qui on utilise beaucoup plus le remède traditionnel ?

-Nourrisson -Enfants -Adolescents Adultes

E-Type de la plante : Sauvage Cultivée adventice

F-Quelles parties de la plante sont utilisées ?

- Tiges - Feuilles -Fleurs -Racines -Fruits

-Ecorce -Gomme -Résine - Graines -Noyau

-Partie aérienne -Plante entière

Autres :

I-Existe-il des conditions de récolte spéciales ? -Oui - Non

Si oui ; expliquez-nous

J-Faut-il l'utiliser à l'état frais ou sec ? -Frais -Sec

Si oui, comment procède-t-on au séchage ?.....

K-Période maximale de conservation des plantes :

-6 mois -1 an -2 ans - >2ans autres

L-Le broyage est-il recommandé ? -Oui - Non

M-Mode de préparation du remède :

-Décoction -Râpure -Infusion -Macération froide -Cataplasme - A la vapeur

Autres :

N-solvant utilisé dans les préparations des remèdes :

Eau chaude Eau froide Huile Lait/Lait fermenté Vinaigre Miel

Autres :

O-Mode d'administration :

Voie orale application externe inhalation bain ou lavement

P- vous prenez les effets secondaires de l'utilisation des plantes médicinales en importance ?

Oui Non

Si oui, donnez des exemples :

Q-Résultats d'un traitement pris traditionnellement :

Inactif amélioration Guérison

03-*Cestrum parqui* (Mask elile en fleurs jaunes):

A-Connaissez-vous cette plante ? Oui Non

Si oui, comment la connaissez-vous ?

-Entendu parler -Utilisé par une personne de votre entourage -Utilisé par vous même

B-Noms locaux de la plante :

Noms latins

Nom vernaculaires

C- Période et lieu de récolte :

-Toute l'année été hiver automne printemps

D-Est-ce que cette plante est utilisée en médecine traditionnelle (pour traiter une maladie) ?

Oui Non

-Si oui : Types de maladies traitées ?

-Fièvre -Maux de tête -Plaie -Lésion cutanée -Toux /Problèmes respiratoires

-Diarrhée -Maux d'estomac -Douleur articulaire -Fracture
Inflammation

-Ulcère -Anémie -Maladie vénérienne -Trouble de menstruations
Fertilité

-Avortement -Infection bactérienne -Infection fongique -Infection parasitaire

-Infection virale -Cancer

-Autres :.....

E-Quelles parties de la plante sont utilisées ?

- Tiges - Feuilles -Fleurs -Racines -Fruits -Ecorce -Résine

- Graines -Noyau -Partie aérienne -Plante entière

Autres :.....

F- Mode de préparation du remède :

-Décoction -Râpure -Infusion -Macération froide -Cataplasme -A la vapeur

Autres :.....

I-Mode d'administration :

-Voie orale -Application externe -Inhalation -Bain ou lavement

J-Mode d'utilisation du remède

-Quantité administrée :.....

-Fréquence de l'administration :.....

-Durée du traitement :

-Durée de conservation du remède :

K-Existe-t-il des préparations avec des plantes associées - Oui -Non

-Si Oui, lesquelles ?

L- Vous connaissez des effets secondaires de l'utilisation de *C.parqui* comme remède?

-Oui - Non

-Si oui, donnez des

exemples :.....

ANNEXE 02 : NORMES CRITIQUES DES LIMITES MICROBIOLOGIQUES

Germes Recherchés	Normes UFC/g
Germes aérobies à 30°C	≤10 ⁴
Coliformes fécaux	≤10
Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	≤10
Moisissures	≤10 ³
Salmonelles	Absence

UFC : Unité formant colonie

ANNEXE 03 : TEST DE TOXICITE

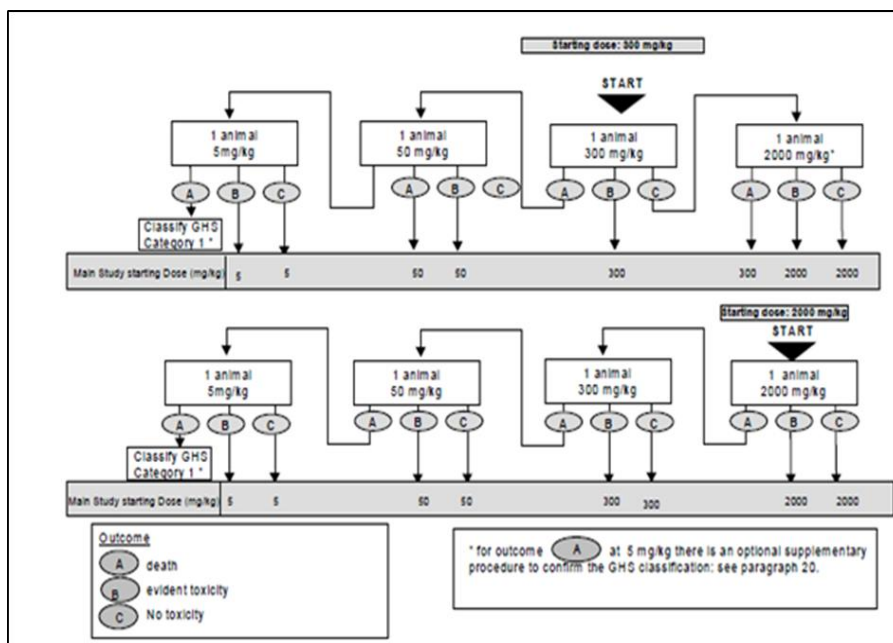


Figure. 01 : Toxicité aigüe par la méthode des doses fixes, la ligne directrice N° 420 de l'O.C.D.E. Etude préliminaire

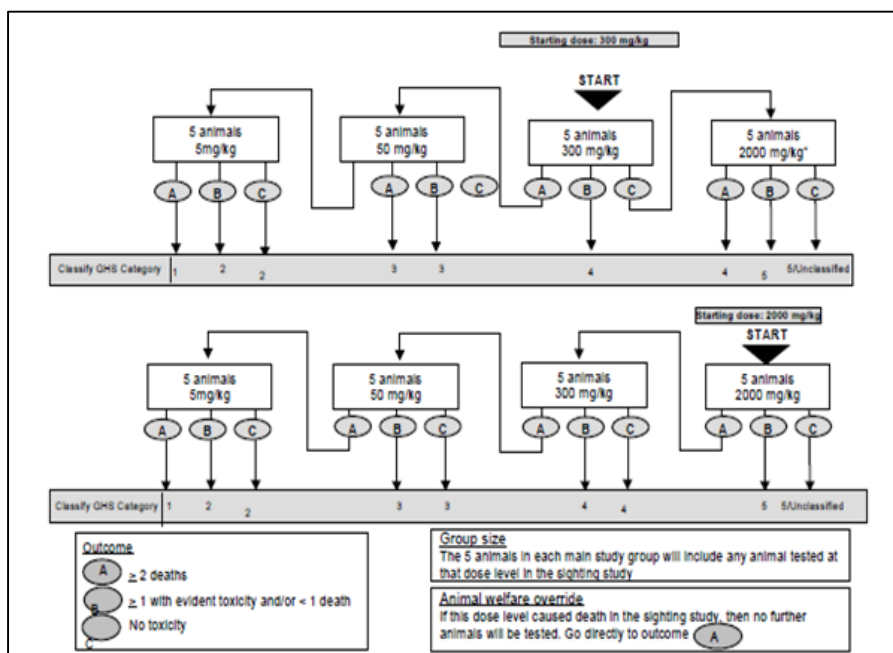


Figure 02 : Toxicité aigüe par la méthode des doses fixes, la ligne directrice N° 420 de l'O.C.D.E. Etude principale

ANNEXE 04 : RESULTATS DE L'ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

PARTIE DES RENSEIGNEMENTS GENERALES SUR LES PERSONNES ET LA PHYTOTHERAPIE

AGE

Tranches d'âges	< 30 ans	30-50 ans	50-70 ans
Nombre	25	62	43
Total	120		

SEXE

Sexe	Femme	Homme
Nombre	73	47
Total	120	

NIVEAU SCOLAIRE

NIVEAU	Pas d'école	E. primaire	E. moyenne	Lycée	Université
Nombre	02	19	21	24	54
Total	120				

LIEU D'HABITATION

LIEU	BLIDA	ALGER	AUTRES
Nombre	84	15	21
Total	120		

SITUATION FAMILIALE

Situation	Marié	Célibataire	Veuf	Divorcé
Nombre	76	32	08	04
Total	120			

NIVEAU SOCIO-ECONOMIQUE

NIVEAU	BAC	MOYEN	ELEVE
Nombre	15	101	04
Total	120		

CONNAISSEZ-VOUS LA PHYTOTHERAPIE ?

REPONSE	OUI	NON
Total	120	00

SI, OUI

QUESTIONS	Nombre
Entendu parler	120
Lire et chercher des informations	44
Déjà soigné par la phytothérapie	120
Vend des remèdes traditionnels	24

Pour se soigner avez-vous :

Pour se soigner avez-vous :	Nombre
Vu un médecin	120
Vu un chaman	08
Vu un herboriste	74
Utilisé tout seul des remèdes	98

Comment vous prenez les remèdes ?

Comment vous prenez les remèdes ?	Nombre
-Médicament seul	87
-Traitement traditionnel seul	74
-Médicaments et plantes en mêmes temps	51
-Médicament suivi par des plantes	31
-Plantes puis médicament	20

Chez qui on utilise beaucoup plus les remèdes traditionnels ?

Chez qui on utilise beaucoup plus les remèdes traditionnels ?	Nombre
Nourrisson	74
Enfant	90

Adolescent	113
Adulte	120

Type de plante :

Type de plante	Nombre
Sauvage	54
Cultivée	87
adventice	00

Parties de la plante médicinales utilisées :

Parties utilisées	Nombre	Partie	Nombre
Tiges	44	Ecorces	11
Feuilles	120	Gomme	00
Fleurs	120	Résines	08
Racines	18	noyau	12
fruits	56	Partie aérienne	81
Graines	36	Plante entière	29

Conditions de récolte spéciale ?

Oui	Non
102	18

Faut-il utiliser à l'état frais ou sec ?

frais	sec
44	93

Période maximale de conservation des plantes ?

Période	Nombre
6 mois	93
1 an	54
2 ans	08
>2 ans	03

Broyage est-il recommandé ?

Oui	Non
91	29

Mode de préparation des remèdes

Modes	Nombre
Décoction	83
Râpure	10
Infusion	120
macération	42
cataplasme	14
A la vapeur	76

Solvant utilisé dans la préparation des remèdes :

Solvant	Nombre	Solvant	Nombre
Eau chaude	120	Lait	24
Eau froide	74	Vinaigre	05
huile	52	Miel	111

Vous prenez les effets secondaires de l'utilisation des plantes médicinales en importance ?

Oui	Non
100	20

Résultat du traitement traditionnel :

Résultats	Nombre
Inactif	11
Amélioration	95
Guérison	42

PARTIES DES QUESTIONS POSEES SUR LA PLANTE ETUDIEE

Connaissez-vous cette plante ?

Oui	Non
74	46

Si oui, comment vous la connaissez ?

Si oui, comment vous la connaissez ?	Nombre
Entendu parler	74
Utilisé par une personne de votre entourage	07
Utilisé par vous même	20

Noms locaux de la plante

Nom	Nombre
Mesk elile	74
Jasmin de nuit	36

Période de récolte

Période	Nombre	Période	Nombre
Toute L'année	21	Automne	02
Eté	44	Printemps	53
Hiver	00		

Connaissez- vous une utilité thérapeutique de *C.parqui* ?

Oui	Non
23	97

Type des maladies traitées :

Maladie	Nombre	Maladie	Nombre
Fièvre	09	Fracture	00
Maux de tête	31	Inflammation	10
Plaie	02	Ulcère	00
Lésions cutanées	03	Anémie	00
Toux/p. Respiratoire	28	Maladies vénérienne	00
Diarrhée	07	Trouble menstruation	00
Maux d'estomac	00	Fertilité	06
Douleur auriculaire	00	avortement	00
Infection bactérienne	04	Infection virale	00
Infection fongique	04	cancer	00
Infection parasitaire	00		

Quelles parties de la plante sont utilisées ?

Quelles parties de la plante sont utilisées ?	Nombre
Feuilles	56
Fleurs	14
Parties aérienne	04
autres	00

Plantes associées ?

Oui	Non
00	120

Effets secondaire de l'utilisation traditionnelle de *C.parqui* ?

Effets	Nombre
Maux De Tête	23
Toxicité	12
Asthme	07

ANNEXE 05 : RESULTATS D'ANALYSES PHYTOCHIMIQUES

-TENEUR EN EAU : Poids du matériel végétal :

	Poids vide	+ 2g de MV	Après 24h	Après 48h	Après 72h
Becher 01	42.5443 g	44.5504 g	42.9358	42.9352 g	42.9333 g
Becher 02	42.7584 g	44.7305 g	42.1740	43.1739 g	43.1719 g
Becher 03	41.9295 g	44.9166 g	42.5326	42.5318 g	42.5309 g

-TAUX D'HUMIDITE : Poids du matériel végétal :

	Poids vide	+ 1g	Après 2h a 105°C
Creuset 01	29.8449g	30.8438 g	30.7434 g
Creuset 02	28.1395g	29.1380 g	29.0381 g
Creuset 03	30.5985g	31.5938 g	31.4977 g

-RENDEMENT DE L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE PAR LA METHODE DE SOXHLET :

Type d'extraction/extraits	Caractères typiques	Rendement I	Rendement II	Rendement III	Moyenne des rendements
Extrait éthero-pétrolique de feuilles EEP-F	Couleur verdâtre claire	07.64 %	04.8%	05.66%	06.03 %
Extrait éthanolique de feuilles EE-F	Couleur verdâtre foncé	13.71%	20.16%	14.99%	16.29 %

DOSAGE DES SAPONINES

Num de tube	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7	Tube 8	Tube 9	Tube 10
Hauteur de mousse	4mm	8mm	1.4cm	1.6cm	2cm	2cm	2.3cm	3.1cm	3.1cm	3.1cm

ANNEXE 06 : TABLEAU D'INTERPRETATION DES SPECTRES IR

liaison	nature	nombre d'onde (cm ⁻¹)	intensité
O-H alcool libre	valence	3 580 – 3 670	F ; fine
O-H alcool lié	valence	3 200 – 3 400	F ; large
N-H amine	valence	3 100 – 3 500	m
imine			
N-H amide	valence	3 100 – 3 500	F
C _{di} -H	valence	3 300 – 3 310	m ou f
C _{tri} -H	valence	3 000 – 3 100	m
C _{tri} -H aromatique	valence	3 030 – 3 080	m
C _{tét} -H	valence	2 800 – 3 000	F
C _{tri} -H aldéhyde	valence	2 750 – 2 900	m
O-H acide carboxylique	valence	2 500 – 3 200	F à m ; large
C≡C	valence	2 100 – 2 250	f
C≡N	valence	2 120 – 2 260	F ou m
C=O anhydride	valence	1 700 – 1 840	F ; 2 bandes
C=O chlorure d'acyle	valence	1 770 – 1 820	F
C=O ester	valence	1 700 – 1 740	F
C=O aldéhyde et cétone	valence	1 650 – 1 730	F
		abaissement de 20 à 30 cm ⁻¹	
		si conjugaison	
C=O acide	valence	1 680 – 1 710	F
C=C	valence	1 625 – 1 685	m
C=C aromatique	valence	1 450 – 1 600	variable ; 3 ou 4 bandes
N=O	valence	1 510 – 1 580	F ; 2 bandes
		1 325 – 1 365	
C=N	valence	1 600 – 1 680	F
N-H amine ou amide	déformation	1 560 – 1 640	F ou m
C _{tét} -H	déformation	1 415 – 1 470	F
C _{tét} -H (CH ₃)	déformation	1 365 – 1 385	F ; 2 bandes
C-O	valence	1 050 – 1 450	F
C-C	valence	1 000 – 1 250	F
C-F	valence	1 000 – 1 040	F
C _{tri} -H aromatique monosubstitué	déformation	730 – 770	F ; 2 bandes
		690 – 770	
C _{tri} -H aromatique o-disubstitué	déformation	735 – 770	F
m-disubstitué	déformation	750 – 810	F et m ; 2 bandes
		680 – 725	
p-disubstitué	déformation	800 – 860	F
C _{tri} -H aromatique trisubstitué	déformation	770 – 800	F et m ; 2 bandes
1,2,3		685 – 720	
1,2,4	déformation	860 – 900	F et m ; 2 bandes
		800 – 860	
1,3,5	déformation	810 – 865	F ; 2 bandes
		675 – 730	
C-Cl	valence	700 – 800	F
C-Br	valence	600 – 750	F
C-I	valence	500 – 600	F

F : fort ; m : moyen ; f : faible

ANNEXE 07 : RESULTATS DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DE LA POUDRE VEGETALE

Aérobies totaux (colonies caractéristiques):

Dilutions	37°C	
	24 h	48h
10 ⁻¹	-	-
10 ⁻²	-	-
10 ⁻³	-	-

Salmonelles (virage du couleur vers le rouge brique, et colonies caractéristiques sur l'Hektoen)

Milieux d'incubation	37°C
SFB I	-
SFB II	-
HEK I	-

Coliformes totaux (trouble dans le milieu et dégagement de gaz)

Dilutions	24h	48h	EP/KV
10 ⁻¹	-	-	-
10 ⁻²	-	-	-
10 ⁻³	-	-	-

Clostridium (nombre de spores)

Dilutions	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²
24h	02	0	0	0
48h	0	0	0	0

Moisissures :

Dilutions	37°C	
	5 jr	
10 ⁻¹	-	
10 ⁻²	-	
10 ⁻³	-	

ANNEXE 08: TEST DE TOXICITE AIGUE

Tableau 01 : Poids des souris (g) pendant la durée d'observation dans le cadre de test limite (comparaison entre le lot du même extrait et le lot témoin) :

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
EE-F						
E.D.S.J1	6	17,950 ± 0,993	17,75	(17,169; 18,731)	0,000	D
E.D.S.J7	6	19,353 ± 0,712	19,42	(18,573; 20,134)	0,000	C
E.D.S.J15	6	22,283 ± 1,338	22,35	(21,503; 23,064)	0,000	B
EE-F 2000 J1	6	17,967 ± 0,572	17,9	(17,186; 18,747)	0,000	D
EE-F 2000 J7	6	18,763 ± 0,734	18,76	(17,983; 19,544)	0,000	CD
EE-F 2000 J15	6	24,400 ± 1,055	24,25	(23,619; 25,181)	0,000	A
EA-F 10%						
E.D.S.J1	6	17,950 ± 0,993	17,75	(17,120; 18,780)	0,000	C
E.D.S.J7	6	19,353 ± 0,712	19,42	(18,523; 20,184)	0,000	B
E.D.S.J15	6	22,283 ± 1,338	22,35	(21,453; 23,114)	0,000	A
EA-F 10% J1	6	18,950 ± 1,223	18,75	(18,120; 19,780)	0,000	BC
EA-F 10% J7	6	19,995 ± 0,916	20,07	(19,165; 20,825)	0,000	B
EA-F 10% J15	6	23,375 ± 0,579	23,62	(22,545; 24,205)	0,000	A
EA-F 20%						
E.D.S.J1	6	17,950 ± 0,993	17,75	(16,948; 18,952)	0,000	C
E.D.S.J7	6	19,353 ± 0,712	19,42	(18,351; 20,356)	0,000	C
E.D.S.J15	6	22,283 ± 1,338	22,35	(21,281; 23,286)	0,000	AB
EA-F 20% J1	6	20,933 ± 2,112	20,40	(19,931; 21,936)	0,000	B
EA-F 20% J7	6	21,087 ± 0,694	20,99	(20,084; 22,089)	0,000	B
EA-F 20% J15	6	23,683 ± 0,668	23,60	(22,681; 24,686)	0,000	A

EEP-F						
H.M.J1	6	19,733 ± 1,850	19,4	(18,569; 20,898)	0,000	C
H.M.J7	6	21,952 ± 0,806	21,91	(20,787; 23,116)	0,000	B
H.M.J15	6	27,250 ± 1,727	27,4	(26,085; 28,415)	0,000	A
EEP-F 2000 J1	6	18,067 ± 0,987	18,15	(16,902; 19,231)	0,000	D
EEP-F 2000 J7	6	21,152 ± 1,272	20,88	(19,987; 22,316)	0,000	BC
EEP-F 2000 J15	6	27,033 ± 1,435	26,70	(25,869; 28,198)	0,000	A

Tableau 02 : Poids des souris (g) pendant la durée d'observation dans le cadre de test limite (Comparaison entre les différents extraits)

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
EE-F						
E.D.S.J1	6	17,950 ± 0,993	17,75	(16,994; 18,906)	0,000	I
E.D.S.J7	6	19,353 ± 0,712	19,42	(18,397; 20,310)	0,000	G H
E.D.S.J15	6	22,283 ± 1,338	22,35	(21,327; 23,240)	0,000	CD
EE-F 2000 J1	6	17,967 ± 0,572	17,9	(17,010; 18,923)	0,000	I
EE-F 2000 J7	6	18,763 ± 0,734	18,76	(17,807; 19,720)	0,000	G H I
EE-F 2000 J15	6	24,400 ± 1,055	24,25	(23,444; 25,356)	0,000	B
EA-F 10% J1	6	18,950 ± 1,223	18,75	(17,994; 19,906)	0,000	G H I
EA-F 10% J7	6	19,995 ± 0,916	20,07	(19,039; 20,951)	0,000	E F G
EA-F 10% J15	6	23,375 ± 0,579	23,62	(22,419; 24,331)	0,000	BC
EA-F 20% J1	6	20,933 ± 2,112	20,40	(19,977; 21,890)	0,000	DEF
EA-F 20% J7	6	21,087 ± 0,694	20,99	(20,130; 22,043)	0,000	DE
EA-F 20% J15	6	23,683 ± 0,668	23,60	(22,727; 24,640)	0,000	B
H.M.J1	6	19,733 ± 1,850	19,4	(18,777; 20,690)	0,000	F G
H.M.J7	6	21,952 ± 0,806	21,91	(20,995; 22,908)	0,000	D
H.M.J15	6	27,250 ± 1,727	27,4	(26,294; 28,206)	0,000	A
EEP-F 2000 J1	6	18,067 ± 0,987	18,15	(17,110; 19,023)	0,000	HI
EEP-F 2000 J7	6	21,152 ± 1,272	20,88	(20,195; 22,108)	0,000	DE
EEP-F 2000 J15	6	27,033 ± 1,435	26,70	(26,077; 27,990)	0,000	A

Tableau 03 : Poids des organes (comparaison entre les différents lots des différents produits)

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
RATE HM	6	164,77 ± 10,97	165,92	(154,29; 175,25)	0,000	B
RATE EEP	6	179,59 ± 5,82	178,99	(169,11; 190,07)	0,000	B
RATE EDS	6	91,77 ± 8,60	92,49	(81,29; 102,25)	0,000	D
RATE EE	6	208,54 ± 11,92	206,87	(198,06; 219,02)	0,000	A
RATE EA 10	6	197,79 ± 20,06	191	(187,31; 208,27)	0,000	A
RATE EA 20	6	116,13 ± 13,23	120,7	(105,65; 126,61)	0,000	C
FOIE HM	6	1500,35 ± 17,36	1499,91	(1476,15; 1524,55)	0,000	B
FOIE EEP	6	1683,2 ± 49,2	1673,6	(1659,0; 1707,4)	0,000	A
FOIE EDS	6	872,12 ± 18,45	870,565	(847,92; 896,32)	0,000	E
FOIE EE	6	1472,2 ± 26,6	1480,68	(1448,0; 1496,4)	0,000	B
FOIE EA 10	6	1273,6 ± 24,7	1272,48	(1249,4; 1297,8)	0,000	B
FOIE EA 20	6	1126,0 ± 26,1	1136,27	(1101,8; 1150,2)	0,000	D
REIN HM	6	182,33 ± 7,26	183,44	(175,28; 189,38)	0,000	B
REIN EEP	6	186,36 ± 4,88	185,875	(179,31; 193,41)	0,000	B
REIN EDS	6	121,56 ± 8,13	121,32	(114,51; 128,61)	0,000	D
REIN EE	6	216,16 ± 3,84	215,55	(209,11; 223,20)	0,000	A
REIN EA 10	6	156,30 ± 11,20	157,47	(149,25; 163,35)	0,000	C
REIN EA 20	6	155,89 ± 12,07	156,31	(148,84; 162,94)	0,000	C
CERVEAU HM	6	386,51 ± 14,33	384,895	(369,76; 403,26)	0,000	B
CERVEAU EEP	6	383,46 ± 15,14	385,165	(366,70; 400,21)	0,000	B
CERVEAU EDS	6	347,99 ± 22,83	354,01	(331,23; 364,74)	0,000	C
CERVEAU EE	6	420,47 ± 7,45	417,595	(403,72; 437,23)	0,000	A
CERVEAU EA 10	6	386,8 ± 31,9	398,425	(370,0; 403,5)	0,000	B
CERVEAU EA 20	6	396,19 ± 19,87	397,14	(379,44; 412,95)	0,000	B
CŒUR HM	6	132,86 ± 10,06	131,855	(122,34; 143,39)	0,000	C
CŒUR EEP	6	149,63 ± 9,46	152,31	(139,10; 160,15)	0,000	B

CŒUR EDS	6	117,98 ± 2,83	118,78	(107,45; 128,50)	0.000	D
CŒUR EE	6	167,87 ± 7,12	168,46	(157,35; 178,40)	0.000	A
CŒUR EA 10	6	121,35 ± 18,22	122,74	(110,82; 131,87)	0.000	CD
CŒUR EA 20	6	109,81 ± 19,35	107,53	(99,28; 120,33)	0.000	D
POUMONS HM	6	178,41 ± 14,30	175,74	(160,99; 195,82)	0.000	D
POUMONS EEP	6	233,92 ± 11,47	236,35	(216,51; 251,33)	0.000	A
POUMONS EDS	6	166,43 ± 3,81	165,625	(149,02; 183,84)	0.000	D
POUMONS EE	6	214,69 ± 15,77	212,915	(197,28; 232,10)	0.000	AB
POUMONS EA 10	6	209,2 ± 29,9	204,385	(191,8; 226,7)	0.000	BC
POUMONS EA 20	6	185,0 ± 33,5	188,285	(167,6; 202,4)	0.000	CD

ANNEXE 09 : ACTIVITE ANTILEISHMANIENNE

Tableau 01 : Effet antileishmanien par la méthode de bleu de Trypan (Avec comparaison entre les différentes concentrations du même extrait)

Produits	M de % VIT	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
100/09 +DMSO 0,5%	99,27 ± 2,00	98.71	(96,86; 101,68)	0.000	A
EE-F 12.5	64,43 ± 2,04	64.93	(62,02; 66,84)	0.000	B
EE-F 25	55,64 ± 2,87	54.87	(53,23; 58,05)	0.000	C
EE-F 50	52,380 ± 0,886	52.43	(49,971; 54,789)	0.000	C
EE-F 100	34,830 ± 0,609	35.06	(32,421; 37,239)	0.000	D
EEP-F					
100/09+DMSO 0,5%	99,27 ± 2,00	98.71	(97,75; 100,79)	0.000	A
EEP-F 12.5	59,853 ± 0,514	60.13	(58,334; 61,373)	0.000	B
EEP-F 25	53,190 ± 0,291	53.26	(51,670; 54,710)	0.000	C
EEP-F 50	42,893 ± 1,514	43.26	(41,374; 44,413)	0.000	D
EEP-F 100	21,987 ± 0,582	22.09	(20,467; 23,506)	0.000	E
EA-F					
100/09+DMSO 0,5%	99,27 ± 2,00	98.71	(97,86; 100,68)	0.000	A
EA-F 50	89,667 ± 0,540	89.75	(88,259; 91,074)	0.000	B
EA-F 100	87,883 ± 0,576	88.17	(86,476; 89,291)	0.000	B
EA-F 200	81,163 ± 0,336	81.26	(79,756; 82,571)	0.000	C
EA-F 400	71,960 ± 1,118	72.59	(70,553; 73,367)	0.000	D
SBIII					
100/09+DMSO 0,5%	99,27 ± 2,00	98.71	(91,60; 106,94)	0.000	A
SBIII 12.5	55,580 ± 1,524	54.87	(47,908; 63,252)	0.000	B
SBIII 25	40,58 ± 9,89	40.23	(32,91; 48,25)	0.000	C
SBIII 50	18,96 ± 7,77	19.47	(11,29; 26,63)	0.000	D
SBIII 100	7,79 ± 3,66	7.29	(0,12; 15,46)	0.000	E
Produits	M de % VIT	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
15/05 +DMSO 0,5%	99,90 ± 2,39	99.92	(94,36; 105,43)	0.000	A
EE-F 12.5	64,08 ± 6,16	61.53	(58,55; 69,62)	0.000	B
EE-F 25	46,63 ± 3,75	48.71	(41,10; 52,16)	0.000	C
EE-F 50	40,35 ± 1,88	40.38	(34,82; 45,89)	0.000	C
EE-F 100	28,13 ± 5,59	28.84	(22,60; 33,66)	0.000	D
EEP-F					
15/05 +DMSO 0,5%	99,90 ± 2,39	99.92	(98,19; 101,60)	0.000	A
EEP-F 12.5	58,543 ± 0,874	58.84	(56,841; 60,246)	0.000	B
EEP-F 25	44,787 ± 0,684	44.54	(43,084; 46,489)	0.000	C
EEP-F 50	35,373 ± 0,991	35.42	(33,671; 37,076)	0.000	D
EEP-F 100	24,177 ± 0,925	24.16	(22,474; 25,879)	0.000	E
EA-F					
15/05 +DMSO 0,5%	99,90 ± 2,39	99.92	(97,95; 101,85)	0.000	A
EA-F 50	92,540 ± 1,274	92.23	(90,590; 94,490)	0.000	B
EA-F 100	84,597 ± 0,561	84.47	(82,646; 86,547)	0.000	C
EA-F 200	79,083 ± 0,396	79.26	(77,133; 81,034)	0.000	D

EA-F 400	68,37 ± 1,93	68.74	(66,42; 70,32)	0.000	E
SBIII					
15/05 +DMSO 0,5%	99,90 ± 2,39	99.92	(97,40; 102,40)	0.000	A
SBIII 12.5	53,010 ± 0,995	53.31	(50,509; 55,511)	0.000	B
SBIII 25	32,89 ± 1,96	33.33	(30,39; 35,39)	0.000	C
SBIII 50	20,11 ± 2,90	19.98	(17,61; 22,61)	0.000	D
SBIII 100	0,00 ± 0,00	00	(-2,501280; 2,501280)	0.000	E

Tableau 02 : Effet antileishmanien par la méthode de MTT (Avec comparaison entre les différentes concentrations du même extrait)

Produits	M de % INH	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
100/09 +DMSO 0,5%	0,8925 ± 0,1898	0.83	(-0,0617; 1,8467)	0.000	E
EE-F 12.5	41,985 ± 0,718	42.03	(41,031; 42,939)	0.000	D
EE-F 25	46,262 ± 0,846	46.07	(45,308; 47,217)	0.000	C
EE-F 50	52,357 ± 1,109	52.18	(51,403; 53,312)	0.000	B
EE-F 100	63,985 ± 1,230	64.40	(63,031; 64,939)	0.000	A
EFP-F					
100/09+DMSO 0,5%	0,8925 ± 0,1898	0.83	(0,3669; 1,4181)	0.000	E
EFP-F 12.5	43,795 ± 0,477	43.85	(43,269; 44,321)	0.000	D
EFP-F 25	49,288 ± 0,670	49.18	(48,762; 49,813)	0.000	C
EFP-F 50	56,525 ± 0,406	56.37	(55,999; 57,051)	0.000	B
EFP-F 100	65,082 ± 0,582	65.31	(64,557; 65,608)	0.000	A
EA-F					
100/09+DMSO 0,5%	0,8925 ± 0,1898	0.83	(-0,4840; 2,2690)	0.000	E
EA-F 50	13,578 ± 0,986	13.76	(12,201; 14,954)	0.000	D
EA-F 100	24,493 ± 1,063	24.72	(23,116; 25,869)	0.000	C
EA-F 200	32,233 ± 1,423	32.8	(30,856; 33,609)	0.000	B
EA-F 400	43,44 ± 2,04	43.44	(42,06; 44,82)	0.000	A
SBIII					
100/09+DMSO 0,5%	0,8925 ± 0,1898	0.83	(-0,0333; 1,8183)	0.000	E
SBIII 12.5	41,662 ± 1,259	41.79	(40,737; 42,588)	0.000	D
SBIII 25	63,250 ± 0,767	63.38	(62,324; 64,176)	0.000	C
SBIII 50	80,850 ± 1,161	80.55	(79,924; 81,776)	0.000	B
SBIII 100	90,690 ± 0,465	90.51	(89,764; 91,616)	0.000	A
Produits	M de % INH	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
100/09 +DMSO 0,5%	0,870 ± 0,453	0.85	(0,462; 1,278)	0.000	E
EE-F 12.5	39,835 ± 0,459	40.03	(39,427; 40,243)	0.000	D
EE-F 25	47,947 ± 0,294	47.95	(47,540; 48,355)	0.000	C
EE-F 50	56,1575 ± 0,1486	56.14	(55,7496; 56,5654)	0.000	B
EE-F 100	70,037 ± 0,456	70.22	(69,630; 70,445)	0.000	A
EFP-F					
100/09+DMSO 0,5%	0,870 ± 0,453	0.85	(-0,194; 1,934)	0.000	E
EFP-F 12.5	44,522 ± 0,486	44.29	(43,459; 45,586)	0.000	D
EFP-F 25	49,182 ± 0,335	49.21	(48,119; 50,246)	0.000	C
EFP-F 50	56,585 ± 1,824	55.91	(55,521; 57,649)	0.000	B
EFP-F 100	66,795 ± 1,050	67.23	(65,731; 67,859)	0.000	A
EA-F					
100/09+DMSO 0,5%	0,870 ± 0,453	0.85	(-0,093; 1,833)	0.000	E
EA-F 50	14,295 ± 0,929	14.23	(13,332; 15,258)	0.000	D
EA-F 100	24,053 ± 0,220	24.07	(23,089; 25,016)	0.000	C
EA-F 200	31,380 ± 1,141	31.35	(30,417; 32,343)	0.000	B
EA-F 400	39,762 ± 1,290	39.81	(38,799; 40,726)	0.000	A
SBIII					
100/09+DMSO 0,5%	0,870 ± 0,453	0.85	(-0,318; 2,058)	0.000	E
SBIII 12.5	48,735 ± 0,459	48.79	(47,547; 49,923)	0.000	D
SBIII 25	63,727 ± 0,694	63.70	(62,539; 64,916)	0.000	C
SBIII 50	74,933 ± 0,755	74.80	(73,744; 76,121)	0.000	B
SBIII 100	96,68 ± 2,18	95.77	(95,49; 97,87)	0.000	A

ANNEXE 10 : TEST DE CYTOTOXICITE

Tableau 01 : Pourcentage de cytotoxicité par la méthode de bleu de trypan (Comparaison des différentes concentrations du même extrait par rapport au test de contrôle négatif)

Produits	M de % Cyt.	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,427 ± 0,379	0.405	(-0,467; 1,322)	0.000	D
EE-F 12.5	4,010 ± 0,561	3.830	(3,115; 4,905)	0.000	C
EE-F 25	6,710 ± 0,981	6.635	(5,815; 7,605)	0.000	B
EE-F 50	7,670 ± 1,105	7.865	(6,775; 8,565)	0.000	B
EE-F 100	9,250 ± 0,939	8.980	(8,355; 10,145)	0.000	A
EEP-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,427 ± 0,379	0.405	(-0,621; 1,476)	0.000	E
EEP-F 12.5	6,260 ± 0,915	6.4	(5,211; 7,309)	0.000	D
EEP-F 25	9,765 ± 0,593	9.86	(8,716; 10,814)	0.000	C
EEP-F 50	13,297 ± 1,654	13.64	(12,249; 14,346)	0.000	B
EEP-F 100	16,102 ± 0,880	16.20	(15,054; 17,151)	0.000	A
EA-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,427 ± 0,379	0.405	(-0,192; 1,047)	0.000	E
EA-F 50	1,440 ± 0,839	1.625	(0,821; 2,059)	0.000	D
EA-F 100	3,333 ± 0,640	3.480	(2,713; 3,952)	0.000	C
EA-F 200	4,793 ± 0,565	4.795	(4,173; 5,412)	0.000	B
EA-F 400	6,620 ± 0,333	6.585	(6,001; 7,239)	0.000	A

Tableau 02 : Pourcentage de cytotoxicité par la méthode de bleu de trypan (Comparaison des différentes concentrations des différents extraits par rapport au test de contrôle négatif)

Produits	M de % Cyt.	Médiane	IC 95%	P	Regroupement
Thp1+DMSO 0,5%	0,427 ± 0,379	0.405	(-0,449; 1,304)	0.000	H
EE-F 12.5	4,010 ± 0,561	3.830	(3,133; 4,887)	0.000	FG
EE-F 25	6,710 ± 0,981	6.635	(5,833; 7,587)	0.000	DE
EE-F 50	7,670 ± 1,105	7.865	(6,793; 8,547)	0.000	D
EE-F 100	9,250 ± 0,939	8.980	(8,373; 10,127)	0.000	C
EEP-F 12.5	6,260 ± 0,915	6.4	(5,383; 7,137)	0.000	E
EEP-F 25	9,765 ± 0,593	9.86	(8,888; 10,642)	0.000	C
EEP-F 50	13,297 ± 1,654	13.64	(12,421; 14,174)	0.000	B
EEP-F 100	16,102 ± 0,880	16.20	(15,226; 16,979)	0.000	A
EA-F 50	1,440 ± 0,839	0.405	(0,563; 2,317)	0.000	H
EA-F 100	3,333 ± 0,640	1.625	(2,456; 4,209)	0.000	G
EA-F 200	4,793 ± 0,565	3.480	(3,916; 5,669)	0.000	F
EA-F 400	6,620 ± 0,333	4.795	(5,743; 7,497)	0.000	DE

Tableau 03 : Pourcentage de cytotoxicité par la méthode de MTT (Avec la comparaison des différentes concentrations du même extraits par rapport au test de contrôle)

Produits	M de % Cyt.	médiane	IC 95%	P	Regroupement
EE-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,6650 ± 0,1072	0.64	(-0,1918; 1,5218)	0.000	E
EE-F 12.5	3,240 ± 0,765	3.19	(2,383; 4,097)	0.000	D
EE-F 25	4,603 ± 0,914	4.425	(3,746; 5,459)	0.000	C
EE-F 50	6,383 ± 0,887	6.115	(5,526; 7,239)	0.000	B
EE-F 100	7,877 ± 1,006	7.715	(7,021; 8,734)	0.000	A
EEP-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,6650 ± 0,1072	0.64	(0,2453; 1,0847)	0.000	E
EEP-F 12.5	6,808 ± 0,279	6.83	(6,388; 7,227)	0.000	D
EEP-F 25	9,012 ± 0,216	8.99	(8,593; 9,432)	0.000	C
EEP-F 50	12,112 ± 0,371	12	(11,693; 12,532)	0.000	B
EEP-F 100	15,967 ± 0,708	16.02	(15,548; 16,387)	0.000	A
EA-F					
Thp1+DMSO 0,5%	0,6650 ± 0,1072	0.64	(0,1202; 1,2098)	0.000	E
EA-F 50	1,475 ± 0,677	1.57	(0,930; 2,020)	0.000	D

EA-F 100	3,040 ± 0,462	3.005	(2,495; 3,585)	0.000	C
EA-F 200	5,243 ± 0,626	5.28	(4,698; 5,787)	0.000	B
EA-F 400	6,980 ± 0,482	7.075	(6,435; 7,525)	0.000	A

Tableau 04 : Pourcentage de cytotoxicité par la méthode de MTT (avec la comparaison des différentes concentrations des différents extraits par rapport au test de contrôle)

Produits	M de % Cyt.	médiane	IC 95%	P	Regroupement
Thp1+DMSO 0,5%	0,6650 ± 0,1072	0.64	(0,0198; 1,3102)	0.000	H
EE-F 12.5	3,240 ± 0,765	3.19	(2,595; 3,885)	0.000	G
EE-F 25	4,603 ± 0,914	4.425	(3,957; 5,248)	0.000	F
EE-F 50	6,383 ± 0,887	6.115	(5,737; 7,028)	0.000	E
EE-F 100	7,877 ± 1,006	7.715	(7,232; 8,523)	0.000	D
EEP-F 12.5	6,808 ± 0,279	6.83	(6,162; 7,453)	0.000	E
EEP-F 25	9,012 ± 0,216	8.99	(8,367; 9,658)	0.000	C
EEP-F 50	12,112 ± 0,371	12	(11,467; 12,758)	0.000	B
EEP-F 100	15,967 ± 0,708	16.02	(15,322; 16,613)	0.000	A
EA-F 50	1,475 ± 0,677	1.57	(0,830; 2,120)	0.000	H
EA-F 100	3,040 ± 0,462	3.005	(2,395; 3,685)	0.000	G
EA-F 200	5,243 ± 0,626	5.28	(4,597; 5,888)	0.000	F
EA-F 400	6,980 ± 0,482	7.075	(6,335; 7,625)	0.000	DE

ANNEXE 11: ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE

Tableau 01 : Effet antimicrobien des extraits sur les souches bactériennes (comparaison de l'effet du même extrait sur toutes les souches testées).

EE-F 100 mg/ml						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	13,333 ± 1,528	13	(11,583; 15,084)	0,000	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	20,00 ± 3,46	18	(18,25; 21,75)	0,000	AB
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	12,00 ± 0,00	12	(10,25; 13,75)	0,000	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-1,750350; 1,750350)	0,000	D
<i>Bacillus subtilis</i>	3	20,667 ± 0,577	21	(18,916; 22,417)	0,000	A
<i>Bacillus ceureus</i>	3	19,00 ± 2,65	20	(17,25; 20,75)	0,000	AB
<i>Micrococcus leuteus</i>	3	11,667 ± 1,528	12	(9,916; 13,417)	0,000	C
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	17,67 ± 2,08	17	(15,92; 19,42)	0,000	B
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	12,333 ± 1,528	12	(10,583; 14,084)	0,000	C
<i>Leisteria monocytogenese</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-1,750350; 1,750350)	0,000	D
<i>Escherichia coli BLSE</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-1,750350; 1,750350)	0,000	D
<i>Klebsiella pneumoniae BLSE</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-1,750350; 1,750350)	0,000	D
<i>Acenitobacter baumannii BLSE</i>	3	12,00 ± 0,00	12	(10,25; 13,75)	0,000	C
<i>S. aureus MRSA</i>	3	0,000 ± 0,00	00	(-1,750350; 1,750350)	0,000	D
EEP-F 100 mg/ml						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	15,67 ± 3,51	16	(13,08; 18,25)	0.000	CD
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	22,00 ± 0,00	22	(19,41; 24,59)	0.000	A
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	21,00 ± 6,08	24	(18,41; 23,59)	0.000	AB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	18,33 ± 2,08	19	(15,75; 20,92)	0.000	BC
<i>Bacillus subtilis</i>	3	20,33 ± 2,08	21	(17,75; 22,92)	0.000	AB
<i>Bacillus ceureus</i>	3	19,00 ± 2,65	20	(16,41; 21,59)	0.000	ABC

<i>Micrococcus leuteus</i>	3	12,333 ± 0,577	12	(9,746; 14,921)	0.000	D
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0,000 ± 0,00	00	(-2,587194; 2,587194)	0.000	E
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	13,333 ± 1,155	14	(10,746; 15,921)	0.000	D
<i>Leisteria monocytogenese</i>	3	0,000 ± 0,00	00	(-2,587194; 2,587194)	0.000	E
<i>Escherichia coli BLSE</i>	3	0,000 ± 0,00	00	(-2,587194; 2,587194)	0.000	E
<i>Klebsiella pneumoniae BLSE</i>	3	0,000 ± 0,00	00	(-2,587194; 2,587194)	0.000	E
<i>Acenitobacter baumannii BLSE</i>	3	12,333 ± 0,577	12	(9,746; 14,921)	0.000	D
<i>S. aureus MRSA</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,587194; 2,587194)	0.000	E
EA-F 10%						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Bacillus subtilis</i>	3	10,667 ± 0,577	11	(10,409; 10,925)	0.000	A
<i>Bacillus ceureus</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Micrococcus leuteus</i>	3	10,667 ± 0,577	11	(10,409; 10,925)	0.000	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Leisteria monocytogenese</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Escherichia coli BLSE</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Klebsiella pneumoniae BLSE</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>Acenitobacter baumannii BLSE</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
<i>S. aureus MRSA</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,258075; 0,258075)	0.000	B
EA-F 20%						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Bacillus subtilis</i>	3	12,667 ± 0,577	13	(12,009; 13,325)	0,000	A
<i>Bacillus ceureus</i>	3	11,00 ± 0,00	11	(10,34; 11,66)	0,000	B
<i>Micrococcus leuteus</i>	3	12,00 ± 2,00	12	(11,34;12,66)	0,000	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Leisteria monocytogenese</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C

<i>Escherichia coli</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>Acinetobacter baumannii</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C
<i>S. aureus</i> MRSA	3	0,000 ± 0,000	00	(-0,657965 ; 0,657965)	0,000	C

Tableau 02 : Effet antibactérien des antibiotiques de référence

CIP 0.1 mg/disque						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	33,67 ± 2,31	35	(32,02; 35,31)	0.000	CD
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	22,333 ± 1,528	22	(20,691; 23,976)	0.000	F
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	34,67 ± 2,52	35	(33,02; 36,31)	0.000	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	42,00 ± 1,73	41	(40,36; 43,64)	0.000	A
<i>Bacillus subtilis</i>	3	39,00 ± 1,73	38	(37,36; 40,64)	0.000	B
<i>Bacillus ceureus</i>	3	35,667 ± 1,155	35	(34,024; 37,309)	0.000	C
<i>Micrococcus leuteus</i>	3	31,667 ± 1,528	32	(30,024; 33,309)	0.000	D
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	35,333 ± 0,577	35	(33,691; 36,976)	0.000	C
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	29,00 ± 0,00	29	(27,36; 30,64)	0.000	E
<i>Leisteria monocytogenese</i>	3	19,667 ± 1,528	20	(18,024; 21,309)	0.000	G
<i>Escherichia coli</i> BLSE	3	12,00 ± 0,00	12	(10,36; 13,64)	0.000	HI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	3	10,00 ± 0,00	10	(8,36; 11,64)	0.000	I
<i>Acinetobacter baumannii</i> BLSE	3	13,333 ± 0,577	13	(11,691; 14,976)	0.000	H
<i>S. aureus</i> MRSA	3	13,667 ± 0,577	14	(12,024; 15,309)	0.000	H
CZ 0.5 mg/disque						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Escherichia coli</i>	3	30,67 ± 2,08	30	(28,63; 32,71)	0.000	DE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	44,667 ± 0,577	45	(42,626; 46,707)	0.000	B
<i>Salmonella paratyphi</i>	3	37,00 ± 1,73	38	(34,96; 39,04)	0.000	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,040262; 2,040262)	0.000	H
<i>Bacillus subtilis</i>	3	48,667 ± 0,577	47	(46,626; 50,707)	0.000	A
<i>Bacillus ceureus</i>	3	17,67 ± 2,31	19	(15,63; 19,71)	0.000	G
<i>Micrococcus leuteus</i>	3	23,33 ± 4,16	22	(21,29; 25,37)	0.000	F
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	30,000 ± 1,000	30	(27,960; 32,040)	0.000	E
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	33,00 ± 2,65	34	(30,96; 35,04)	0.000	D
<i>Listeria monocytogenese</i>	3	31,00 ± 1,73	30	(28,96; 33,04)	0.000	DE
<i>Escherichia coli</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,040262; 2,040262)	0.000	H
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,040262; 2,040262)	0.000	H
<i>Acinetobacter baumannii</i> BLSE	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,040262; 2,040262)	0.000	H
<i>S. aureus</i> MRSA	3	0,000 ± 0,000	00	(-2,040262; 2,040262)	0.000	H

Tableau 03 : Effet antifongique des extraits actifs (comparaison de l'effet du même extrait sur toutes les souches testées)

EE-F 100 mg/ml						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Candida albicans</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,726271; 0,726271)	0,000	B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,726271; 0,726271)	0,000	B
<i>Aspergillus flavus</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,726271; 0,726271)	0,000	B
<i>Aspergillus niger</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,726271; 0,726271)	0,000	B
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	20,000 ± 1,000	20	(19,274; 20,726)	0,000	A
<i>Penicillium digitatum</i>	3	21,000 ± 1,000	21	(20,274; 21,726)	0,000	A

EA-F 20%						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Candida albicans</i>	3	13,33 ± 0,577	13	(12,740; 13,926)	0,000	B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,592998; 0,592998)	0,000	D
<i>Aspergillus flavus</i>	3	0,00 ± 0,00	00	(-0,592998; 0,592998)	0,000	D
<i>Aspergillus niger</i>	3	11,00 ± 0,00	11	(10,41; 11,59)	0,000	C
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	16,000 ± 1,000	16	(15,407; 16,593)	0,000	A
<i>Penicillium digitatum</i>	3	11,00 ± 0,00	11	(10,41; 11,59)	0,000	C

Tableau 04 : Effet antifongique de témoin positif

Amphotéricine B 0.5 mg/disque						
Souches	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
<i>Candida albicans</i>	3	15,667 ± 0,577	16	(14,409; 16,925)	0,000	CD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	17,000 ± 1,000	17	(15,742; 18,258)	0,000	BC
<i>Aspergillus flavus</i>	3	15,000 ± 1,000	15	(13,742; 16,258)	0,000	D
<i>Aspergillus niger</i>	3	16,667 ± 0,577	17	(15,409; 17,925)	0,000	BCD
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	22,000 ± 1,000	22	(20,742; 23,258)	0,000	A
<i>Penicillium digitatum</i>	3	18,333 ± 1,528	18	(17,075; 19,591)	0,000	B

ANNEXE 12 : ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Tableau 01 : Pouvoir antioxydant des témoins positifs par la méthode de réduction de DPPH :

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
Vit. E						
2.5 ug/ml	03	31,23 ± 2,89	31.64	(28,48; 33,98)	0,000	F
05 ug/ml	03	35,867 ± 1,123	35.44	(33,114; 38,620)	0,000	E
10 ug/ml	03	46,610 ± 0,527	46.66	(43,857; 49,363)	0,000	D
25 ug/ml	03	64,03 ± 3,48	65.23	(61,27; 66,78)	0,000	C
50 ug/ml	03	83,00 ± 2,53	82.26	(80,25; 85,76)	0,000	B
75 ug/ml	03	88,567 ± 0,575	88.25	(85,814; 91,320)	0,000	A
Acide gallique						
2.5 ug/ml	03	39,143 ± 0,293	39.26	(38,254; 40,032)	0,000	F
05 ug/ml	03	49,017 ± 0,221	48.96	(48,128; 49,906)	0,000	E
10 ug/ml	03	53,513 ± 0,825	53.62	(52,624; 54,402)	0,000	D
25 ug/ml	03	70,760 ± 0,425	70.53	(69,871; 71,649)	0,000	C
50 ug/ml	03	85,767 ± 1,334	86.44	(84,878; 86,656)	0,000	B
75 ug/ml	03	95,683 ± 0,470	95.67	(94,794; 96,572)	0,000	A

Tableau 02 : Pouvoir antioxydant (DPPH) des extraits (avec une comparaison entre les différentes concentrations du même extrait)

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
EE-F						
300 ug/ml	03	20,507 ± 0,840	20.48	(19,462; 21,551)	0,000	F
600 ug/ml	03	28,027 ± 1,423	28.35	(26,982; 29,071)	0,000	E
1200 ug/ml	03	44,817 ± 0,996	45.32	(43,772; 45,861)	0,000	D
1800 ug/ml	03	49,970 ± 0,246	50.07	(48,925; 51,015)	0,000	C
2400 ug/ml	03	57,383 ± 0,404	57.57	(56,339; 58,428)	0,000	B
3000 ug/ml	03	63,170 ± 0,440	63.34	(62,125; 64,215)	0,000	A
EEP-F						
300 ug/ml	03	5,460 ± 0,618	5.39	(4,652; 6,268)	0,000	E
600 ug/ml	03	6,463 ± 0,250	6.45	(5,656; 7,271)	0,000	E
1200 ug/ml	03	8,130 ± 0,195	8.14	(7,322; 8,938)	0,000	D
1800 ug/ml	03	12,283 ± 1,055	12.12	(11,476; 13,091)	0,000	C
2400 ug/ml	03	18,610 ± 0,409	18.51	(17,802; 19,418)	0,000	B
3000 ug/ml	03	24,300 ± 0,843	24.22	(23,492; 25,108)	0,000	A
EA-F						
250 ug/ml	03	39,547 ± 0,858	39.96	(38,226; 40,867)	0,000	F
500 ug/ml	03	42,813 ± 0,671	42.62	(41,493; 44,134)	0,000	E
1000 ug/ml	03	51,787 ± 0,516	51.64	(50,466; 53,107)	0,000	D
5000 ug/ml	03	67,84 ± 2,04	68.23	(66,52; 69,16)	0,000	C
10000 ug/ml	03	80,023 ± 0,582	80.26	(78,703; 81,344)	0,000	B
25000 ug/ml	03	97,493 ± 0,814	97.63	(96,173; 98,814)	0,000	A

Tableau 03 : Pouvoir antioxydant des témoins positifs par la méthode de FRAP

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
Vit. E						
2.5 ug/ml	03	0,0233 ± 0,0057	0.02	(0,00764; 0,03902)	0,000	F
05 ug/ml	03	0,0733 ± 0,0152	0.07	(0,05764; 0,08902)	0,000	E
10 ug/ml	03	0,1366 ± 0,0057	0.14	(0,12098; 0,15236)	0,000	D
25 ug/ml	03	0,2300 ± 0,0100	0.23	(0,21431; 0,24569)	0,000	C
50 ug/ml	03	0,3000 ± 0,0100	0.30	(0,28431; 0,31569)	0,000	B
75 ug/ml	03	0,416 ± 0,0208	0.41	(0,4010; 0,4324)	0,000	A
Acide gallique						
2.5 ug/ml	03	0,3033 ± 0,0152	0.3	(0,25206; 0,35460)	0,000	F
05 ug/ml	03	0,4767 ± 0,0306	0.47	(0,4254; 0,5279)	0,000	E
10 ug/ml	03	0,6267 ± 0,0306	0.62	(0,5754; 0,6779)	0,000	D
25 ug/ml	03	0,8867 ± 0,0252	0.89	(0,8354; 0,9379)	0,000	C
50 ug/ml	03	1,1600 ± 0,0794	1.13	(1,1087; 1,2113)	0,000	B
75 ug/ml	03	1,3333 ± 0,0306	1.34	(1,2821; 1,3846)	0,000	A

Tableau 04 : Pouvoir antioxydant (FRAP) des extraits (avec une comparaison entre les différentes concentrations du même extrait)

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
EE-F						
300 ug/ml	03	0,0123 ± 0,0035	0.012	(-0,01183; 0,03649)	0,000	E
600 ug/ml	03	0,0273 ± 0,0064	0.03	(0,00317; 0,05149)	0,000	E
1200 ug/ml	03	0,0930 ± 0,0098	0.09	(0,06884; 0,11716)	0,000	D
1800 ug/ml	03	0,2010 ± 0,0190	0.201	(0,1768; 0,2252)	0,000	C
2400 ug/ml	03	0,3980 ± 0,0163	0.402	(0,37384; 0,42216)	0,000	B
3000 ug/ml	03	0,5467 ± 0,0379	0.530	(0,5225; 0,5708)	0,000	A
EEP-F						
300 ug/ml	03	0,0060 ± 0,0030	0.006	(-0,01540; 0,02740)	0,000	F
600 ug/ml	03	0,0440 ± 0,0036	0.045	(0,02260; 0,06540)	0,000	E
1200 ug/ml	03	0,0813 ± 0,0045	0.081	(0,05994; 0,10273)	0,000	D
1800 ug/ml	03	0,1150 ± 0,0072	0.113	(0,09360; 0,13640)	0,000	C
2400 ug/ml	03	0,2026 ± 0,0122	0.200	(0,18127; 0,22406)	0,000	B
3000 ug/ml	03	0,3200 ± 0,0386	0.312	(0,2986; 0,3414)	0,000	A
EA-F						

250 ug/ml	03	0,1956 ± 0,0087	0.198	(0,18313; 0,20820)	0,000	F
500 ug/ml	03	0,4040 ± 0,0104	0.409	(0,39146; 0,41654)	0,000	E
1000 ug/ml	03	0,5163 ± 0,0095	0.516	(0,50380; 0,52887)	0,000	D
5000 ug/ml	03	0,8530 ± 0,0095	0.852	(0,84046; 0,86554)	0,000	C
10000 ug/ml	03	1,0113 ± 0,0101	1.006	(0,99880; 1,02387)	0,000	B
25000 ug/ml	03	1,1360 ± 0,0112	1.142	(1,12346; 1,14854)	0,000	A

ANNEXE 09 : ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE

Tableau 01 : % Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris avec la comparaison entre les différentes concentrations du même extrait par rapport aux témoins

Produits testés	N. R.	Moyenne ± ET	Médiane	IC 95%	P α= 0.05	Comparaison Test de Fisher
EE-F / Témoins						
T - E.D.S.	6	0,000 ± 0,00	00	(-1,685456; 1,685456)	0,000	F
EE-F 50 mg/kg c.p.	6	35,87 ± 4,71	37,19	(34,19; 37,56)	0,000	E
EE-F 200 mg/kg c.p.	6	61,480 ± 0,661	61,59	(59,795; 63,165)	0,000	D
EE-F 400 mg/kg c.p.	6	78,250 ± 0,974	78,29	(76,565; 79,935)	0,000	C
Dic 3mg/kg c.p.	6	84,910 ± 0,768	84,7	(83,225; 86,595)	0,000	B
HHC 1mg/kg c.p.	6	91,650 ± 0,576	91.64	(89,965; 93,335)	0,000	A
EA-F/ Témoins						
T - E.D.S.	6	0,00 ± 0,00	00	(-3,440391; 3,440391)	0,000	F
EA-F 50 mg/kg c.p.	6	6,06 ± 3,17	6.64	(2,62; 9,50)	0,000	E
EA-F 200 mg/kg c.p.	6	17,50 ± 8,61	16,06	(14,06; 20,94)	0,000	D
EA-F 400 mg/kg c.p.	6	35,46 ± 4,13	35,61	(32,02; 38,90)	0,000	C
Dic 3mg/kg c.p.	6	84,910 ± 0,768	84,7	(81,470; 88,350)	0,000	B
HHC 1mg/kg c.p.	6	91,650 ± 0,576	91.64	(88,210; 95,090)	0,000	A
EEP-F/ Témoins						
Huile	6	0,000000 0,000000		(-7,258260; 7,258260)	0,000	E
EEP-F 50 mg/kg c.p.	6	23,34 ± 12,81		(16,09; 30,60)	0,000	D
EEP-F 200 mg/kg c.p.	6	50,54 ± 13,66		(43,28; 57,80)	0,000	C
EEP-F 400 mg/kg c.p.	6	63,51 ± 10,16		(56,25; 70,77)	0,000	B
Dic 3mg/kg c.p.	6	84,910 ± 0,768		(77,652; 92,168)	0,000	A
HHC 1mg/kg c.p.	6	91,650 ± 0,576		(84,392; 98,908)	0,000	A

Tableau 02 : Pourcentage de réduction de l'œdème de patte de souris avec une comparaison entre les différentes concentrations des différents produits par rapport aux témoins

Produits	N	Moyenne	Médiane	IC 95%	P	Comparaison
EE-F / Témoins						
T - E.D.S.	6	0,00 ± 0,00		(-5,443878; 5,443878)	0.000	G
EE-F 50 mg/kg c.p.	6	35,87 ± 4,71		(30,43; 41,32)	0.000	E
EE-F 200 mg/kg c.p.	6	61,480 ± 0,661		(56,036; 66,924)	0.000	C
EE-F 400 mg/kg c.p.	6	78,250 ± 0,974		(72,806; 83,694)	0.000	B
EA-F 50 mg/kg c.p.	6	6,06 ± 3,17		(0,61; 11,50)	0.000	G
EA-F 200 mg/kg c.p.	6	17,50 ± 8,61		(12,06; 22,95)	0.000	F
EA-F 400 mg/kg c.p.	6	35,46 ± 4,13		(30,02; 40,91)	0.000	E
Huile	6	0,000000 0,000000		(-5,443878; 5,443878)	0.000	G
EEP-F 50 mg/kg c.p.	6	23,34 ± 12,81		(17,90; 28,79)	0.000	F
EEP-F 200 mg/kg c.p.	6	50,54 ± 13,66		(45,10; 55,99)	0.000	D
EEP-F 400 mg/kg c.p.	6	63,51 ± 10,16		(58,07; 68,95)	0.000	C
Dic 3mg/kg c.p.	6	84,910 ± 0,768		(79,466; 90,354)	0.000	AB
HHC 1mg/kg c.p.	6	91,650 ± 0,576		(86,206; 97,094)	0.000	A