

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE HADJ LAKHDAR BATNA
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE
LA NATURE ET DE LA VIE**



THESE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT TROISIEME CYCLE

Filière : Sciences Biologiques

Option :

Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologies Moléculaires

Présentée par :

Mlle. BENHOUDA Afaf

Thème

**ETUDE DES ACTIVITES
PHARMACOBIOLOGIQUES DES EXTRAITS
d'*Umbilicus rupestris* (Salisb Dandy) ET *Hyoscyamus
albus L.***

Devant le jury

Président : Mr. LAROUUI Salah	Professeur	Université Hadj Lakhdar Batna
Rapporteur : Mr. YAHIA Mouloud	Professeur	Université Hadj Lakhdar Batna
Examineur : Mr. DJEBLI Noureddine	Professeur	Université Ibn-Badis Mostganem
Examineur: Mr. ZELLAGUI Ammar	Professeur	Université Larbi-Ben Mhidi Oum Elbouagui
Examinatrice: Mme. HAMBABA Leila	Professeur	Université Hdj Lakhdar Batna

Année universitaire : 2015-2016

Remerciements

Je remercie tout d'abord **ALLAH** tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, **Monsieur YAHIA Mouloud**, Professeur à l'Université de Batna et Directeur de notre laboratoire de recherche de m'avoir encadré, dirigé et soutenu au cours de la réalisation de cette thèse.

Je remercie vivement :

Le professeur **LAROUÏ Salah**, Professeur à l'Université de Batna, d'avoir bien voulu accepter de présider ce jury en dépit de leurs nombreuses occupations.

Monsieur **DJEBLI Noureddine**, Professeur à l'Université de Mostaganem, Monsieur **ZELLAGUI Ammar**, Professeur à l'Université de Oum-Elbouagui, et Professeur **HAMBABA Leila** de l'Université de Batna pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je présente mes remerciements au **Dr HACHANI Khadraoui**, Médecin spécialiste en anapathologie au CHU de Batna, par sa contribution par la lecture des lames.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à **Mme BENBIA Souheyla**, pour leur précieuse aide, et de m'avoir fait profiter de sa compétence.

Merci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans mon travail :

Hamada HABA, Laura DE MARTINO, Luceia SOUZA, Emilia MANCINI, Sihem BOUTAGHRINE, ASMA MEDDOUR, Messaoud HACHEMI, Abdelmoudjib GHECHAM, Souad KHEBRI.

Je remercie tendrement ma famille et mes proches amies qui m'ont toujours soutenue et encouragé même dans les périodes les plus difficiles, merci pour votre soutien inépuisable.

Dédicaces

A mes parents ; Abdelmadjid et Saliha,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

Et ma fleur de mon cœur : ma sœur Djahida

A mes sœurs : Soumia, Amel, Amina, Kaouthar et Isra

A mon seul frère: Abderrahmane.

BENHOUDA Afaf

Liste des abréviations

AAR : Activité antiradicalaire

ALAT : Alanine amino transférase

ALAT : Alanine aminotransférase

AlCl₃ : Aluminium Chloride

ALP: Phosphatase alcaline

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATPase : Adénosine triphosphatase

BBC : Blanchissement de β -carotène

Bil : Bilirubine totale

CCM : Chromatographie sur couches minces

CH₃OH : Méthanol

CHCl₃ : Chloroforme

CMI: Concentration minimale d'inhibition

COX₂: Cyclooxygénase 2.

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: Diphenyl picryl- hydrazyle

EChl : Extrait chloroformique

EEp : Extrait étheropétrolique

EMe : Extrait méthanolique.

FeCl₃ : Chlorure de fer

FNS : Formule Numérique Sanguine.

GB : Globule blancs

GR : Globules rouges

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique.

GPx: Glutathione peroxydase

GSH: Glutathione

H₂SO₄: Acide sulfurique

HAMeOH: Extrait méthanolique d'*Hyoscyamus albus*

Hb : Hemoglobine

HbA_{1C}: hemoglobine glyqué

HCT: Hematocrite

HGB : Hemoglobine

IL-1b : Interleukine -1b

IL-6: Interleukine -6

LDH : Lactate deshydrogénase

MDA: Malonyldaldéhyde

MNU : N-méthyl- N-nitroso-urée

OECD: Organisation de la coopération économique de développement

PAL : Phosphatase alcaline

PG: prostaglandine

PGE₂ : Prostaglandine E2

PGF_{2- α} : Prostaglandine F2-alpha

PLT : Plaquettes

RMN : Raisonance magnétique nucléaire

TG: Triglycerides

UGD : Ulcère gastroduodéal

URMeOH: Extrait méthanolique d'*Umbilicus rupestris*

STZ: Streptozotocine

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale

VGM: Volume globulaire moyen

CCMH: Volume corpusculaire moyenne en hémoglobine

STZ : Streptozotocine

ANOVA: Analysis of Variance

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

HPLC: High-performance liquid chromatography

AACC: American Association for Clinical Chemistry

PAs: Pyrolizidine alkaloids

PBS: Phosphate-buffered saline

SD: Standard Deviation

UA: Ulcer area

Liste des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie théorique

CHAPITRE I : Données générales sur les plantes étudiées

I.1.	La plante <i>Hyoscyamus albus</i>	1
I.1.1.	Historique de la jusquiame.....	1
I.1.2.	Présentation de la famille des solanacées	1
I.1.3.	Présentation du genre <i>Hyoscyamus</i>	1
I.1.4.	L'espèce <i>Hyoscyamus albus</i>	2
I.2.	La plante <i>Umbilicus rupestris</i>	7
I.2.1.	Présentation de la famille des Crassulacées.....	7
I.2.2.	Classification botanique des d' <i>Umbilicus rupestris</i>	7
I.2.3.	Propriétés thérapeutiques d' <i>Umbilicus rupestris</i>	7

CHAPITRE II : Métabolites secondaires

II. 1.	Polyphénols	9
II.1.1.	Composés phénoliques.....	9
II.1.1.1.	Tanins	10
II.1.1.2.	Flavonoides.....	10
II.1.1.3.	Lignanes et lignines	21
II.1.1.4.	Coumarines.....	22
II.1.1.5.	Stilbènes	22
II.2.	Terpenoides	22
II.3.	Saponines	23
II.4.	Alcaloïdes.....	24

Partie expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

I.1.	Etude phytochimique	27
I.1.1.	Matériel végétale	27

I.1.2.	Préparation des extraits.....	27
I.1.3.	Analyse des extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	29
I.1.3.1.	Analyse qualitative des extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	29
I.1.3.2.	Analyse quantitative des extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	30
I.1.4.	Etude des produits isolés des extraits méthanoliques des <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	31
I.2.	Etude des activités pharmacobiologiques <i>in vitro</i>	33
I.2.1.	Etude de l'activité cytotoxique	34
I.2.2.	Etude de l'activité antimicrobienne.....	34
I.2.3.	Etude de l'activité antioxydante	36
I.3.	Etude des activités pharmacobiologiques <i>in vivo</i>	37
I.3.1.	Test de toxicité	37
I.3.2.	Etude de l'activité analgésique.....	39
I.3.3.	Etude de l'activité antipyrétique.....	40
I.3.4.	Evaluation de l'activité antinflammatoire	41
I.3.5.	Etude de l'activité antidiabétique	45
I.3.6.	Etude de l'activité antiulcéreuse.....	47
I.4.	Etude statistique.....	48

CHAPITRE II : Résultats et Discussion

II.1.	Etude phytochimique.....	51
II.1.1.	Extraction et calcul du rendement	51
II.1.2.	Analyse des extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	51
II.1.3.	Séparation sur chromatographie sur colonne et CCM	55
II.1.4.	Analyse par HPLC préparative	58
II.1.5.	Analyse par RMN à proton	62
II.2.	Evaluation des activités <i>in vitro</i>	62
II.2.1.	Activité cytotoxique.....	62
II.2.2.	Activité antimicrobienne.....	69
II.2.3.	Tests d'activité antioxydante	72
II.3.	Activités pharmacobiologiques (<i>in vivo</i>)	78
II.3.1.	Test de toxicité.....	78
II.3.2.	Activité analgésique.....	88
II.3.3.	Activité antipyrétique	91
II.3.4.	Activité antinflammatoire	93
II.3.5.	Activité antidiabétique	100

II.3.6. Activité antiulcéreuse	109
---	------------

Conclusion

Liste des figures

Figure 1. <i>Hyoscyamus albus</i> avec ses différentes parties.....	3
Figure 2. Structures chimiques des trois alcaloïdes anticholinergiques	5
Figure 3. La plante <i>Umbilicus rupestris L.</i>	8
Figure 4. Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	9
Figure 5. Classification des tanins.....	11
Figure 6. Structure de base des flavonoïdes	12
Figure 7. Structure de : (a) flavonoïdes glycoside et (b) flavonoïde aglycone	12
Figure 8. Structure de flavones.....	13
Figure 9. Structure des flavonols.....	13
Figure 10. Structure de base des flavanones	14
Figure 11. Structure de base des flavanols	14
Figure 12. Structure de base des chalcones	15
Figure 13. Structure de base des anthocyanidines.....	15
Figure 14. L'effet scavenger des ROS par les flavonoïdes (Fl-OH).....	16
Figure 15. Différence entre la structure de quercétine et la catéchine	17
Figure 16. Positionnement des groupements OH dans la quercétine, le kaempférol et la morine...	17
Figure 17. L'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes.....	19
Figure 18. La molécule d'isoprène.....	23
Figure 19. Structure chimique de tropane	25
Figure 20. Schéma d'extraction par les solvants organiques des feuilles d' <i>H.albus</i> et les feuilles d' <i>U. rupestris</i>	28
Figure 21. La microplaque utilisée dans le cas de la microdilution	35
Figure 22. Droite d'étalonnage de l'acide gallique	53
Figure 23. Droite d'étalonnage de la quercétine	53
Figure 24. Droite d'étalonnage de la catéchine.....	54
Figure 25. CCM des phases aqueuses et butanoliques des plantes <i>H.albus</i> (a) et <i>U.rupestris</i> (b)	56
Figure 26. Chromatogramme de fractions obtenues de la phase butanolique <i>H.albus</i> après purification sur colonne de Séphadex.	56
Figure 27. Chromatogramme de fractions obtenues de la phase butanolique <i>H.albus</i> après purification sur colonne de Séphadex révélé par la solution Dragendorff	57
Figure 28. Chromatogramme de fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique d' <i>U.rupestris</i>	58
Figure 29. Chromatogramme de la fraction F10.	58
Figure 30. HPLC de la F4.	59
Figure 31. Produits obtenus après HPLC à partir de la fraction F4 de <i>H.albus</i>	59
Figure 32. HPLC de la fraction F7 de <i>H.albus</i>	60

<u>Figure 33.</u> Produits obtenus après HPLC à partir des fractions F7 de <i>H.albus</i>	60
<u>Figure 34.</u> HPLC de la F4 d' <i>U.rupestris</i>	61
<u>Figure 35.</u> Produits obtenus après HPLC à partir des fractions F4 d' <i>U.rupestris</i>	61
<u>Figure 36.</u> Effet dose dépendant de HAMEOH , URMeOH et de Mercapto sur la viabilité des lignées cellulaires MCF7, HeLa et PC-3.....	64
<u>Figure 37.</u> IC50 de HAMEOH sur les MCF7.....	65
<u>Figure 38.</u> IC50 de HAMEOH sur les HeLa.....	65
<u>Figure 39.</u> IC50 de HAMEOH sur les PC-3	65
<u>Figure 40.</u> IC50 de Mercapto sur les MCF7.	65
<u>Figure 41.</u> IC50 de Mercapto sur les HeLa.	65
<u>Figure 42.</u> IC50 de Mercapto sur les PC-3.....	66
<u>Figure 43.</u> Activité antimicrobienne des extraits EMe de <i>H. albus</i> et EMe de <i>U.rupestris</i> exprimés en diamètres de zones d'inhibition (mm).	70
<u>Figure 44.</u> Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des extraits méthanoliques d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i> respectivement exprimés en CMI contre les bactéries testés.	71
<u>Figure 45.</u> Cinétique de l'inhibition du blanchissement de B carotène par les extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>H.albus</i>	74
<u>Figure 46.</u> Cinétique de l'inhibition du blanchissement de B carotène par les extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>U.rupestris</i>	74
<u>Figure 47.</u> Activité antiradicalaire des extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>H.albus</i>	77
<u>Figure 48.</u> Activité antiradicalaire des extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>U.rupestris</i> 77	
<u>Figure 49.</u> Histologie du foie des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles de <i>H.albus</i>).....	83
<u>Figure 50.</u> Histologie des reins des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles de <i>H.albus</i>	83
<u>Figure 51.</u> Histologie du foie des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles de <i>U.rupestris</i>	87
<u>Figure 52.</u> Histologie des reins des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles de <i>U.rupestris</i>	87
<u>Figure 53.</u> Effet de HAMEOH et URMeOH sur la douleur induite par l'acide acétique chez les rats.....	89
<u>Figure 54.</u> Effet analgésique de HAMEOH et URMeOH et l'indométacine durant les deux phases : précoce et retardée.....	91
<u>Figure 55.</u> Effet anti-inflammatoire d'URMeOH et HAMEOH sur l'œdème de la patte du rat induite par la carragenane.	94
<u>Figure 56.</u> Effet d'URMeOH et HAMEOH sur l'œdème de la patte induit par l'histamine (a) et sérotonine (b).....	95
<u>Figure 57.</u> Effet d'URMeOH sur l'inflammation aiguë (a) et chronique (b) sur la patte du rat induite par la solution formaline.	96
<u>Figure 58.</u> Tolérance au glucose pour le groupe contrôle et les autres groupes.....	101
<u>Figure 59.</u> Changement du poids corporel des différents groupes durant 30 jours.	102

<u>Figure 60.</u> Effets des HAmEoH et URMeOH sur la surface d'ulcère (mm ²) et pourcentage d'inhibition	111
<u>Figure 61.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec l'eau distillée.....	112
<u>Figure 62.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec l'éthanol.	112
<u>Figure 63.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec l'oméprazole.....	112
<u>Figure 64.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec HAmEoH (100 mg/Kg)	113
<u>Figure 65.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec HAmEoH (200 mg/Kg)	113
<u>Figure 66.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec URMeOH (100 mg/Kg)	114
<u>Figure 67.</u> Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec URMeOH (200 mg/Kg)	114
<u>Figure 68.</u> Mécanisme d'action des flavonoïdes dans l'ulcère gastrique.....	115
<u>Figure 69.</u> Effet de HAmEoH et URMeOH sur le pH gastrique et le volume de jus gastrique.	116
<u>Figure 70.</u> Effet de HAmEoH et URMeOH sur l'acidité totale	116

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u> Principaux types de coumarines	22
<u>Tableau 2.</u> Rendement des divers extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	50
<u>Tableau 3.</u> Screening phytochimique des extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	51
<u>Tableau 4.</u> Résultats du dosage des polyphenols totaux et des flavonoides et les tanins condensés dans les différents extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	52
<u>Tableau 5.</u> Poids des extraits et des phases aqueuses et butanoliques de <i>H.albus</i> et <i>Umbilicus rupestris</i>	55
<u>Tableau 6.</u> Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique de <i>H.albus</i>	56
<u>Tableau 7.</u> Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique de <i>U.rupestris</i>	57
<u>Tableau 8.</u> Nature des produits obtenus après analyse par RMN à proton.	62
<u>Tableau 9.</u> Effet cytotoxique de HAMEOH et URMeOH sur les trois lignées cellulaires cancéreuses.....	63
<u>Tableau 10</u> .Activité antiradicalaire des extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i> et du controle positif.....	75
<u>Tableau 11.</u> Activité antiradicalaire des extraits d' <i>H.albus</i> et <i>U.rupestris</i>	76
<u>Tableau 12.</u> Détermination de LD50 de HAMEOH et URMeOH par la méthode arithmique de Karbar.....	79
<u>Tableau 13.</u> Effet de HAMEOH et URMeOH sur le poids corporel et le poids des organes dans la toxicité subaigüe chez les rats.	81
<u>Tableau 14.</u> Effet de HAMEOH sur les paramètres biochimiques dans la toxicité subaigüe chez les rats.....	81
<u>Tableau 15.</u> Effet de HAMEOH sur les paramètres hématologiques dans la toxicité subaigüe chez les rats	82
<u>Tableau 16</u> .Effet d'URMeOH sur le poids corporel et le poids des organes (g) sur les rats dans la toxicité suaigüe	85
<u>Tableau 17</u> .Effet de URMeOH sur les paramètres biochimiques des rats dans la toxicité subaigüe.....	85
<u>Tableau 18.</u> Effet de URMeOH sur les paramètres hématologiques des rats dans la toxicité subaigüe.....	86
<u>Tableau 19.</u> Effet des extraits HAMEOH et URMeOH sur les stimuli thermique induisant la douleur chez les rats	88
<u>Tableau 20.</u> Effet d'HAMEOH et URMeOH sur la pyrexie induite par la levure de bière	92
<u>Tableau 21.</u> Effet d'URMeOH et HAMEOH sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans le fluide péritonéale dans la péritonite induite par la Carragenane chez les rats.....	98
<u>Tableau 22.</u> Effet de HAMEOH et URMeOH sur la stabilisation de la membrane des érythrocytes	99

<u>Tableau 23.</u> Taux de glucose,hémoglobine et hémoglobine glyquée (HbA1C) et la présence du glucose et les corps cétoniques dans les urines	103
<u>Tableau 24.</u> Effet de HAmOH et URMeOH sur le taux de l'urée ,la creatinine ,cholestérol et les triglycérides chez les rats diabétiques.....	106
<u>Tableau 25.</u> Taux de LDH et PAL et le taux de glycogène hépatique après 30 jours de traitement	108

Introduction

Introduction

L'Algérie bénéficie d'une situation géographique particulière et un climat très favorable pour le développement d'une flore très diversifiée. Depuis quelques années, les plantes forment un champ de recherche dans les domaines de la phytochimie, la pharmacognosie, et de l'agriculture. Dans le domaine de la phytochimie, les plantes médicinales ont été caractérisées par leurs composés bioactifs, qui ont été séparés et soumis à l'analyse détaillée de la structure. La recherche dans la pharmacognosie des plantes médicinales a également impliquée des essais de bio-activité, la détermination des modes d'action et des sites cibles pour les composés phyto-médicaux actifs.

L'étude de la chimie des plantes est le sujet d'actualité car le règne végétal représente une source importante de molécules bioactives. Ces molécules ont des différents intérêts dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les lignanes, les terpénoïdes et les stilbènes.

La sélection des plantes médicinales est basée sur plusieurs critères, parmi les : le choix des plantes aromatiques, leur utilisation fréquente par nos populations dans la médecine traditionnelle, l'utilisation des huiles essentielles dans les industries alimentaires, l'exploitation de leurs produits dans l'industrie pharmaceutique, leur efficacité dans le traitement de plusieurs pathologies comme le diabète, les troubles de l'estomac et aussi dans les recherches scientifiques.

Pour notre part, nous avons choisi comme plantes d'étude les espèces *Hyoscyamus albus* (Solanaceae) et *Umbilicus rupestris* (Crassulaceae) sur la base de plusieurs données.

Sur le plan chimiotaxonomique, l'espèce *Hyoscyamus albus* appartient à la famille des Solanacées qui est reconnue par sa richesse en métabolites secondaires et particulièrement en alcaloïdes tropaniques et *Umbilicus rupestris* qui appartient à la famille des Crassulaceae et qui est reconnue par sa richesse en flavonoïdes.

Sur le plan des utilisations traditionnelles, la plante *H.albus* est utilisée comme un parasympatholytique et comme un sédatif nerveux tandis que *U.rupestris* est utilisée contre les irritations et les inflammations de la peau.

L'objectif de notre travail vise à déterminer les composés bioactifs des plantes étudiées et d'évaluer leurs propriétés biologiques *in vivo* et *in vitro*. Pour cela, notre étude englobe deux parties ;

- La première partie est d'ordre théorique divisée en deux chapitres ; nous aborderons dans le premier des données générales sur les plantes *Hyoscyamus albus* et *Umbiicus rupestris*, le deuxième chapitre est réservé aux métabolites secondaires, leurs classifications et leurs propriétés pharmacologiques.

-La deuxième partie est une étude expérimentale qui repose sur deux volets, le premier concerne une étude phytochimique basée principalement sur l'extraction et la détermination qualitative et quantitative des composés actifs dans les extraits méthanoliques de *H.albus* et *U.rupestris* ; la purification par chromatographie sur colonne, HPLC préparative et CCM et identification par RMN à proton des extraits méthanoliques des deux plantes.

Le second volet sera consacré à une évaluation des activités pharmacobiologiques : antioxydante, antimicrobienne, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, cytotoxique, analgésique et antidiabétique.

Partie bibliographique

CHAPITRE I

DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES

I.1. La plante *Hyoscyamus albus*

I.1.1. Historique de la jusquiame

Hyoscyamus ou la jusquiame qui appartient à la famille des Solanacées, est l'une des plantes des anciens. Initialement utilisée à la fois comme un poison et stupéfiant, elle a été largement adoptée par les sorcières et les devins comme un élément de leurs onguents d'hallucination et de vol [Lee, 2006].

Historiquement, l'utilisation d'extraits de plantes contenant des alcaloïdes comme des potions, des médicaments et des poisons peut-être retracée presque depuis le début de la civilisation [Lee, 2006].

La toxicité des jusquiames était déjà signalée par le médecin et le botaniste Dioscoride [Quetin-Leclercq, 2002]. Au Moyen-âge, les sorcières s'enduisaient la peau d'onguents à base des Jusquiames pour provoquer des hallucinations ou dans des séances de lévitation [Quetin-Leclercq, 2002].

La jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*) a également été utilisée par les empoisonneurs célèbres comme Madame Voisin en France. Finalement, dans le dix-neuvième siècle, Ladenburg a isolé le principe actif de *H.albus* par et il l'a appelé l'Hyoscine. Il s'est avéré être un alcaloïde tropane très similaire à l'atropine, ces deux alcaloïdes s'est avéré très important dans l'étude du parasymphatique, composant du système nerveux autonome [Quetin-Leclercq, 2002].

I.1.2. Présentation de la famille des solanacées

La famille des solanacées, qui appartient au deuxième groupe végétal des tubiflores qui comporte 6 familles de 2000 espèces environ, présentent quelques caractères communs : ce sont essentiellement des herbes, bien représentées dans les zones tempérées et froides, l'ovaire présente un caractère peu évolué, apparition de la zygomorphie, l'androcée est réduit souvent à quatre étamines, le feuillage est plutôt alterne. La famille des solanacées est regroupée autour du genre *solanum* [Zhi-yun et al., 1994 ; Goullé et al., 2004].

Linné nommait les plantes de cette famille les «blêmes», les «tristes» car les feuilles ont plutôt un aspect tombant avec des couleurs assez ternes [Goullé et al., 2004].

I.1.3. Présentation du genre *Hyoscyamus*

Hyoscyamus, «Les Jusquiames», genre de plantes à fleurs monopétales, qui a des rapports avec les nicotines et les molènes et qui comprend des herbes à feuilles alternes, entières ou découpées, et a fleurs un peu irrégulières, axillaires et terminales. Le caractère essentiel de ce genre et d'avoir un calice quinqueside, une corolle infundibuliforme, à limbe

oblique, obtus et à cinq lobes ; cinq étamine inclinées, une capsule operculée, et biliculaire [Mahmood et al., 2001].

Toutes les jusquiames sont toxiques. Deux sont très utilisées en pharmacie *Hyoscyamus niger* et *Hyoscyamus muticus* [Jouzier, 2000].

I.1.4. L'espèce *Hyoscyamus albus*

Le nom générique de l'espèce *Hyoscyamus albus* L. est dérivé du grec Hyos (le cochon) et Kiamos (haricot) et le nom de l'espèce du (*albus*) blanc [Lee, 2006].

Hyoscyamus albus est une plante annuelle ou bisannuelle, qui mesure de 30 à 90 cm de hauteur, à port dressé, a des feuilles plus petites que la jusquiame noire (5 à 10 cm de long), elles sont larges, ovales, collantes et de couleur vert clair. Au printemps, la floraison, donne des fleurs de 1 à 3 cm de long, bilabiées, irrégulièrement lobées, de couleur vert pâle [Mahmood et al., 2001] (Fig.1).

La jusquiame blanche a une odeur vireuse, nauséabonde et presque aussi forte que celle de la jusquiame noire, la saveur de ses feuilles est herbacée, très peu acre. L'odeur nauséabonde caractéristique du genre *Hyoscyamus* est due aux composés tetrahydropyridines qui rappellent celui de la chair en décomposition et qui probablement attirent les insectes pollinisateurs [Lee, 2006].

Les noms communs de *H.albus* sont : en arabe : sakaran, en Chaoui: Guinguith, en français : Jusquiame, en anglais : White Henbane.



Figure 1. *Hyoscyamus albus* avec ses différentes parties [Valdes et al., 1987].

I.1.5. Synonymes de l'espèce *H.albus* [Quézel et Santa, 1963]

- *Hyoscyamus canariensis* KerGawl.
- *Hyoscyamus clusii* G.Don
- *Hyoscyamus luridus* Salisb.
- *Hyoscyamus major* Mill.
- *Hyoscyamus minor* Mill.
- *Hyoscyamus saguntinus* Pau
- *Hyoscyamus varians*

I.1.6. Systématique [Treas et Evans, 1983]

Règne : Végétal

Sous règne : Eucaryotes

Embranchement : phanérogames

Sous embranchement : Angiospermae

Classe : Dicotylédones

Série : sympétales

Ordre : tubiflores

Famille : solanaceae

Genre : *Hyoscyamus*

Espèce : *Hyoscyamus albus*

I.1.7. Habitats et distribution

Le genre *Hyoscyamus* comporte une vingtaine d'espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces, vivant sur les talus, les falaises, les friches et les plages de galets, les décombres, et les murs, surtout représentées dans le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale [Jouzier, 2000 ; Goullé *et al.*, 2004].

I.1.8. Utilisation de la plante dans la médecine traditionnelle

L'emploi de la jusquiame blanche n'est pas aussi répandu que celui de la noire, ou plutôt elle est moins souvent recommandée. Car étant très fréquemment confondu avec l'autre dans le commerce, elle est à cause de cela également employée. Ce qui est sans beaucoup d'inconvénients, parce que ses propriétés diffèrent peu. Toutefois, il serait préférable de ne se servir que de la noire, parce que c'est l'espèce que la majorité des expériences ont été faites pour déterminer les doses thérapeutiques [Jouzier, 2000].

À dose thérapeutique, la jusquiame est employée comme parasympatholytique et sédatif nerveux [Jouzier, 2000]. Les feuilles sont utilisées comme anodin, narcotique, sédative dans les affections nerveuses. Il est souvent utilisé comme un substitut de *H. muticus* [Daunay *et al.*, 2007].

Les jusquiames noires (*Hyoscyamus niger*) et jaunes (*Hyoscyamus muticus*) ont été considérées comme des espèces très dangereuses alors que la jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*) a été préférée à des fins médicinales, en fonction de ses effets narcotiques, anti-inflammatoires et désinfectantes dues à la présence d'hyoscyamine et de scopolamine [Daunay *et al.*, 2007].

Le genre *Hyoscyamus*, est surtout l'espèce niger est bien documentée dans le système traditionnel de la médecine chinoise pour son utilisation dans les crampes d'estomac, la toux lourde, les névralgies et la psychose [Kirtikar *et Basu*, 1984].

Dans la médecine tibétaine, les graines sont utilisées comme vermifuge, fébrifuge et anti-tumorale. Ils sont également avérés utiles dans le traitement de l'estomac ou les douleurs intestinales, mal de dents, inflammation de la région pulmonaire et les tumeurs [Sajeli *et al.*, 2006].

I.1.9. Etudes phytochimiques antérieures de principes actifs isolés de *Hyoscyamus*

Selon El-Shazly *et al.*, (1997), le contenu en alcaloïdes de quatre espèces étudiées « *Hyoscyamus albus*, *H. bovenus*, *H. muticus* et *H. desertorum* » varie entre 0.22% et 1.9% du poids sec avec des valeurs plus élevées dans les fleurs et les fruits. Les deux alcaloïdes les

plus abondants sont l'hyoscyamine et la scopolamine qui sont des alcaloïdes de type tropane les plus actifs connus dans la nature.

Selon les même auteurs, une trentaine d'alcaloïdes a été détectée dans la partie aérienne et sous terrain de l'espèce *Hyoscyamus albus* Egyptienne dont la 1,4-butanediamine, apoatropine et phénylacetylscopine ont été reporté pour la première fois.

La composition d'alcaloïdes dans les racines de ces espèces est plus complexe que celle dans la partie aérienne, cela peut être expliqué par le fait que les alcaloïdes de tropane sont synthétisés au niveau des racines [El-Shazly *et al.*, 1997]

L'espèce *Hyoscyamus niger*, qui est très souvent confondu avec *Hyoscyamus albus*, et aussi une source très importante en alcaloïdes de tropane anticholinergique, outre elle contient les alcaloïdes non-tropane tel que la calystegine qui a une activité inhibitrice des glycosidases [Sajeli *et al.*, 2006](Fig.2), des teneurs importantes en coumarines, flavonoïdes, stérols, tanins terpènes ont été également signalées par Khan et Gilani , (2008) dans les extraits bruts de la même espèce.

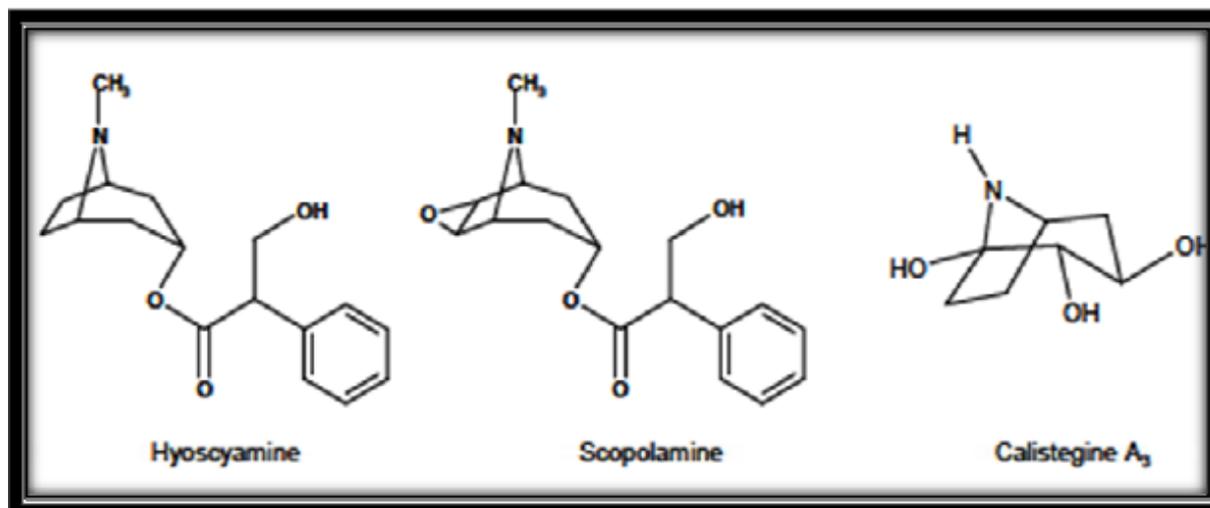


Figure 2. Structures chimiques des trois alcaloïdes anticholinergiques [Palazon *et al.*, 2008].

Selon [Sajeli *et al.*, 2006 ; Begum *et al.*, 2009], la présence de certains constituants non-alcaloïdes comme withanolides , dérivés de la tyramine , lignanamides et les lignanes a été également signalée.

D'après Harrison et Bartels (2006), les tanins et les polyphénols sont parmi les composés très actifs chez les plantes du genre *Hyoscyamus* et la famille des solanacées en général.

I.1.10. Données pharmacologiques et toxicologiques d'*Hyoscyamus albus*

Le genre *Hyoscyamus* fait partie des solanacées officinales, on les appelle aussi souvent les solanacées mydriatiques. Ce groupe est caractérisé par la présence d'alcaloïdes ayant tous le même noyau chimique dérivé du tropane, et des propriétés parasympholytiques provoquant en particulier une mydriase d'où leur nom, leur toxicité est connue depuis longtemps. Les drogues des plantes du genre *Hyoscyamus*, *Belladone* et *Datura* sont destinées à la préparation de forme galénique. Pour la production et l'extraction d'atropine et de scopolamine [Cartier et Roux, 2007].

I.1.11. Propriétés thérapeutiques et emplois des plantes à atropine et hyoscyamine

L'hyoscyamine est plus active que l'atropine, mais ces deux alcaloïdes possèdent les mêmes propriétés pharmacologiques.

Sur le système nerveux central, ils provoquent, à forte dose, une excitation, pouvant se traduire par un véritable délire atropinique. Cette action est peu marquée à dose usuelle, mais certains individus sont particulièrement sensibles aux effets centraux de l'atropine, en particulier les jeunes enfants et les personnes âgées.

Sur le système nerveux autonome, ils ont aux doses thérapeutiques une action parasympholytique, ce sont des antagonistes de l'acétylcholine ou anticholinergiques.

L'atropine inhibe les récepteurs muscariniques localisés dans les organes périphériques innervés par les fibres post-ganglionnaires du parasymphatique ce qui provoque: une mydriase, c'est-à-dire la dilatation de la pupille, avec paralysie de l'accommodation et une augmentation de la pression intraoculaire, une broncho dilatation ; une vasoconstriction ; une accélération de rythme cardiaque ; un ralentissement du péristalisme ; un tarissement de toutes les sécrétions (salivaires, gastriques, sudorales, lacrymal, bronchiques) ; une augmentation de la pression intra-vésicale ; une action antispasmodique .

Les plantes à scopolamine et à dose thérapeutique peuvent agir comme un sédatif du système nerveux central et antiparkinsonien, la scopolamine est aussi une substance parasympholytique. Son utilisation peut entraîner des effets comparables à ceux de l'atropine mais avec un risque de somnolence.

Les diverses phases de l'intoxication par la jusquiame sont les mêmes que celles que la belladone, avec cette différence qu'il y a une salivation abondante au lieu d'une sécheresse de la bouche [Cartier et Roux, 2007].

I.2.La plante *Umbilicus rupestris***I.2.1.Présentation de la famille Crassulacée**

La famille des *Crassulaceae* comprend 33 genres et environ 1500 espèces, de répartition géographique mondiale, à l'exception de l'Australie et des îles du Pacifique.

Comme le nom l'indique (*Crassus* = épais) ce sont des plantes plus ou moins succulentes, vivaces ou annuelles, à feuilles alternes, opposées ou verticillées [Allorge, 1996].

I.2.2.Classification botanique d'*U.rupestris*

Selon Quezel (1963), la classification botanique de cette espèce est la suivante

Règne Plantae

Sous-règne Tracheobionta

Division Magnoliophyta

Classe Magnoliopsida

Ordre Rosales

Famille Crassulaceae

Genre *Umbilicus*

Espèce *Umbilicus rupestris*

I.2.3.Propriétés thérapeutiques d'*U.rupestris*

Umbilicus rupestris (Salisb.) Dandy, est une plante vivace appartient à la famille des *Crassulacées*.

Elle se présente au niveau des roches, falaises, des vieux murs, sur les côtes et en montagnes, en Afrique ; seulement au Nord (Fig.3)[González-Tejero *et al.*, 2008]. Les feuilles de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle contre les inflammations de la peau [Pieroni *et al.*, 2004], blessures [González *et al.*, 2010], comme cataplasme, contre les brûlures, antiseptique, parasiticide, cicatrisante [Bonet et Valle`s., 2007]. L'infusé (feuille) de cette plante est utilisé comme un antiseptique ophthalmique [Bonet *et al.*, 1999].

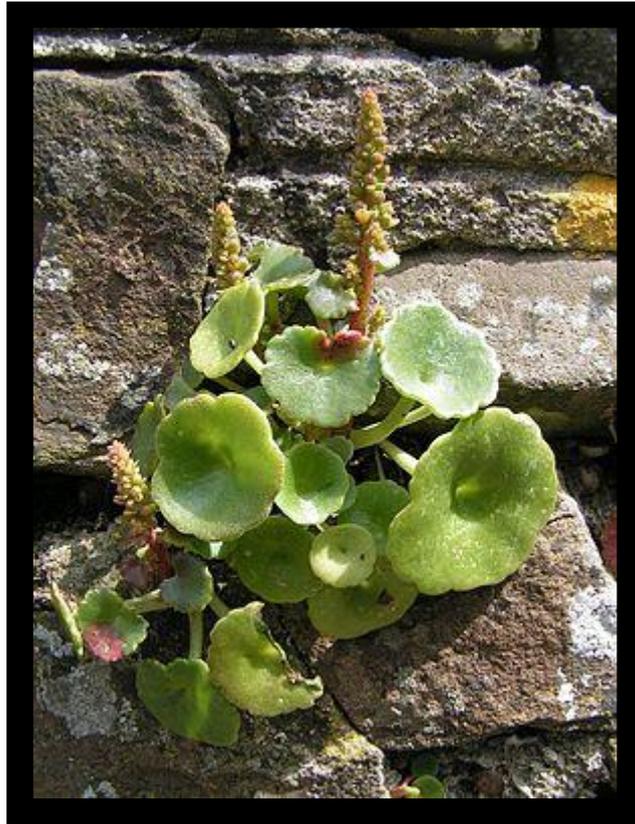


Figure 3. La plante *Umbilicus rupestris* L. [Smith and Figueiredo, 2011].

CHAPITRE II
MÉTABOLITES
SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont des substances chimiques produites par les plantes; ont des fonctions dans la croissance, la photosynthèse, la reproduction et d'autres processus primaires ne sont pas encore connus.

II.1. Composés phénoliques

Haslam et al., (1996) ont proposé la première définition complète du terme "polyphénol", en l'attribuant exclusivement à des composés phénoliques solubles dans l'eau ayant des masses moléculaires de 500 à 3000-4000 Da et possédant 12 à 16 groupes hydroxyles phénoliques et 5 à 7 cycles aromatiques par 1000 Da.

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués, possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures différentes connues [**Bahorun, 1997**], allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins [**Akowuah et al., 2004**].

II.1.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols ont été classés par leur source d'origine, les fonctions biologiques et la structure chimique (Fig.4) [**Boros et al., 2009**].

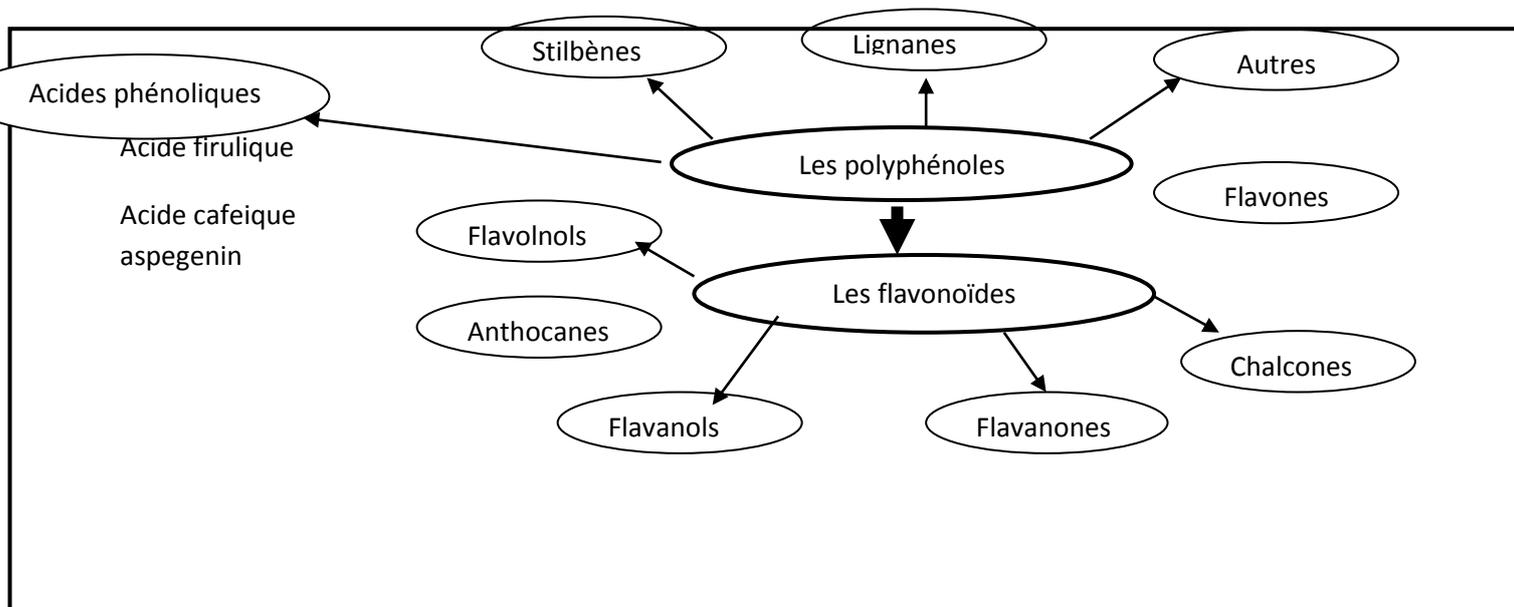


Figure 4. Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe [**Boros et al., 2010**].

II.1.1.1. Tanins

Les tanins sont un groupe hétérogène de composés phénoliques de haut poids moléculaire et ont la capacité de former des complexes réversibles et irréversibles avec des protéines (principalement), des polysaccharides (cellulose, hémicellulose, pectine, etc.), des alcaloïdes, des acides nucléiques et des minéraux [**Schofield et al., 2001**].

II.1.1.1.1. Classification des tanins

En général, les tanins sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule [**Khababae and Ree, 2001**].

A. Tanins hydrolysables

Ce sont des hétéropolymères possédant un noyau central constitué d'un polyol. Il s'agit souvent d'un D-glucose sur lequel les groupements hydroxyles sont, en partie ou en totalité, estérifiés avec l'acide gallique (cas des gallotanins) ou un dimère de l'acide gallique qui est l'acide hexahydroxydiphénique (cas des ellagitanins).

B. Tanins condensés

Les tanins condensés sont chimiquement définis comme étant des oligomères ou des polymères d'unités flavonoïdes. Les monomères précurseurs de ces molécules sont les flavan-3-ols (catéchine) et/ou les flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines), liés entre eux par des liaisons carbone-carbone très résistantes à l'hydrolyse. Les tanins condensés sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (Fig.5) [**Khababae and Ree, 2001**].

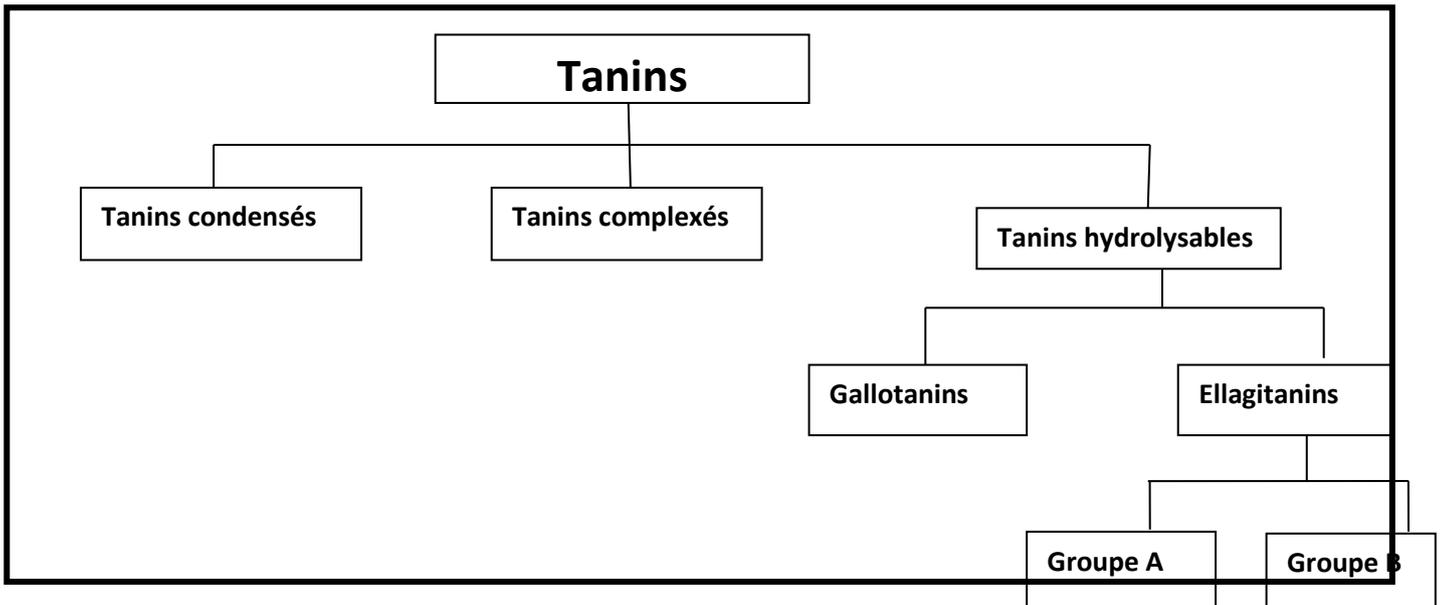


Figure 5.Classification des tanins [Khababae and Ree, 2001].

II.1.1.1.2.Fonctions des tanins

Les tanins sont un groupe de composés secondaires de plantes qui sont connus et employés par l'homme pendant des siècles [Harborne, 1999; Schofield *et al.*, 2001].

Ils possèdent des activités anti diurétiques, anti diarrhéiques, antiinflammatoires, antioxydantes et hémostatiques [Dolara *et al.*, 2005], antibactériennes, antivirales , anti-inflammatoires et antimutagènes et sont utilisés encore contre les blessures et les brûlures. Encore, ils ont un effet vasoconstricteur et hémostatique et sont utilisés dans le traitement des hémorroïdes [Bruneton, 1999].

II.1.1.2.Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe des polyphénols et sont caractérisés par une structure de diphenyl propane. Ce sont des métabolites secondaires distribués dans toutes les parties des plantes [Garcia-Closas *et al.*, 1999].

II.1.1.2.1.Structure des flavonoïdes

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone (C6-C3-C6) constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Fig.6) [Pawlak *et al.*, 2010].

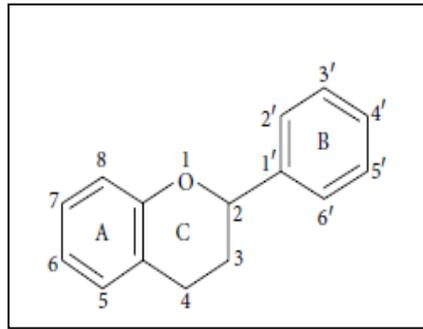


Figure 6. Structure de base des flavonoïdes [Pawlak *et al.*, 2010].

Dans les flavonoïdes, l'hydroxylation peut s'effectuer dans les positions 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6'. Ces groupes hydroxyles peuvent être méthylés, acétylés, ou sulfatés [Bruneton, 1999].

Les flavonoïdes existent soit à l'état libre c'est-à-dire ne sont pas liés au sucre comme le cas de génine et dans ce cas sont appelés des aglycones ou bien ils peuvent être glycosylés surtout dans la position 3 et 7. Les sucres qui peuvent être liés sont le glucose, l'arabinose et le rhamnose (Fig.7) [Dacosta, 2003].

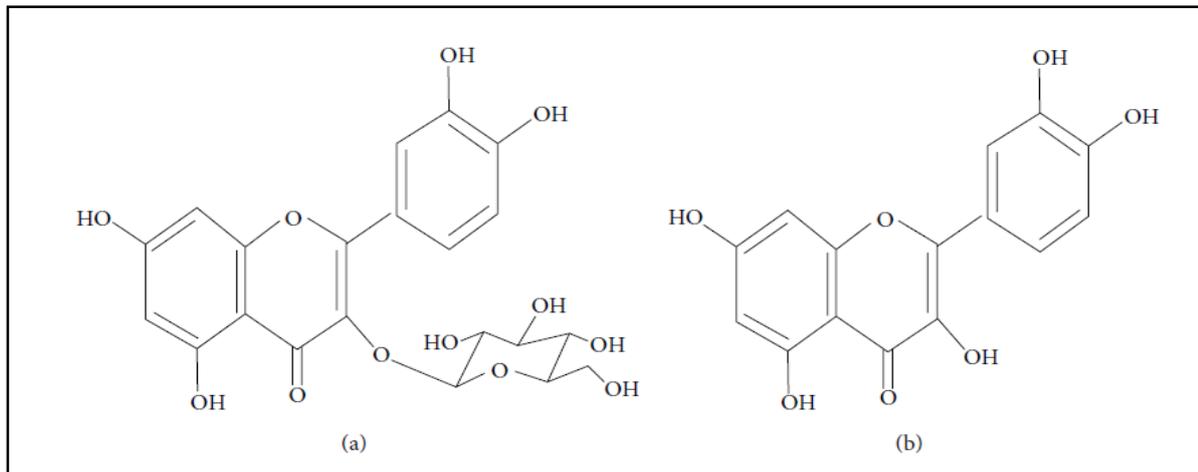


Figure 7. Structure de (a) flavonoïde glycoside et (b) flavonoïde aglycone [Kumar et Pandey, 2013].

II.1.1.2.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent la structure de flavane qui a 3 cycles dont un hétérocycle a une configuration variée permet une classification en sous groupes [Harborne et Williams, 2000].

A. Les flavones

Le noyau flavone dérivé du noyau flavane de base, il est constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné qui est le cycle C ou la position 4 est relié d'un oxygène qui est lié à un carbone, parmi ces flavones : la lutéoline, l'apigénine et la chrysrine (Fig.8) [Bruneton, 1999].

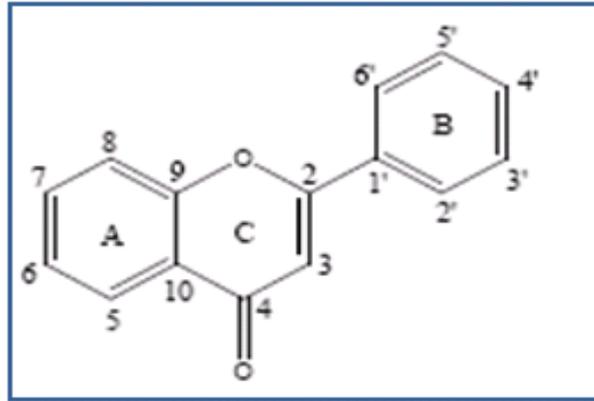


Figure 8. Structure de flavones [Bruneton, 1999].

B. Les flavonols

Les flavonols sont les plus répandues dans les plantes que les flavones, ils se caractérisent par la présence d'un groupement OH dans la position C-3, les flavonols les plus connus : la quercétine, le kaempférol et la myricétine (Fig.9).

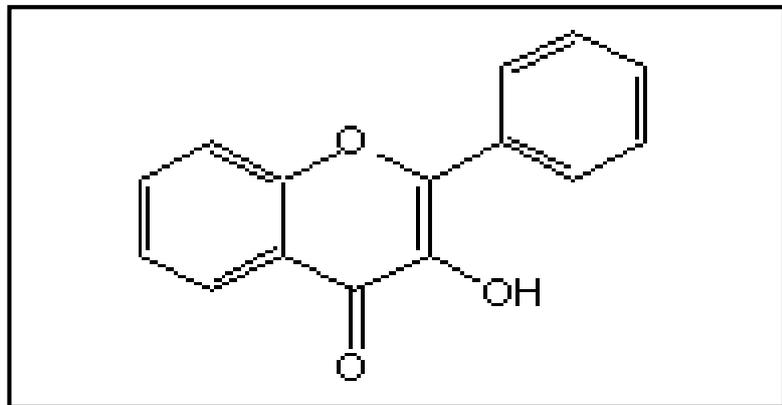


Figure 9. Structure de base des flavonols [Bruneton, 1999].

C. Les flavanones

Les flavanones peuvent être soit sous forme libre ou glycosylé, les carbones en position 5 et 7 peuvent être hydroxylés ou méthoxylés encore il n'y a pas de double liaison entre 2 et 3. Le cycle B peut subir des substitutions dans les positions 3', 4', 5' et 6', parmi les flavanones les plus connus : La naringénine et l'hespérétine (Fig.10) [Havsteen, 2002].

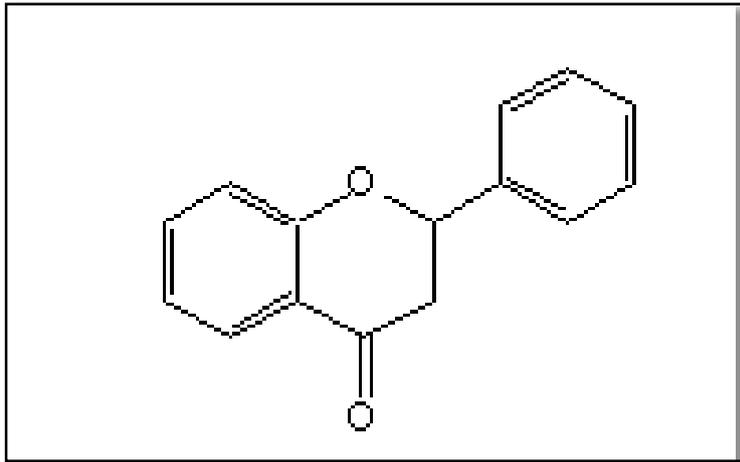


Figure 10. Structure de base des flavanones [Bruneton, 1999].

D. Les flavanols

Ils se caractérisent par l'absence de l'atome d'oxygène dans la position 4 et c'est la différence entre les flavanones et les flavanols. Les flavanols les plus connus : le catéchine et l'épicatéchine (Fig.11) [Cowan, 1999].

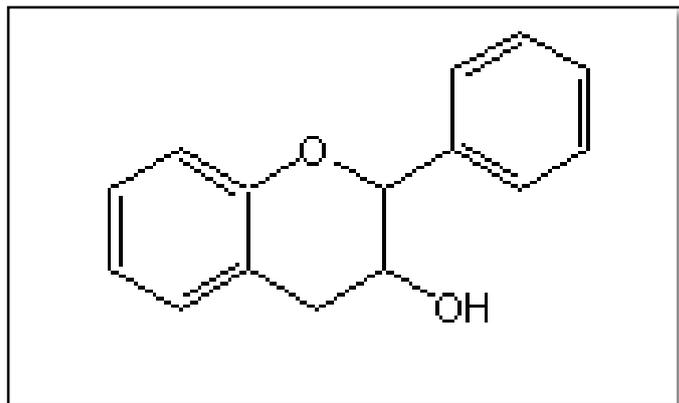


Figure 11. Structure de base des flavanols [Bruneton, 1999].

E. Les chalcones

C'est une catégorie spéciale des flavonoïdes qui est reconnue par l'absence du cycle central qui est le cycle C, les deux cycles A et B sont reliés par une chaîne tricarbonée cétonique α, β insaturée. La numérotation des cycles A et B est inversée par rapport aux autres flavonoïdes (Fig. 12). Les plus connus sont : le phlorétine et la butéine [Havsteen, 2002].

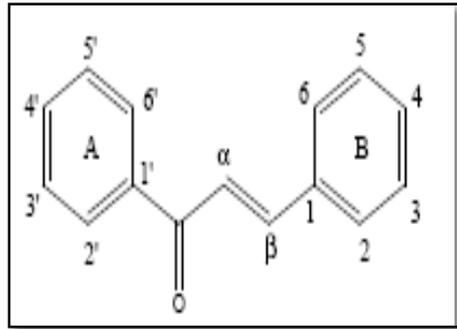


Figure 12. Structure de base des chalcones [Bruneton, 1999].

F. Les anthocyanidines

Ils possèdent une double liaison entre la position 3 et 4 et ils sont dépourvus d'un groupement OH dans la position 4, les anthocyanidines les plus répandues sont : la cyanidine (Fig .13) [Bruneton, 1999].

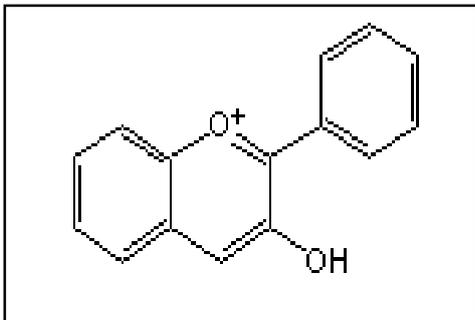


Figure 13. Structure de base des anthocyanidines [Bruneton, 1999].

II.2.1.2.3. Activités des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités telles que : l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, oestrogénique, antiallergique, antioxydant, cytotoxique et anti tumorale. Ils jouent un rôle important dans la protection des systèmes biologiques contre les effets néfastes des processus oxydants sur des macromolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques [Atmani *et al.*, 2009 ; Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011].

Il a été constaté que les flavonoïdes réduisent le taux des lipides et de glucose chez les êtres humains et encore améliorent l'immunité humaine [Atoui *et al.*, 2005].

A. Effets antioxydants

La plupart des activités biologiques des plantes dues à leurs propriétés antioxydantes car les flavonoïdes ont la capacité de réagir avec la plupart des radicaux libres. La quercétine, le kaempférol, la morine, la myricétine, la rutine, la quercétine et la silybine

agissent comme antioxydants agissant en tant extracteurs des radicaux libres [Ratty, 1988].

L'activité de balayage des radicaux libres des flavonoïdes a été rapportée dans l'ordre: myricétine > quercétine > rhamnetine > morine > diosmetine > narigénine > apigénine > catéchine > 5,7-dihydroxy-3', 4', 5'-triméthoxyflavone > robinine > kaempferol > flavone [Ratty, 1988].

L'effet antioxydant des flavonoïdes est dû à l'inhibition des radicaux libres et la neutralisation des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase et encore la chélation des ions métalliques qui sont la cause de la production des ROS comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+), mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène [Cotelle, 2001].

L'antioxydant est comme un agent anticancéreux dépend de sa compétence en inhibant et en inactivant les radicaux libres [Mishra *et al.*, 2013].

Les flavonoïdes ont la capacité de réduire les radicaux libres comme l'hydroxyle, le peroxyde et l'alkoxyde par le transfert d'un atome d'hydrogène du flavonoïde (Fl-OH) et ce dernier donne un autre hydrogène à un autre radical ce qui rend ce flavonoïde à un quinone stable (Fig. 14) [Mishra *et al.*, 2013].

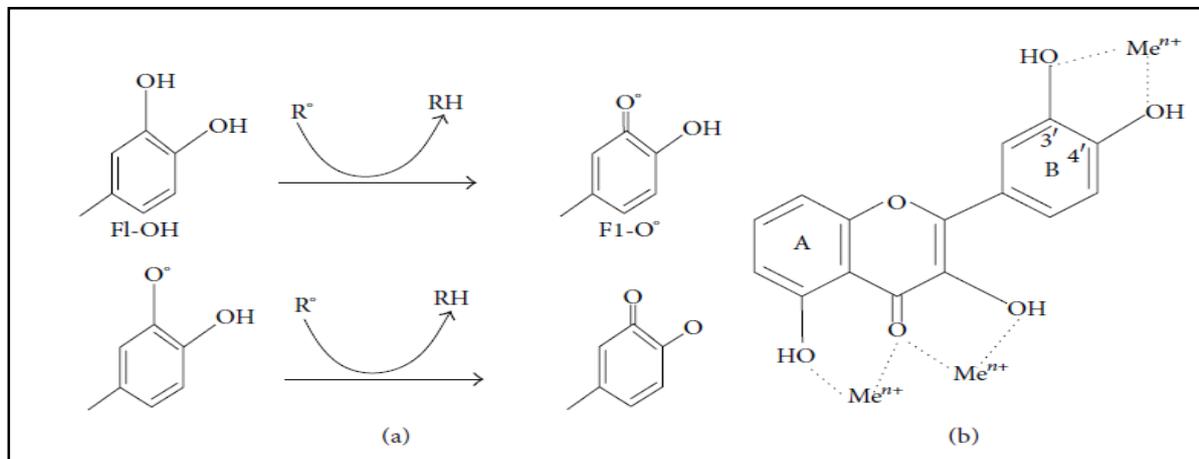


Figure 14. (a) : L'effet scavenger des ROS par les flavonoïdes (Fl-OH) et (b) : Les sites de liaison des métaux, le Me^{n+} : indique les ions métalliques [Kumar and Pandey, 2013].

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes dépend à leur structure, par exemple : les flavonoïdes qui ont une double liaison entre le carbone C2 et le C3 et un groupement carbonyle en C4 sont les flavonoïdes qui ont un effet antioxydant le plus puissant comme la quercétine qui a été découverte qu'elle a un effet antioxydant deux fois plus élevé par rapport à la catéchine (Fig.15) [Kumar *et al.*, 2013].

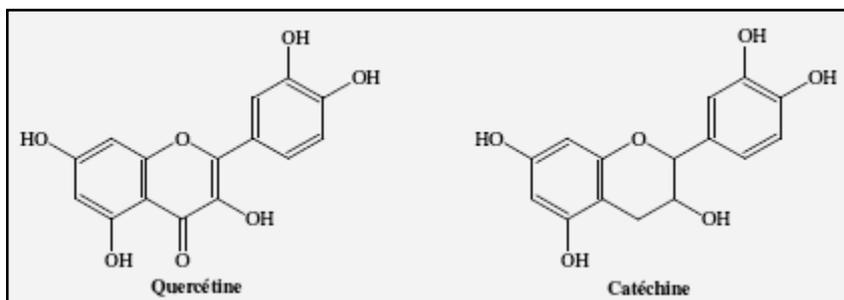


Figure 15. Différence entre la structure de quercétine et la catéchine [Harborne et Williams, 2000].

Les groupements hydroxyles en position C4'- C5' dans le cycle B et les nombres des groupements hydroxyles augmentent l'activité antioxydante des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé [Woodman *et al.*, 2005]. Des études faites ont montré que la morine avec deux groupements hydroxyles et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (Fig. 16).

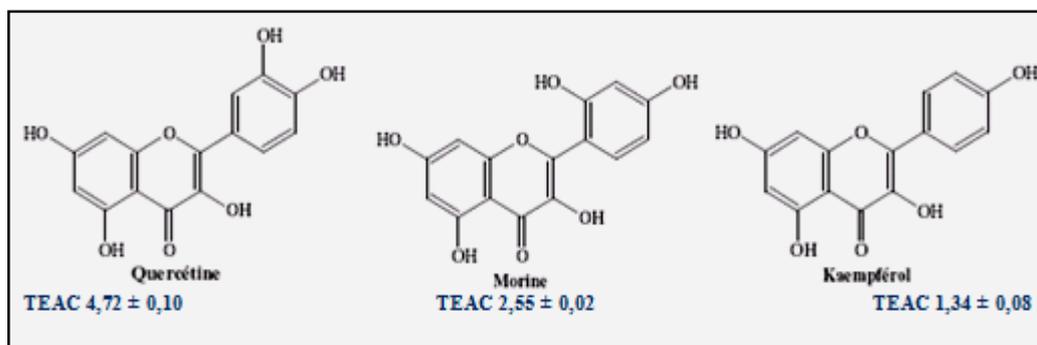


Figure 16. Positionnement des groupements OH dans la quercétine, le kaempférol et la morine [Rice-Evans, 1996].

D. Effets antimicrobiens

Des flavonoïdes et des acides phénoliques ont été étudiés pour leurs effets antibactériens, antifongiques et antiviraux. La plupart des flavonoïdes ont une activité contre les contraintes bactériennes gram positives.

La plupart des flavonones qui ne sont pas liés aux sucres ont montré des activités antimicrobiennes ainsi que les flavonols et les flavonolignans ont une activité inhibitrice vis à vis aux micro-organismes.

L'effet antimicrobien des flavonoïdes se fait par plusieurs mécanismes comme: l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, et aussi l'inhibition du métabolisme énergétique microbien [Pandey *et al.*, 2010].

Les extraits des plantes qui sont riches en flavonoïdes sont rapportés qu'ils possèdent une activité antibactérienne puissante. Les différents flavonoïdes incluant l'apigénine, la galangine, flavone et flavonol glycosides, isoflavones, flavanones et les chalcones.

Les flavonoïdes antibactériens pourraient avoir plusieurs cibles cellulaires au lieu qu'un seul site d'action spécifique. Ainsi, leur mode d'action antimicrobien peut être lié à leur capacité d'inactiver les andésines microbiennes, les enzymes, les transporteurs membranaires. Les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes [Mishra *et al.*, 2009].

La catéchine, la forme la plus réduite de l'unité C3 dans les flavonoïdes et elle est intensivement recherchée grâce à son activité antimicrobienne. Des études ont montré son activité antibactérienne *in vitro* contre *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* et d'autres bactéries [Borris, 1996].

La catéchine a été montrée qu'elle inactive la toxine de choléra dans la *Vibrio cholera* [Nakahara, 1993 ; Borris, 1996].

La myricétine et le robinétine sont connus pour empêcher la synthèse d'ADN de *proteus vulgaris*.

Mori *et al.*, (1987) ont suggéré que le cycle B des flavonoïdes peut intercaler ou former un lien d'hydrogène entre les bases d'ADN et mènent plus loin à l'inhibition de la réplication de l'ADN et la synthèse d'ARN dans les bactéries. Une autre étude a démontré l'activité inhibitrice de quercétine, l'apigénine, et de 3.6.7.3.4.- pentahydroxyflavone contre l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* [Ohemeng *et al.*, 1993].

La narigénine et le sophoraflavanone G ont une activité antibactérienne forte contre le staphylocoque résistant à la méthicilline (MRSA) et les streptocoques. Une altération de la fluidité de membrane dans les régions hydrophiles et hydrophobes peut être attribuée à cet effet qui suggère que ces flavonoïdes pourraient réduire la fluidité des couches externes et internes de membranes [Tsuchiya et Inuma, 2000].

E. Effets anti-inflammatoires

Ils a été rapporté que la plupart des flavonoïdes possèdent une activité anti-inflammatoire par exemple la hespéridine, une flavonoïde qui possède des effets anti-inflammatoires et analgésiques significatifs et récemment l'apigénine, la lutéoline et la quercétine ont été rapportés qui ont une activité anti-inflammatoire [Shahidi *et al.*, 1998].

Les flavonoïdes inhibent la voie de cyclooxygénase et la voie de la lipooxygénase et l'acide arachidonique responsables de processus inflammatoire.

Quelques flavonoïdes comme la chrysrine, la lutéoline, l'apigénine ont la capacité d'inhiber l'activité de la cyclooxygénase (Fig.17) [Tunon *et al.*, 2009].

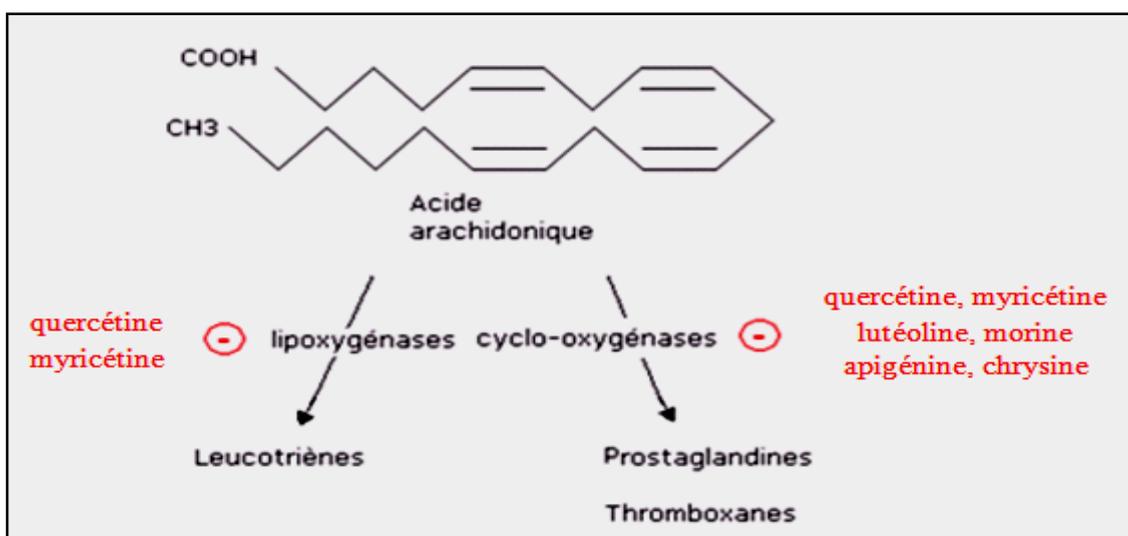


Figure 17. L'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes [Tunon *et al.*, 2009].

D. Activité de hépatoprotective

Beaucoup de flavonoïdes sont avérés posséder une activité hépatoprotective. Dans une étude faite sur la silymarine, l'apigénine, la quercétine et la narigénine en tant qu'agents thérapeutiques putatifs contre l'hépatotoxicité induite par le microcristine-LR, la silymarine s'est avérée la plus efficace [Carlo *et al.*, 1993]. La rutine et la venorutine ont montré leur effet hépatoprotectif dans un cas de cirrhose expérimental [Lorenz *et al.*, 1973]. Les résultats de plusieurs investigations cliniques ont montré l'efficacité des flavonoïdes dans le traitement de dysfonctionnement hépatobiliaire, les nausées et les douleurs abdominales. La silymarine normalise la synthèse des phospholipides sans montrer un effet néfaste sur les cellules intactes ou la formation des acides gras au niveau du foie [Ruiyc, 1991].

La silymarine est un flavonoïde contient trois composants structuraux silibinine, silydianine, et silychristine, extraquée à partir des graines et du fruit du *Silybum marianum*

(Composée). Il a été rapporté qu'elle stimule l'activité enzymatique de l'ARN polymérase [Sonnenbichler et Zetl, 1986].

Elle augmente aussi la prolifération des hépatocytes en réponse à la fumonisine B1 (FB1), une mycotoxine produite par *Fusarium verticillioides* induisant la mort de cellules sans modulation de la prolifération de cellules du foie normal.

Les propriétés pharmacologiques du silymarine impliquent la régulation de la perméabilité et l'intégrité du membrane de cellules, inhibition de leukotriènes, balayage de ROS, suppression de l'activité de NF- κ B, dépression des protéines kinases, et la production de collagène [He *et al.*, 2004].

E. Effets protecteurs vasculaires

La quercétine et la rutine ont été employées en tant que constituants efficaces de plusieurs pharmaceutiques utilisées pour le traitement de la fragilité capillaire. Il a été trouvé que ces flavonoïdes empêchent la perméabilité capillaire dans l'ordre suivant : l'héspéridine > la rutine > la quercétine > la narigénine > le kaempférol [Felicia *et al.*, 1996 ; Catherine *et al.*, 1996]. Il a été suggéré que les flavonoïdes, qui contiennent les groupes d'hydroxyle libres dans les positions 3, 3' et 4' exercent des effets physiologiques bénéfiques sur les capillaires.

Ils ont rapporté que la quercétine, la fisétine et la dihydroquercétine empêchent l'agrégation des plaquettes humaines [Versantvoort *et al.*, 1993].

F. Effets antiulcéreux

Plusieurs études récentes ont indiqué que beaucoup de flavonoïdes possèdent une activité antiulcerogénique.

Il a été trouvé que la quercétine, le kaempférol, la morine, la myricétine et la rutine empêchent le facteur d'agrégation plaquettaire (PAF) d'une manière dose dépendante, suggérant cela le rôle protecteur de ces substances [Parmar et Parmar, 1998].

G. Effets antiallergiques

Les flavonoïdes ont un effet antiallergique par l'inhibition de la production de l'histamine secrété par les mastocytes et les basophiles en inhibant l'ATPase dépendante au Ca⁺⁺ et l'AMP cyclique phosphodiesterase [Yamamura *et al.*, 1998].

H. Effets anticancéreux

De nombreuses études ont montré le potentiel anticancéreux des flavonoïdes par plusieurs mécanismes ou ils interfèrent la progression du cancer dans le développement et la progression du cancer par la modulation de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose, de l'angiogenèse et du métastases cellulaires [Nichenametla *et al.*, 2006].

La consommation élevée des phytoestrogènes, incluant les isoflavones et d'autres flavonoïdes, a un rôle dans la protection contre le risque du cancer de prostate [Siess *et al.*, 1996].

I. Effets antivirales

Il a été montré que la plupart des flavonoïdes interviennent dans l'inhibition de différents enzymes associées dans le cycle de vie des virus.

Gerdin et Srenso, (1983) ont montré que le flavan-3-ol est plus effectif plus que les flavones et les flavonones dans l'inhibition de HIV-1, HIV-2.

Le baicaline, est un flavonoïde isolé de *Scutellaria baicalensis* (Lamiacée) inhibe la réplication de HIV-1.

Le baicaline et autres flavonoïdes inhibent la transcriptase inverse de HIV-1 [Cushnie et Lamb, 2005].

Ils ont prouvé que la catéchine inhibe l'ADN polymérase de HIV-1. Les flavonoïdes comme le gardenine démythylé A et le robinetine sont reconnus par l'inhibition de la protéinase de HIV-1 [Cushnie et Lamb, 2005].

Ils ont rapporté que les flavonoïdes comme la chryisine, l'acacétine et l'apigénine inhibent l'activation de HIV-1 par un mécanisme qui est probablement du à l'inhibition de transcription virale [Critchfield *et al.*, 1996].

Le Kaempférol et la lutéoline montrent un effet synergétique contre l'herpès simplex virus (HSV).

Il a été rapporté que la quercétine inhibe les infections par les virus pseudorabies [Cushnie et Lamb, 2005].

II.1.1.3. Lignanes et les lignines

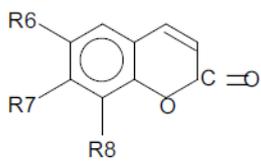
Les lignanes et les lignines sont des composés de type phénylpropanoïdes sont synthétisés à partir des monolignols qui sont des dérivés de l'acide cinnamique [Stalikas, 2007].

Les lignanes sont des composés de haut poids moléculaire capable de construire la paroi végétale avec la cellulose et l'hémicellulose [Haslam, 1996].

II.1.1.4. Coumarines

Les coumarines sont des composés dérivés des acides hydroxycinnamiques, sont des hétérocycles oxygénés, leur structure de base est benzo-2-pyrone [Iwueke *et al.*, 2008]. Les principaux types des coumarines sont dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principaux types de coumarines [Macheix *et al.*, 2005].

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

II.1.1.5. Stilbènes

Les stilbènes constituent une grande famille de composés phénoliques incluant des monomères (comme le resvératrol) et des oligomères (dimères ,trimère,etc). Le composé le plus connus des stilbènes est le resvératrol qui est un agent anticancéreux [Fleuriet *et al.*, 2005].

II.2.Terpenoïdes

II.2.1.Structure

Les terpenoïdes sont des composés constituant l'un du plus grand groupe de produits naturels expliquant plus de 40 000 différents composés, avec plusieurs nouveaux composés étant découverts chaque année [Sacchetti *et Poulter*, 1997].

Les terpènes sont des hydrocarbures avec une structure soit cyclique ou bien à chaîne ouverte, leur formule est $(C_5H_X)_n$, le X est variable selon le degré d'insaturation de la molécule ; la valeur de X est de 1 à 8, mais chez les polyterpènes cette valeur peut atteindre jusqu'au 100.

La molécule de base des terpenoïdes est l'isoprène C_5H_8 (Fig.18) [Loomis *et Croteau*, 1980].

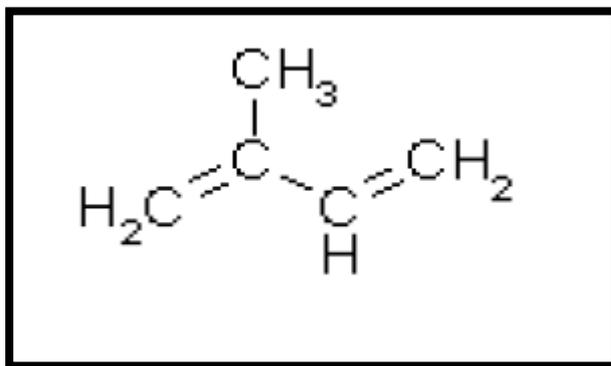


Figure 18. La molécule d'isoprène [Loomis et Croteau, 1980].

La plupart des terpenoïdes sont d'origine végétale ; cependant, elles sont également synthétisées par d'autres organismes, tels que les bactéries et les levures en tant qu'éléments du métabolisme primaire ou secondaire [Rabi et Bishayee, 2009].

II.2.2. Classification

Selon le nombre de répétition de l'unité d'isoprène, ils ont divisés les terpenoïdes en hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes [Bruneton *et al.*, 1999].

II.2.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des terpenoïdes

Les diverses fonctions des terpenoïdes leur confèrent un intérêt accru pour une utilisation commerciale. Les terpenoïdes sont avérés utiles dans la prévention et la thérapie de plusieurs maladies, y compris l'effet anticancéreux, l'effet antimicrobien, antifongique, antiparasitaire, antivirale, antiallergique, antispasmodique, anti hyperglycémique, anti-inflammatoire, et immunomodulatrice. Encore, les terpenoïdes peuvent être employés comme des substances protectrices surtout comme ils ont des propriétés insecticides [Rabi et Bishayee, 2009 ; Shah et Seth, 2010].

La diversité structurale des triterpènes confère des propriétés pharmacobiologiques variées parmi leurs effets : l'effet antinoceptif, cytoprotectif, antifongique et anti œdémateux [Shah et Seth, 2010].

II.3. Saponines

Les saponines sont des composés secondaires trouvés beaucoup dans les plantes. Elles forment la mousse stable dans les solutés, comme le fait le savon. Elles sont

structurellement des molécules diverses qui sont divisées en deux groupes : glycosides de triterpène et de stéroïde [Vincken *et al.*, 2007].

II.3.1. Activités biologiques des saponines

Les saponines généralement abaissent la tension superficielle et possèdent des propriétés d'émulsification. Elles tendent à changer la perméabilité de la membrane cellulaire et exercent donc une toxicité générale surtout sur un tissu organisé.

Leurs activités hémolytiques et antilipémiques peuvent être considérées comme des caractéristiques importantes. Les saponines ont des propriétés comme les détergents et sont mortelles aux champignons en raison de leur capacité à faire des complexes avec des stérols des membranes, ayant pour résultat la perte de l'intégrité membranaire [Osborn, 1996].

II.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont une famille contenant de l'azote, elle est trouvée dans approximativement 20% d'espèces de plantes vasculaires, le plus souvent dans le dicotylédone relativement quelques uns dans les gymnospermes [Hegnauer, 1988].

Généralement, la plupart d'entre eux, y compris les alcaloïdes de pyrrolizidine (PAs) sont toxiques à un certain degré et semblent servir principalement dans la défense contre l'infection microbienne et l'attaque herbivore.

Maintenant la plupart des alcaloïdes sont censés pour fonctionner comme des éléments défensifs contre les prédateurs, particulièrement les mammifères en raison de leur capacité générale de toxicité [Hartmann, 1991].

De point de vue structurale ; les alcaloïdes sont classés en : alcaloïdes tropaniques, alcaloïdes pyrrolizidiniques, alcaloïdes quinolizidiniques, alcaloïdes indolizidiniques, alcaloïdes pipéridiniques, les alcaloïdes isoquinoléiques nous présenterons les alcaloïdes tropaniques qui sont très abondants chez notre espèce étudiée *Hyoscyamus albus*.

II.4.1. Alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes de tropane sont une classe d'alcaloïdes et de métabolites secondaires qui contiennent un cycle tropane dans leur structure chimique, le 8-aza-bicyclo (3.2.1) octane (Fig .19). La classe se compose de plus de 200 composés. Les alcaloïdes de tropane se produisent naturellement dans les plantes de la famille des *Erythroxylacée* (y compris

coca) et les Solanacées (y compris la mandragore, la jusquiame, belladone, datura, pomme de terre, tomate) [Griffin et Lin, 2000; Humam *et al.*, 2005].

Les alcaloïdes de tropane les plus importants sont l'atropine, l'hyoscyamine et la scopolamine. L'atropine est un mélange racémique de l'un R-L-énantiomère de l'hyoscyamine. La L-hyoscyamine est la forme active. Ces alcaloïdes de tropane sont connus pour empêcher la liaison de l'acétylcholine à son récepteur et par conséquent avoir des effets sur le rythme cardiaque, la respiration et les fonctions du système nerveux central (intoxication anticholinergique). La scopolamine, agissant comme un antagoniste à la fois central et périphérique des récepteurs muscariniques, est considérée comme le principal composant responsable des effets toxiques de ces plantes. Les alcaloïdes de tropane se trouvent dans toutes les parties des plantes, avec des concentrations les plus élevées dans les racines et les graines [Adamse et Egmond, 2010].

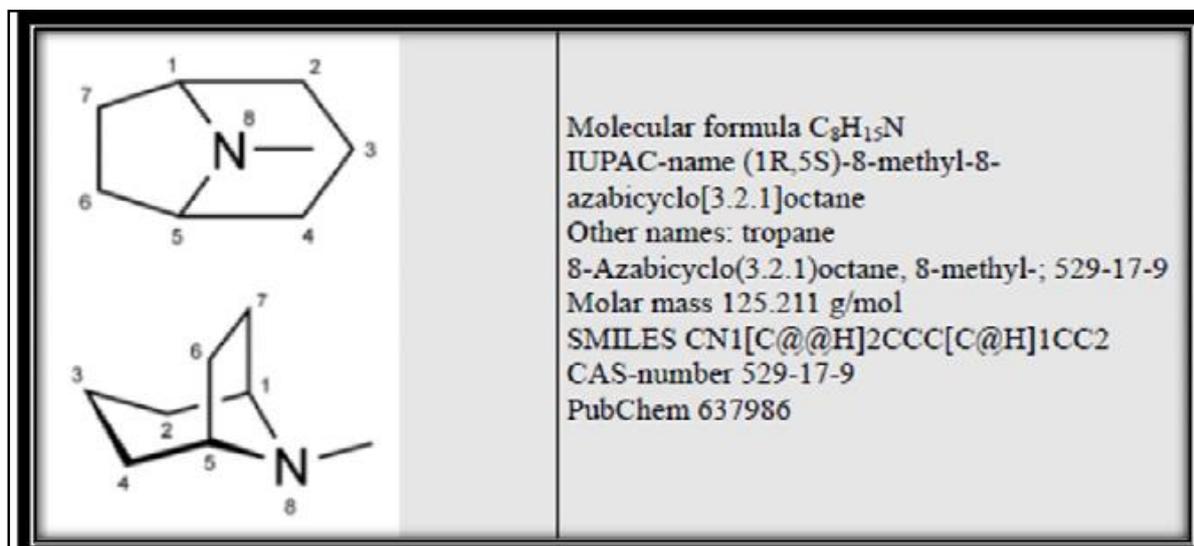


Figure 19. Structure chimique de tropane [Adamse et Egmond, 2010].

II.4.2. Intérêt des alcaloïdes en thérapeutique

Les alcaloïdes constituent l'un des principaux groupes de constituants de plantes utilisés en thérapeutique. Si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme [McCalley, 2002 ; Stöckigt *et al.*, 2002].

- Anti tumoraux : vincalécoblastine, vincristine, taxol, camptothé
- Antalgiques : morphine, codéine
- Spasmodolytiques : tubocurarine et papavérine,
- Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine,

- Emétiques : émétine,
- Antitussifs : codéine,
- Anti arythmiques : quinidine et ajmaline,
- Antipaludiques : quinine
- Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine.

Les alcaloïdes provoquent, chez l'homme diverses réponses physiologiques. A forte dose, les alcaloïdes sont très toxiques, par contre à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique [Stöckigt *et al.*, 2002].

Beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés antibiotiques, ce qui suggère qu'ils constituent un moyen de défense contre les infections microbiennes, comme d'autres produits secondaires, il existe certains nombres d'arguments en faveur d'un rôle défensif.

Les alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments, relaxants musculaires, tranquillisants et psychotropes [Stöckigt *et al.*, 2002].

Partie expérimentale



Chapitre I

Matériel et Méthodes

I.1. Etude phytochimique

I.1.1. Matériel végétal

Les feuilles des deux plantes *Hyoscyamus albus* et *Umbilicus rupestris* ont été récoltées pendant le mois de mars 2012 à partir de Bouzina wilaya de Batna pour la première, et de Tibhirine de la même wilaya pour la deuxième. L'identification botanique des deux espèces a été faite par Dr OUDJHIH B., Laboratoire de Botanique, Département d'Agronomie, Université Hadj Lakhdar- Batna.

Les plantes fraîchement récoltées, ont été lavées puis séchées à l'ombre pendant 40 jours dans un endroit sec et aéré pour l'utilisation ultérieure pour les différentes extractions des principes actifs.

Les feuilles des deux plantes ont été soumises à un broyage puis à une extraction des substances bioactives.

I.1.2. Préparation des extraits

I.1.2.1. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée selon la méthode de **Diallo *et al.*, (2004)** avec quelques modifications. Le matériel végétal est soumis à un épuisement, en utilisant trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole, chloroforme et méthanol.

1 Kg de la poudre des feuilles de chaque plante a été traité avec 5 L d'éther de pétrole pendant 3 jours, après filtration, le résidu séché et soumis à deux autres extractions avec la même quantité du même solvant, après le résidu a été traité avec 5 L de chloroforme à trois reprises et enfin 3 fois avec 5L de méthanol. Les filtrats sont ensuite évaporés à sec en utilisant l'évaporateur rotatif (HAHNVAPOR) à une température de 30°C (Fig.20).L'extraction a été répétée trois fois avec chaque solvant dans le but d'augmenter le rendement.

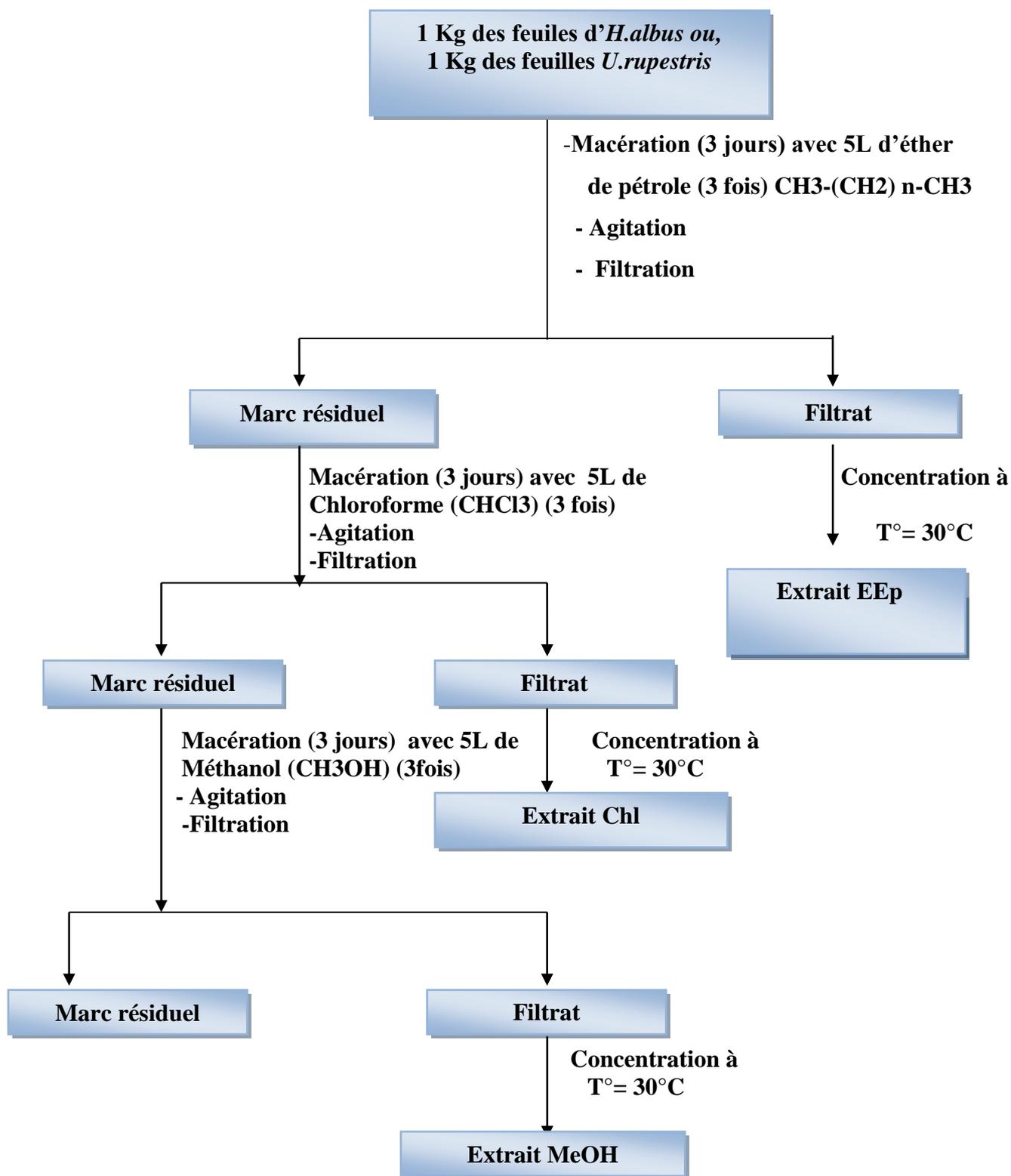


Figure 20. Schéma d'extraction par les solvants organiques des feuilles d'*H.albus* et les feuilles d'*U. rupestris* [Diallo *et al.*, 2004].

I.1.2.2. Calcule du rendement

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de l'extrait après évaporation sur la quantité de poudre végétale utilisée [Loubaki *et al.*, 1999]. La relation de Pratima et Mathad (2011) est appliquée pour calculer le rendement :

Rendement d'extraction (%) = poids d'extrait obtenu $\times 100$ / poids prise du matériel végétal

I.1.3. Analyse des extraits d'*H. albus* et *U. rupestris*

I.1.3.1. Analyse qualitative des extraits d'*H. albus* et *U. rupestris*

I.1.3.1.1. Tests préliminaires

A. Flavonoïdes

La mise en évidence des flavonoïdes se fait selon " réaction de Shinoda" [Lock *et al.*, 2006]. A 1ml de chaque extrait, nous avons rajouté quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et 0,5 g de magnésium métallique. Après 3 min de réaction la présence de la coloration rouge, orangée, rosée ou rouge violacée indique la présence des flavonoïdes.

B. Polyphénols

La caractérisation des polyphénols est faite selon la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3). Pour 2 ml de chaque extrait, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique 2% a été rajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols [N'Guessan *et al.*, 2009].

C. Tanins

Pour 1ml de chaque extrait, nous avons rajouté le FeCl_3 à 1 %. La couleur vire au bleu noir, ce qui indique la présence de tanins galliques et la couleur brune verdâtre indique la présence de tanins catéchiques [Dohou *et al.*, 2003].

D. Terpenoïdes

Pour 0,5 g de chaque extrait ; nous avons rajouté 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré. La présence de la couleur brune rougeâtre à l'interface indique la présence des terpénoïdes [Ayoola *et al.*, 2008].

E. Alcaloïdes

Test de Mayer

1 ml de chaque extrait est testé avec 5 gouttes de réactif de Mayer (Potassium Mercuric Iodide), la formation d'un précipité jaune indique la présence des alcaloïdes [Tiwari et Kakkar, 1990].

Test de Dragendorf

3 ml de chaque extrait ont été mélangés avec 5ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 1%, après incubation dans un bain marie chaud, quelques gouttes de réactif de Dragendoff ont été rajoutées, la présence d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes [Evans, 2002].

F. Saponines (Test de Froth)

Chaque extrait est dilué avec l'eau distillée, ces extraits sont agités dans un tube cylindrique, la formation d'une mousse de 1 cm d'hauteur indique la présence des saponines [Brain et Turner, 1975].

I.1.3.2. Analyse quantitative des extraits d' *H.albus* et *U.rupestris*

I.1.3.2.1. Dosage des polyphénols totaux

1 ml de l'extrait (0,2 mg /ml) est dilué dans 5 ml de l'eau distillée et 1 ml de Na₂CO₃ à 20%. Après mélange, l'ensemble a été incubé à la température ambiante. Par la suite, 1 ml de réactif de Folin Ciocateu a été rajouté, puis incubé à 30 min dans une étuve à 40°C.

L'absorbance a été lue à 760 nm contre un blanc. Le taux de polyphénols est exprimé en µg équivalents d'acide gallique par mg d'extrait (µg GAE/mg d'extrait) via une courbe d'étalonnage d'acide gallique (0-200 µg/ml) [Singelton *et al.*, 1999].

I.1.3.2.2. Dosage des flavonoïdes

Pour 1ml de l'extrait (0.2 mg/ml), nous avons rajouté 1 ml de trichlorure d'aluminium (ALCl₃) (préparé dans l'éthanol à 2%). Le mélange est incubé pendant 1 heure à la température ambiante et puis l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Le taux des flavonoïdes dans l'extrait est exprimé en µg équivalent de quercétine par mg d'extrait

(μg QE/mg d'extrait) via une courbe d'étalonnage de quercétine (0-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [Ordenez *et al.*, 2006].

I.1.3.2.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés est effectué selon la méthode de Heimler *et al.* (2006). Pour 400 μl (0.2 mg/ml) de chaque échantillon ou standard, nous avons rajouté 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'HCl concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500nm.

Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec des concentrations précises de la catéchine (0-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), et les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (μg ECT/mg).

I.1.4. Séparation des produits d' *H.albus* et *U.rupestris*

I.1.4.1. Préparation des phases

5 g de chaque extrait méthanolique de chaque plante sont solubilisés avec 15 ml d'eau distillée, une même quantité de butanol a été rajoutée pour une bonne solubilisation.

Une séparation est faite par une ampoule à décanter et deux phases ont été obtenues (au dessous, la phase aqueuse et au dessus la phase butanolique) et pour une bonne séparation, une autre quantité de l'eau distillée et encore celle du butanol sont rajoutées.

Après séparation des deux phases, ces phases ont été évaporées à l'aide de l'évaporateur rotatif et enfin ont été pesées. Après, ces phases ont été solubilisées dans le méthanol et une chromatographie sur couche mince (CCM) est faite pour toutes les deux phases (butanolique et aqueuse).

I.1.4.2. Séparation sur le gel de séphadex

3 g de la phase butanolique de chaque plante est soumise à une purification sur colonne de gel de séphadex TM LH-20 (GE Healthcare), ce dernier est préparé en solubilisant 100 g de poudre de Séphadex dans le méthanol free pendant 2 h et après on le verse dans la colonne.

Cette phase est chromatographiée sur la colonne avec une élution avec le méthanol sachant que le débit est réglé avec une pompe (2ml /min).

Enfin, les fractions obtenues sont collectées à l'aide d'un collecteur automatique après une analyse avec CCM a été effectuée pour faire réunir les composés semblables [Campos *et al.*, 2013].

I.1.4.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les fractions issues de colonne de séphadex ont été analysées sur des plaques de CCM afin de rassembler les fractions semblables.

Nous avons utilisé la CCM comme méthode de séparation des produits sachant que les plaques sont des plaques de verre de silicagel de type 60 F254 (Merk, USA). Ces plaques sont mises dans deux systèmes de migration qui sont : chloroforme-méthanol-eau (80 :18 :02) et Butanol-ACOH-eau (60 :15 :25).

Après migration, la révélation est faite par UV (254 nm et 366 nm) et aussi par pulvérisation avec le réactif Vanilline sulfurique [Diallo *et al.*, 2004].

I.1.4.4. Purification des produits avec HPLC préparative

Les fractions finales issues après analyse sur CCM ont été évaporées et purifiées avec HPLC préparative type LC-20 AT (Liquid chromatography SHIMADZU made in Irland) (avec une pompe de type Zides) équipé d'un détecteur type RID-10 AA (Refractive index detector avec un débit de 2ml/min), et une colonne (prep column, Part No :Wat 0844176 waters, μ BonadapckTM C18 10 μ m 125 °C, Serial N° :02043822813005).

La phase mobile utilisée pour nos fractions est méthanol /eau (50 :50) et un débit 2 ml/min.

Chaque fraction est solubilisée dans le méthanol et chaque injection est de l'ordre de 100 μ l de 10 mg [Ho *et al.*, 2010].

I.1.4.5. Identification par la RMN à proton

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil puissant pour la détermination de nouvelles structures et de très nombreux exemples appartenant à des classes variées (Fig.23).

Cette technique donne des informations sur l'environnement chimique immédiat de chaque proton ou de chaque carbon d'une molécule, elle permet aussi de préciser les liaisons existantes entre ces atomes à l'intérieur d'une molécule.

Le spectre RMN du proton informe sur les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogène présents dans

l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

Les produits des deux plantes étudiées obtenus après HPLC ont été bien évaporés avec l'évaporateur rotatif puis séché avec le nitrogène ; après nous avons solubilisé chaque produit dans 0.5 ml de méthanol Deuterium oxide (deuteration degree min.99.9% for NMR spectroscopy,Switzerland) et sont analysés avec la RMN à 350 MHz [**Campos et al.,2013**].

I.2. Etude des activités pharmacobiologiques *in vitro*

I.2.1.Etude de l'activité Cytotoxique

I.2.1.1.Culture Cellulaire

Trois lignées cellulaires ont été utilisées dans cette expérience, il s'agit de : cellules cancéreuses du sein (MCF7), cellules cancéreuses cervical (HeLa) et les cellules cancéreuses du prostate (PC-3), ces lignées ont été mises en culture dans le milieu DMEM (Dulbecco's modifications of Eugal's medium avec L-glutamine et 4.5g/L de glucose) (Loza ,Belgium) supplémenté avec le sérum bovin fœtale ,100 unités/ml de pénicilline G et 0.1 mg/ml de streptomycine sulfate à CO₂ de 47% et 38°C pendant une semaine [**Jin et al.,2010**].

I.2.1.2.Test MTT

L'activité anticancéreuse des extraits des deux plantes étudiées HAMEOH et URMeOH est évaluée par l'essai MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sisco, Italy] selon la méthode décrite par [**Mossmann, 1983; Skehan ,1990**] avec quelques modifications.

Après une semaine de culture, ces cellules ont été lavées avec le PBS (phosphate buffer saline) et traitées à l'aide de « Trypsine EDTA » et elles ont été soumises à une incubation pendant 4 min à CO₂ 47% et 38 °C.

Après incubation, nous avons introduit le milieu de culture avec les cellules dans des tubes coniques et nous avons centrifugé à 1040 rpm pendant 5 min pour séparer les cellules du milieu. Les cellules sédimentées sont récupérées, puis 5ml de DMEM sont rajoutés.

Après l'agitation 100 µl de chaque lignée avec 100 µl de Trypan sont pris afin de compter le nombre des cellules à l'aide de microscope en utilisant l'hémocytomètre.

468000 cellules MCF7 /5ml milieu de culture ,466000 cellules PC-3 / 5ml milieu de milieu de culture, et 524000 cellules HeLa /5ml de milieu de culture ont été trouvées.

Dans une microplaque de 96 puits, nous avons déposé dans chaque puits 100 µl de la suspension de MCF7 (contenant 2000 cellules), 100 µl (contenant 2000 cellules) de la

suspension de PC -3 dans chaque puits et 100 µl (1000 cellules) de la suspension de HeLa dans chaque puits et cette microplaque a été incubée 72 heures à CO₂ 47% et 38 °C.

Nos extraits sont solubilisés dans le DMSO (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml et 200 µg/ml) et même le mercapto qui est le standard a été préparé après solubilisation dans le DMEM avec les concentrations suivantes (10, 20, 30,40 et 50 µg /ml) puis incubé dans l'étuve pendant 72 heures. Le DMEM et le DMSO sont utilisés comme des contrôles.

Après 72 heures d'incubation, nous avons rajouté 25 µl de MTT dans chaque puits et après 3 heures d'incubation nous avons rajouté encore 100 µl de Lysis buffer de MTT puis une lecture a été faite dans un spectrophotomètre lecteur de microplaque type (Mutiskan Ex) à 620 nm [Skehan ,1990].

La viabilité et la mortalité cellulaire ont été calculées selon la relation suivante:

% Viabilité cellulaire = (Abs test /Abs contrôle) x 100

% Mortalité = 100 - % Viabilité cellulaire [Mossmann, 1983].

I.2.2.Etude de l'activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien est évalué selon la méthode de diffusion en milieu solide et encore par la méthode de microdilution dans un milieu liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) [Essawi et Srour, 2000 ; Celiktas *et al.*, 2007].

Nos extraits ont été testés sur des souches bactériennes de références *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et autres souches cliniques obtenus à partir de différents services du CHU de Batna : *S.aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* et encore sur une levure qui est *Candida albicans*.

I.2.2.1.Méthode de diffusion en milieu gélosé

Chaque extrait est préparé dans le Dimethyl sulfoxyde (DMSO) avec les concentrations (1g/ml, 0,5 g/ml et 0,25 g/ml).

Chaque souche bactérienne estensemencée dans la gélose nutritive, après 24 heures d'incubation à 37°C, quelques colonies ont été choisies et ont été transférées dans des tubes stériles contenant l'eau distillée stérile ou la densité est 0.5 Mc Farland.

Après, cette suspension est soumise à un ensemencement sur un milieu de culture Muller Hinton pour les souches bactériennes et sur le milieu Saboureaud pour la levure.

Des disques stériles de 6 mm de diamètre sont imbibés d'extrait et ont été déposés sur la surface du milieu en utilisant un témoin imprégné dans le DMSO, puis ces boîtes ont été mises en incubation 24 heures à 37 °C [Ngameni *et al.*, 2009]. Le même protocole est utilisé pour la levure sauf que le milieu de culture est le Sabouraud et l'incubation est 48 heures à 37°C.

L'activité antimicrobienne des extraits a été calculée en mesurant la zone d'inhibition autour des disques.

I.2.2.2.Méthode de microdilution en milieu liquide

Cette méthode est utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les extraits qui ont une zone d'inhibition ≥12 mm. Sur une microplaque de 96 puits contenant un bouillon Muller- Hinton, avec un inoculum bactérien final de 5 UFC/ml.

Les extraits ont été dilués dans le DMSO à 10% constituant une série de dilution allant de (250 µg /ml) jusqu'au (1.95 µg/ml) et ces extraits ont été testés sur les souches, et enfin sont incubés pendant 18 heures à 37°C.

La CMI correspond à la première dilution où la croissance est négative (pas de culture visible) (Fig.21) [Dramane, 2010].

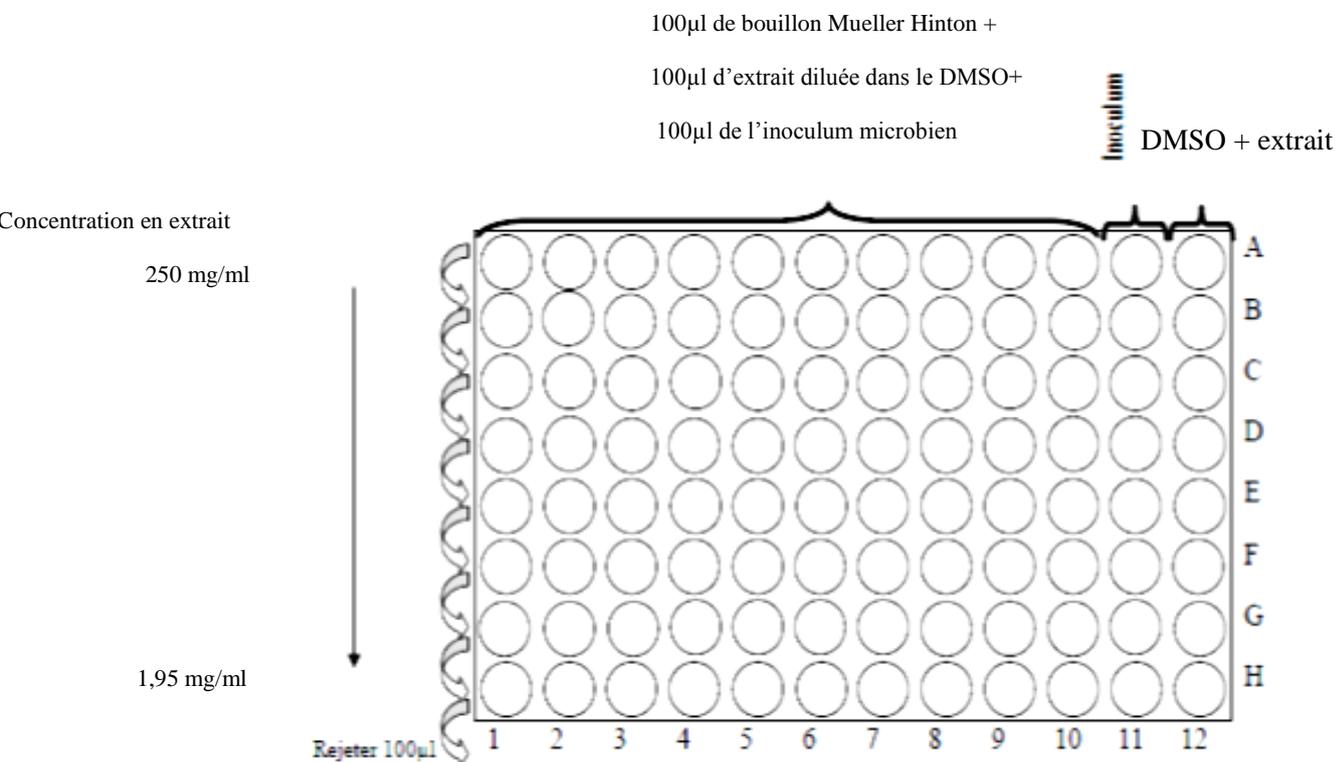


Figure 21. La microplaque utilisée dans le cas de la microdilution.

I.2.3. Etude de l'activité antioxydante

I.2.3.1. Méthode de blanchissement de la β -carotène

Un mélange de 60 mg de β -carotène a été dissout dans 20 ml de chloroforme et mélangé avec 1,0 g de l'acide linoléique et 20 ml de Tween ® 60.

Le chloroforme a été éliminé par évaporation rotative à 40° C. Après évaporation, le mélange était immédiatement ajouté à 25 ml d'eau saturée en oxygène pour former une émulsion. 25 ml de cette émulsion a été transférée dans des tubes contenant 1,0 ml de chaque extrait (EEp, EChl et EMe) de chaque plante et le mélange a ensuite été agité doucement.

1 ml du mélange a été introduit à la pipette et mélangé avec 5 ml de l'éthanol à 95% à 0 ° C. Les absorbances ont été lues à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm toutes les 20 min pendant une durée de 180 min. La procédure ci-dessus a été faite en utilisant le α -tocophérol tant que standard (contrôle positif). Un contrôle négatif sans extrait a été préparé [Moure *et al.*, 2000].

L'activité antioxydante relative de chaque extrait (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{160\text{min}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{160\text{min}} (\alpha\text{-tocophérol})] \times 100$$

I.2.3.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH

L'activité antioxydante contre un radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est basée sur la méthode de Hanato *et al.*, (1988).

1 ml de chaque extrait (EEp, EChl et EMe) (5-1000 $\mu\text{g. ml}^{-1}$) de chaque plante sont ajoutés à 0.25 ml d'une solution méthanolique de DPPH de 0.20 mM. Après une incubation de 30 min à la température ambiante, l'absorbance est lue contre un blanc à 517 nm sachant que la quercétine est utilisée comme standard.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = [(A \text{ blanc} - A \text{ test}) / A \text{ blanc}] \times 100$$

Ou ;

A blanc : l'absorbance du contrôle.

A test : l'absorbance du test.

L'IC 50 a été calculée comme étant la quantité d'antioxydants dans l'échantillon nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH pour 50%.

I.3. Etude des activités pharmacobiologiques *in vivo*

Des rats albinos de type Wistar des deux sexes pesant entre (140-170 g), obtenus de l'institut Pasteur, ont été logés séparément dans des cages de plastique à la température de $(23 \pm 2) ^\circ \text{C}$, une humidité relative de 50-55%, avec un cycle 12 heures de lumière / 12 d'obscurité respectivement avant et pendant l'expérience. Les animaux ont été autorisés à un accès d'aliment et de l'eau *ad libitum* dans toutes les expériences.

I.3.1. Test de toxicité

I.3.1.1. Test de toxicité aigue

La toxicité orale aiguë des deux extraits (HAMeOH et URMeOH) a été évaluée chez des rats Wistar selon le protocole de l'organisation de la coopération économique du développement 420 [OECD, 2001] qui limite la dose à 2000 mg /Kg p.c [Lip nick *et al.*, 1995]. Des rats femelles (140 -160 g) ont été utilisées et ont reçu par voie orale les traitements suivants :

Groupe I : lot témoin a reçu l'eau distillée (10 ml / kg p.c.)

Groupes II, III, IV, V et VI : ont reçu une dose unique de (100, 200,500 ,1000 et 2000 mg/ kg p.c. de HAMeOH) respectivement (10 ml / kg p.c.).

Groupes VII, VIII, IX , X et XI: ont reçu une dose unique de (100, 200,500 ,1000 et 2000 kg p.c. d'URMeOH) respectivement (10 ml / kg p.c.).

Le nombre d'animaux décédés a été calculé, des observations ont été effectuées et enregistrées à 30 min, 1, 2 et 4 heures, puis une fois par jour pendant les 14 prochains jours après l'administration des traitements.

Des changements de la peau, la morbidité, l'agressivité, la sensibilité à la douleur ainsi que des mouvements respiratoires ont été surveillés durant cette période. La LD50 a été calculée en utilisant la méthode arithmique de Karbar [Turner ,1965].

I.3.1.2. Test de toxicité subaigüe

La toxicité subaigüe est effectuée selon la méthode de Chang *et al.*, (2012) avec quelques modifications. Chaque extrait HAMeOH et URMeOH avec des doses de 100, 200 mg / Kg p.c ont été administrées par voie orale à 5 groupes de 6 rats (140-160g) (3 males + 3 femelles).

Groupe I : sert comme témoin, a reçu par gavage de l'eau distillée (10 ml / kg p.c) pendant 28 jours.

Groupes II et III : ont reçu HAMEOH avec des doses de 100, et 200 mg / kg p.c / jour (10ml /Kg p.c.), respectivement pendant 28 jours.

Groupes IV et V : ont reçu URMeOH avec les doses de 100, et 200 mg / kg p.c / jour, (10ml/Kg p.c.) respectivement pendant 28 jours.

La prise du poids corporel, la mortalité, et toutes les manifestations indésirables ont été suivies durant les 28 jours. Après 28 jours, tous les animaux ont été jeûnés pendant la nuit et anesthésiés avec la kétamine. Le sang est prélevé du sinus oculaire dans des tubes héparinés et des tubes EDTA pour la détermination des paramètres biochimiques et hématologiques respectivement. Enfin les animaux anesthésiés ont été sacrifiés et les organes internes ont été collectés et pesés pour déterminer le poids relatif des organes (foie, reins, pancréas et le cœur). Des biopsies ont été réalisées sur le foie et les reins puis conservées dans une solution de formaldéhyde à 10% pour les examens histologiques.

Analyses biochimiques

Le sang recueilli dans des tubes héparinés est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Le plasma a été analysé pour différents paramètres biochimiques tels que l'aspartate amino transférase (ASAT), Alanine aminotransférase (ALAT), la phosphatase alcaline (ALP), cholestérol, triglycérides (TG), urée, glycémie, créatinine, bilirubine totale (BT) en utilisant un automate type (Metrolab 2300).

Analyses hématologiques

Les paramètres hématologiques comme l'hémoglobine (HGB), globules rouges (GR), globules blancs (GB), Hematocrite (HCT), plaquettes (PLT), volume globulaire moyen (VGM), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), les neutrophiles, les basophiles, les lymphocytes, les éosinophiles et les monocytes ont été mesurés en utilisant l'automate d'hématologie type (Daitron Abacus junior 5).

Etude histopathologique

Une étude histopathologique des organes (foie et reins) a été effectuée selon le procédé décrit par **Lamb, (1981)**.

Les biopsies prolongées dans le formaldéhyde à 10% pendant deux semaines puis lavées avec de l'eau de robinet pendant 24h , puis immergées dans 5 bains de l'éthanol à concentration croissante 70% ,80%, 90%, 100% ,100% (une heure dans les bains de 70% et 80% et 45 min dans les bains de 90 % et 100%) pour une déshydratation complète des

tissus. Après, ces tissus sont passés dans deux bains de xylène pendant 15 min pour l'éclaircissement du tissu.

Une inclusion de ces tissus dans la paraffine fondue à 58°C, nous a permis d'obtenir des blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels la pièce prélevée est incluse. Ces blocs ont fait l'objet des coupes de 3 à 5 µm au microtome manuel, et enfin ces coupes sont recueillies sur des lames de verre et ont été colorées avec l'hématoxyline-éosine.

I.3.2. Etude de l'activité analgésique

I.3.2.1. Activité analgésique centrale

L'essai a été effectué selon la méthode décrite par **Eddy et Leimback (1953)**. Des rats males sont répartis en cinq groupes, chacun contient six rats, ces derniers ont reçu par voie orale les traitements suivants,

Groupe I : a reçu une solution saline de NaCl à 0.9 % et sert comme un contrôle,

Groupes II et III : ont reçu HAMEOH (100 et 200 mg/Kg p.c),

Groupes IV et V : ont reçu URMeOH (100 et 200 mg/Kg p.c),

Groupe VI : la morphine sulfate (10 mg/Kg p.c.) comme standard de référence.

Ces traitements donnés avec un volume de 10 ml/Kg p.c. Par la suite les animaux ont été placés sur une plaque chauffante maintenue à une température de (55±0.5°C) avec une période de repos de 15 secondes afin de ne pas endommager la patte.

Le temps de la réaction a été enregistré lorsque les animaux lèchent leurs pattes antérieures ou sautent. Ce temps est enregistré après 15 min, 30 min, 45 min et 90 min de l'application des traitements.

I.3.2.2. Activité analgésique périphérique - constriction abdominale

L'activité analgésique périphérique induite par l'acide acétique a été réalisée selon la méthode de **Seighmund et al., (1957)**.

Une solution d'acide acétique à 0.6 % (1 ml /100 g p.c) a été injectée par la voie intrapéritonéale.

Sachant que 30 min avant l'induction de la douleur, six groupes de 6 rats males ont reçu les traitements suivants par voie orale:

Groupe I : a reçu l'eau distillée et sert comme contrôle,

Groupes II et III : ont reçu HAMEOH (100 and 200 mg / kg, p.c) respectivement,

Groupes IV et V : ont reçu URMeOH (100 and 200 mg / kg, p.c),

Groupe VI : a reçu l'acide acétylsalicylique (15 mg /Kg p.c.) comme produit de référence.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de 10 ml/Kg p.c. Le nombre de torsions et étirements pour chaque animal ont été comptés pendant 15 min en commençant 5 minutes après l'injection d'acide acétique et le pourcentage de protection est calculé selon la formule suivante [Seighmund *et al.*, 1957]:

Pourcentage de protection = $(1 - Vc / Vt) \times 100$ où :

Vt = nombre moyen de torsions des animaux traités.

Vc = nombre moyen de torsions chez le contrôle.

I.3.2.3. Test à la formaline

La méthode utilisée dans cette étude est similaire à celle décrite dans la précédente étude (constriction abdominale) .

La douleur a été induite chez des rats males par l'injection de 20 μ L de la solution formale à 5% préparée dans l'eau physiologique à 0.9 % au dessous de la patte arrière droite. Six groupes de six rats ont été préparés chacun a reçu par voie orale les traitements suivants :

Groupe I : l'eau distillée va servir de contrôle,

Groupes II et III: ont reçu HAMEOH (100 et 200 mg / kg, p.c),

Groupes IV et V : ont reçu URMeOH (100 et 200 mg / kg, p.c),

Groupe VI : a reçu l'indométhacine (10 mg /Kg p.c) et sert comme un standard de référence.

Ces traitements ont été donnés par voie orale avec un volume de (10 ml /Kg p.c.) trente minutes avant l'injection de la solution formale. Après ; ces rats ont été placés individuellement chacun dans une cage transparente. Le temps enregistré durant le lèchement de la patte qui est un indicateur de la douleur, a été enregistré séparément entre 0-5min (première phase ou appelée la douleur neurogène) et entre 20-30 min (deuxième phase ou la douleur inflammatoire) [Hunskaar and Hole, 1987].

Pourcentage de protection = $(1 - Tc / Tt) \times 100$ où :

Tt= temps moyen de lèchement chez le groupe contrôle.

Tc = temps moyen de lèchement chez le groupe traité.

I.3.3. Etude de l'activité antipyrétique

L'activité antipyrétique des extraits a été évaluée à l'aide de levure de bière induisant la fièvre chez les rats [De Pasquale *et al.*, 1995]. La fièvre a été induite chez des rats males par l'injection sous-cutanée d'une suspension aqueuse de 20 % de la levure de bière 20 ml /

kg p.c. Six groupes d'animaux, chacun contient six rats males, l'ensemble a reçu par la voie orale les traitements suivants:

Groupe I : l'eau distillée et sert de contrôle,

Groupe II et III : ont reçu HAMeOH (100 and 200 mg / kg p.c) respectivement,

Groupe IV et V: ont reçu URMeOH (100 and 200 mg / kg p.c) respectivement,

Groupe VI : a reçu le paracétamol (150 mg / kg p.c.) comme produit de référence.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de (10 ml /Kg p.c.) 17 heures après l'induction de la fièvre. La température rectale a été prise à partir de 1, 2, 3,4 et 6 heures après l'administration des traitements.

I.3.4.Evaluation de l'activité antinflammatoire

I.3.4.1.L'œdème de la patte induit par la Carragénane

L'expérience a été effectuée selon le protocole de **Winter et al., (1962)**. Six groupes de 6 rats males, ont reçu les traitements suivants :

Groupe I : de l'eau distillée comme un contrôle,

Groupes II et III: ont reçu HAMeOH (100 mg et 200 mg/ kg p.c) respectivement,

Groupes IV et V: ont reçu URMeOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,

Groupe VI : de l'indométacine (10 mg/Kg p.c.) comme un produit de référence.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de (10 ml/Kg). Le volume de la patte de chaque rat a été mesuré en utilisant le vernier caliper avant les traitements (V0). Une heure après le traitement, 0,1 ml de carragénane (5% préparé dans le NaCl à 0,9%) a été injecté par voie sous-cutané dans la patte postérieure droite. Puis le volume de la patte a été mesuré à 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, et 6 heures après l'administration de la carragénane (Vt). L'œdème a été exprimé comme une augmentation du volume de la patte (ΔV), et le pourcentage d'inhibition (I%) pour chaque traitement a été obtenu comme suit:

$$AV = V_t - V_0$$

$$\text{où } I \text{ (\%)} = (\Delta V_c - \Delta V_{tr}) / \Delta V_c \times 100$$

ΔV_{tr} = l'augmentation du volume de la patte derrière droite chez le groupe traité.

ΔV_c = l'augmentation du volume de la patte droite derrière chez le groupe contrôle [**Winter et al., 1962**].

I.3.4.2.L'inflammation induite par les médiateurs d'inflammation

L'inflammation induite selon la méthode de **Singh *et al.*, (1996)**. Les animaux ont été répartis comme dans l'expérience précédente, six groupes de rats males, chacun a reçu par gavage les traitements suivants :

- Groupe I : a reçu l'eau distillée et sert de contrôle,
- Groupes II et III: ont reçu HAMEOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,
- Groupes IV et V: ont reçu URMeOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,
- Groupe VI : a reçu l'indométacine (10 mg/Kg p.c.) comme un produit de référence.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de 10 ml/Kg p.c. L'œdème a été induit par injection sous-cutanée de 0,1 ml d'une solution de la sérotonine (10 mg/mL) dans les pattes arrières des rats 1 heure après l'administration orale des traitements.

Le volume des pattes a été mesuré après 1 heure de l'injection de la sérotonine. Et le même protocole est effectué sur d'autres rats mais après avoir remplacé la sérotonine par l'histamine (10 mg/ml).

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit [**Singh *et al.*, 1996**]:

$$I (\%) = [(\Delta\text{Vol c} - \Delta\text{Vol tr}) / \Delta\text{Volc}] \times 100.$$

$\Delta\text{V tr}$ = l'augmentation du volume de la patte derrière droite chez le groupe traité.

$\Delta\text{V c}$ = l'augmentation du volume de la patte derrière droite chez le groupe contrôle.

I.3.4.3. L'œdème de la patte induit par la solution formaline

Cette expérience a été réalisée en utilisant la méthodologie décrite dans l'inflammation induite par les médiateurs d'inflammation par **Dimo *et al.*,(2006)**. Six groupes de rats males, chacun a reçu par voie orale les traitements suivants :

- Groupe I: de l'eau distillée comme un contrôle,
- Groupes II et III: ont reçu HAMEOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,
- Groupes IV et V: ont reçu URMeOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,
- Groupe VI : a reçu l'indométacine (10 mg/Kg p.c.) comme un produit de référence.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de 10 ml/Kg p.c. 30 minutes plus tard, 0,1 ml de solution formaline (2% préparé dans le NaCl à 0,9%) a été injecté dans la patte arrière droite des rats. Le volume de la patte a été déterminé par la méthode de vernier caliper avant l'administration des traitements et après 1, 2, et 4 heures de l'injection de la solution formaline. Les mêmes animaux ont été utilisés pour l'essai chronique. Ils ont été

traités avec les extraits et le standard quotidiennement après la mesure du volume de la patte pendant 10 jours consécutifs sachant que la deuxième injection de la solution formaline a été donnée le troisième jour. Le pourcentage d'inhibition est calculé avec la même formule de l'expérience de l'inflammation induite par les médiateurs d'inflammation.

I.3.4.4. La péritonite induite par la carragénane

Cette activité est évaluée selon **Bastos *et al.*, (2007)**. Les animaux ont été répartis comme dans l'expérience précédente, six groupes de 6 rats males ont reçu les traitements suivants :

Groupe I: de l'eau distillée et sert de contrôle,

Groupes II et III: ont reçu HAMeOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,

Groupes IV et V: ont reçu URMeOH (100 et 200 mg / kg p.c) respectivement,

Groupe VI : de l'indométacine (10 mg/Kg p.c.) comme un produit de référence. Ces traitements ont été donnés avec un volume de 10 ml /Kg p.c. Une solution de carragénane (0,25 ml, 0,75% dans une solution saline) a été injectée par voie intrapéritonéale 1 h plus tard.

Après 4 h, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Une solution de phosphate buffer de (PH=7.5) a été utilisée lors de la collecte du fluide péritonéal dans des tubes EDTA. La numération des leucocytes en particulier les neutrophiles a été déterminée en utilisant l'automate d'hématologie (type Diatron Abacus Junior 5).

Le pourcentage de l'inhibition des leucocytes a été calculé comme suit:

$$I \% = (1 - T / C) \times 100, \text{ où}$$

T : représente le nombre des leucocytes dans les groupes traités.

C : représente le nombre des leucocytes dans le groupe contrôle.

Le changement des neutrophiles ont été calculés par l'équation suivante:

Changement des neutrophiles = nombre des neutrophiles dans le groupe traité / nombre des neutrophiles de groupe contrôle x 100 [**Bastos *et al.*, 2007**].

I.3.4.5. Effets de stabilisation de la membrane plasmique

Selon la méthode décrite par **Shinde *et al.*, (1989)** 5 ml du sang humain ont été recueillis et transférés dans le tube EDTA. Le tube a été centrifugé à 2000 rpm pendant 5 min, et lavé trois fois avec un volume égal de solution saline normale. Le volume du sang est mesuré et reconstituée comme une suspension de 40% avec une solution tampon isotonique (pH = 7,4). La composition de la solution tampon (g /l) était [NaCl (4,4 g),

NAH₂ PO₄ (1,6 g) et Na₂HPO₄ (7,6g)].

a . Hémolyse induite par la chaleur

Quatre séries de tubes ont été préparés,

Série I : contient quatre tubes de 5 ml contenant 200 µg/ml d'URMeOH préparés dans une solution buffer isotonique.

Série II : contient quatre tubes de 5ml contenant 400 µg/ml d'URMeOH préparés dans une solution buffer isotonique.

Série III : contient quatre tubes de 5ml contenant 200 µg/ml de HAMEOH préparés dans une solution buffer isotonique.

Série IV : contient quatre tubes de 5ml contenant 400 µg/ml de HAMEOH préparés dans une solution buffer isotonique.

Série VI : contient quatre tubes de 5ml contenant 200 µg/ml de l'indométacine dans une solution buffer isotonique.

Série VII : contient quatre tubes de 5ml contenant une solution buffer isotonique.

Une suspension d'érythrocyte de 0.1 ml a été rajoutée à tous les tubes de chaque série. Une paire de chaque série a été incubé dans l'eau chaude à 54°C pendant 20 min. L'autre paire a été refroidis à -10°C pendant 20 min puis les tubes ont été centrifugés à 1000 rpm pendant 5 min et les absorbances ont été mesurées par le spectrophotomètre ($\lambda = 540$ nm).

Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été calculé comme suit:

$$\text{Inhibition d'hémolyse (\%)} = [1 - (\text{At2} - \text{At1} / \text{Ac} - \text{At1})] \times 100$$

At1 = absorbance de test non chauffé.

At2 = absorbance de test chauffé.

Ac = absorbance de contrôle chauffé [Shinde *et al.*, 1989].

B . Hémolyse induite par l'hypotonie

Quatre séries de tubes ont été préparés,

Série I : contient quatre tubes de 5 ml contenant 200 µg /ml de URMeOH (solubilisé dans une solution isotonique buffer pour les deux premiers tubes et dans l'eau distillée pour les deux autres tubes).

Série II : contient quatre tubes de 5 ml contenant 400 µg/ml de URMeOH (solubilisés dans une solution isotonique buffer pour les deux premiers tubes et dans l'eau distillée pour les deux autres).

Série III : contient quatre tubes de 5 ml contenant 200 µg/ml de HAMEOH (solubilisé dans une solution isotonique buffer pour les deux premiers tubes et dans l'eau distillée pour les deux autres).

Série IV : contient quatre tubes de 5 ml contenant 400 µg/ml de HAMEOH (solubilisé dans une solution isotonique buffer pour les deux premiers tubes et dans l'eau distillée pour les deux autres).

Série V : contient quatre tubes de 5 ml contenant 200 µg/ml de l'indométacine (solubilisé dans une solution isotonique buffer pour les deux premiers tubes et dans l'eau distillée pour les deux autres).

Série VI : contient quatre tubes de 5 ml (deux contenant une solution isotonique buffer et deux autres contenant l'eau distillée) comme un contrôle négatif.

Après ,0.1 ml de la suspension érythrocytaire a été rajouté à l'ensemble des tubes. Ces derniers sont soumis à une incubation pendant 1 heure à la température ambiante suivi par une centrifugation à 3000 rpm pendant 5min et l'absorbance de surnageant a été mesurée en utilisant le spectrophotomètre à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = [1 - (A_{th} - A_{ti} / A_{ch} - A_{ti})] \times 100$$

A_{ti} = absorbance de test dans la solution isotonique.

A_{th} = absorbance de test dans la solution hypotonique.

A_{ch} = absorbance de contrôle dans la solution hypotonique [Shinde *et al.*, 1989].

I.3.5. Etude de l'activité antidiabétique

I.3.5.1. Etude de la tolérance au glucose

Des rats males jeunés ont été divisés en six groupes de 6 rats et ont reçu les traitements suivants par voie orale :

Groupe I : l'eau distillée et sert comme un témoin.

Groupe II : l'eau distillée et sert comme un contrôle.

Groupe III et IV : l'extrait HAMEOH (100 et 200 mg/Kg p.c.) respectivement.

Groupe V et VI : l'extrait URMeOH (100 et 200 mg/Kg p.c.) respectivement.

Ces traitements ont été donnés avec un volume de 10 ml/Kg p.c.

Après 30 min d'administration des extraits, les rats ont été administrés par voie orale une solution de glucose (2g/Kg p.c.) (20 ml/Kg p.c.) sauf le groupe témoin.

Une goutte du sang est obtenue à partir de la veine de la queue juste avant l'administration de glucose et après 30 min, 90 min et 120 min après l'administration de

glucose. Le taux de glucose est mesuré à l'aide des bandelettes de glycémie en utilisant un Glucomètre de type ACCU –CHEK Active [Shende *et al.*, 2009].

I.3.5.2. Etude de diabète induit par la streptozotocine

Des rats males sont divisés en six groupes, de 8 rats, jeunés 24h avant l'expérience, puis le diabète a été induit par une seule injection intrapéritonéale de la solution de streptozotocine (55 mg/Kg p.c) dans 0.1 mol/L de citrate buffer (PH=4.5) avec un volume de (1ml/Kg p.c.) [Islam *et al.*, 2009].

Après 72 h, nous avons mesuré la glycémie chez tous les rats, seulement les rats dont la glycémie ≥ 190 mg/L ont été choisis et qui sont considérés comme des diabétiques.

Ces animaux diabétiques ont été divisés et ont reçu les traitements suivants par la voie orale durant 30 jours successifs comme suit :

Groupe I: l'eau distillée et sert comme un contrôle,

Groupe II: témoin, a reçu le citrate buffer à 0.1 M à PH=4.5,

Groupe III : a reçu l'extrait HAMEOH (100 mg/Kg),

Groupe IV : a reçu l'extrait HAMEOH (200 mg/Kg),

Groupe V : a reçu l'extrait URMeOH (100 mg/Kg),

Groupe VI : a reçu l'extrait URMeOH (200 mg/Kg),

Groupe VII : a reçu la metformine (500 mg/Kg p.c) comme standard de référence par voie orale,

Groupe VIII : a reçu l'insuline (100UI /ml) (5 ml/Kg p.c) par voie intraveineuse via la queue comme standard de référence.

Nous avons mesuré le poids corporel des animaux chaque semaine.

Dosage des paramètres biochimiques

Après 30 jours de traitement, les rats ont été jeunés et le sang est collecté à partir du sinus oculaire après une anesthésie avec le chloroforme dans des tubes héparinés afin de doser le glucose, l'urée, la créatinine, PAL, lactate déshydrogénase (LDH), cholestérol, TG et l'insuline, tandis que pour le dosage de HGB et le l'hémoglobine glyqué (HbA1C) nous avons prélevé sur des tubes EDTA.

Les urines sont collectées dans des cages métaboliques afin de chercher la présence de glucose et des corps cétoniques en utilisant des bandelettes spécifiques.

Dosage de Glycogène

Afin de doser le taux de glycogène, le foie est découpé en petites pièces, puis 5 g de foie sont bouillis dans 50 ml d'eau distillée durant 2 min puis broyées. A ce broyat, nous

avons rajouté 25 ml d'eau distillée et le mélange a été bouilli pendant 5 min. Après une première filtration, 3ml d'Hcl sont rajoutés au filtrat puis une deuxième filtration. L'éthanol à 95% (4 fois volume de filtrat) a été rajouté au filtrat puis une troisième filtration, le filtrat est mélangé avec 2 ml d'eau distillée.

Après, nous avons rajouté une goutte de lugole à 3 ml d'eau distillée, puis nous avons rajouté ce mélange au filtrat et la lecture est faite par spectrophométrie à 470 nm.

Le taux de glycogène est calculé à partir de la droite d'étalonnage établi avec des concentrations précises de glycogène pure (0-4500 µg/ml) [Dedier, 1994].

I.3.6. Etude de l'activité antiulcéreuse

Pour l'étude de cette activité, nous avons utilisé la méthode de **Garg et al., (1993)**. Des rats males ont été répartis en six groupes de six rats. Ces derniers ont été jeunés 48 h avant l'expérience mais avec un accès libre à l'eau deux heures avant l'expérience et ont reçu par voie orale les traitements suivants :

Groupe I: l'eau distillée avec (5 ml/kg p.c) et sert comme un témoin,

Groupe II: l'eau distillée avec (5 ml/kg p.c) et sert comme un contrôle,

Groupes III et IV : l'extrait HAMEOH avec les deux doses (100 et 200 mg/Kg p.c.) respectivement,

Groupes V et VI: l'extrait URMeOH avec les deux doses (100 et 200 mg/Kg p.c.) avec un volume de (10 ml/Kg p.c.),

Groupe VII : l'oméprazole avec une dose (20 mg/kg p.c) (5ml /Kg p.c) comme un standard de référence.

30 min après le prétraitement, l'ulcère gastrique a été induit aux animaux par l'administration orale de l'éthanol absolu (5 ml/kg p.c.) sauf le groupe témoin.

Les rats ont été disséqués 60 min après l'administration d'éthanol et chaque estomac a été ouvert le long de la grande courbure, et laver avec l'eau physiologique [Paiva et al., 1998].

I.3.6.1. Evaluation des lésions gastriques

Les ulcères trouvés dans la muqueuse gastrique apparaissant sous forme de bandes allongées de lésions hémorragiques parallèles à l'axe long de l'estomac. La surface d'ulcère gastrique a été calculée selon la méthode de **Kauffman et Grossman (1978)** avec une légère modification. La longueur (mm) et la largeur (mm) de l'ulcère sur la muqueuse

gastrique ont été mesurées par la méthode de quadrillage sous une loupe binoculaire (de x1.8). La surface de chaque lésion d'ulcère a été mesurée en comptant le nombre de petits carrés, 1 x 1 mm, couvrant la longueur et la largeur de chaque bande de l'ulcère. La somme des surfaces de toutes les lésions pour chaque estomac a été appliquée pour le calcul de la surface de l'ulcère (UA) lorsque la somme de petits carrés est multipliée au grossissement 1,8 [Abdulla, 2010].

I.3.6.2.Mesure de volume de jus gastrique

Le volume de jus gastrique a été mesuré à l'aide d'une seringue.

I.3.6.3.Pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition des ulcères d'un traitement donné est déterminé selon la formule ci-dessous : [Njar *et al.*, 1995 ; Malairajan *et al.*,2007].

$$\text{Inhibition (\%)} = [(UA \text{ contrôle} - UA \text{ traité})/UA \text{ contrôle}] \times 100$$

UA contrôle : surface ulcéreuse du groupe contrôle.

UA traité : surface ulcéreuse du groupe traité.

I.3.6.4.Mesure de l'acidité totale

1 ml de jus gastrique a été dilué 10 fois avec l'eau distillée et soumis à un titrage par le NaOH à 0.01 N avec l'ajout de quelques gouttes de phénolphtaléine jusqu'au l'obtention d'une couleur rose [Dashputre et Naikwade, 2011]. L'acidité totale est calculée selon la formule suivante.

$$\text{Acidité totale} = (\text{volume de NAOH} \times \text{Normalité} \times 100 \text{ mEq/L}/100\text{g}) / 0.1$$

I.3.6.5.Histopathologie

Des échantillons d'estomac ont été fixés dans le formol à 10% pour l'étude histopathologique avec coloration par l'hématoxyline-éosine.

I.4. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée par les logiciels statistiques Graph Pad Prism 5 et par Excel.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. Les résultats sont analysés par le test Anova univarié suivie du test Dunnet /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1. Etude phytochimique

II.1.1.Extraction et calcul du rendement

Les extraits organiques de chaque plante (EEp, EDm et EMe) ont été obtenus par la méthode de macération successive par des solvants à polarité croissante.

Le rendement de chaque extrait par rapport au poids du broyat est représenté dans le tableau 2.

Tableau 2. Rendement des divers extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles de *H.albus* et *U.rupestris*

Extraits	Quantité de l'extrait (g)	Quantité de poudre végétale(g)	Rendement (%) Par rapport au poids du broyat
EEp (<i>H.albus</i>)	11.2	1000	1.12
EChl (<i>H.albus</i>)	25.6	1000	2.56
EMe (<i>H.albus</i>)	56.2	1000	5.62
EEp (<i>U.rupestris</i>)	10.00	800	1.25
EChl (<i>U.rupestris</i>)	13.6	800	1.70
EMe (<i>U.rupestris</i>)	14.08	800	1.76

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage.

II.1.2. Tests des extraits d'*H. albus* et *U. rupestris*

II.1.2.1.Analyse qualitative des extraits d'*H.albus* et *U.rupestris* (Test préliminaires)

Les tests préliminaires ont indiqué la présence des polyphénols, les tanins galliques, les terpenoïdes et les flavonoïdes dans tous les extraits de *H.albus* et *U.rupestris* et avec une présence accrue des alcaloïdes dans les extraits des deux plantes.

Concernant les tanins catéchiques sont absents dans l'extrait EEp et EMe et présents dans l'extrait EChl de *H.albus* mais présents dans tous les extraits d'*U.rupestris* (Tableau 3).

Tableau 3. Tests chimiques des extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles de *H.albus* et *U.rupestris*.

Plantes	Extraits	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins catéchiques (condensés)	Tanins gallique (hydrolysables)	Terpenoïdes	Alcaloïdes
<i>Hyoscyamus albus</i>	EEp	++	+	--	+	+++	++++
	EChl	++	+	+	+	+++	+++
	EMe	++	+++	--	++	++++	++++
<i>Umbilicus rupestris</i>	EEp	++++	++	++	+	++++	++++
	EChl	++	++	+	+	++++	++++
	EMe	+++	++	+	++	++++	++++

++++ : Très abondant ; +++ : abondant ; ++ : moyen ; + : réaction louche.

II.1.2.2. Analyse quantitative

L'étude quantitative des extraits bruts préparés à partir des feuilles d' *H. albus* et *U. rupestris*, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et les tanins condensés. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués [Lock *et al.*, 2006].

Trois droites d'étalonnages (Fig. 22, 23 et 24) ont été tracées pour cet objectif qui se sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations.

Pour la plante *H.albus*, les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'EMe est le plus riche en composés phénoliques ($111.10 \pm 1.82 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait), suivi par l'EChl ($99,45 \pm 2.75\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait), tandis que l'EEp ne contient que ($55 .61 \pm 1.32\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait).

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux montre que l'EMe d'*H.albus* contient ($24.31 \pm 0.62 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$) et l'EChl ($18.23 \pm 0.78 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$) tandis que l'EEp comporte ($14.12 \pm 0.62 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$).

Le dosage des tanins condensés montre que tous les extraits de *H.albus* sont riches en tanins : l'EMe ($24.87 \pm 1.57 \mu\text{g ECT/mg d'extract}$) suivie par l'EChl ($20.38 \pm 0.69 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$) et l'EEp ($10.37 \pm 0.55 \mu\text{g EC/mg d'extract}$) (Tableau 4).

La quantité des polyphénols totaux chez la plante *U.rupestris* change dans les différents extraits dont l'EMe et l'EACHl sont riches en composés phénoliques ($105.7 \pm 0.37 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$, $95.98 \pm 0.33 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$) respectivement, tandis que l'EEp contient ($23.83 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$).

EMe des feuilles d'*U. rupestris* a une grande quantité de flavonoïdes ($29.56 \pm 1.88 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$) suivi par les extraits apolaires, dont l'EChl contient ($20.72 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$) et l'extrait EEp ($6.77 \pm 1.24 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$).

Le dosage des tanins condensés dans les extraits d'*U.rupestris* montre que la teneur la plus élevée est celle de l'EMe ($25.48 \pm 0.70 \mu\text{g EC/mg d'extract}$) suivie par l'EChl ($22.93 \pm 0.07 \mu\text{g EC/mg d'extract}$) tandis qu'EEp contient ($13.27 \pm 0.69 \mu\text{g EC/mg d'extract}$) (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les différents extraits des feuilles d'*H. albus* et *U. rupestris*.

Plante	Extrait	Teneur en polyphénols ^(a)	Teneur en flavonoïdes ^(b)	Teneur en tanins ^(c)
<i>H. albus</i>	EEp	55.61 ± 1.32	14.12 ± 0.62	10.37 ± 0.55
	EChl	99.45 ± 2.75	18.23 ± 0.78	20.38 ± 0.69
	EMe	111.1 ± 1.82	24.31 ± 0.62	24.87 ± 1.57
<i>U. rupestris</i>	EEp	23.83 ± 0.21	6.77 ± 1.24	13.27 ± 0.69
	EChl	95.98 ± 0.33	20.72 ± 0.37	22.93 ± 0.07
	EMe	105.7 ± 0.37	29.56 ± 1.88	25.48 ± 0.70

(a) $\mu\text{g d'equivalent d'acide gallique par mg d'extract}$ ($\mu\text{g EAG/mg d'extract}$).

(b) $\mu\text{g d'equivalent de quercetine par mg d'extract}$ ($\mu\text{g EQ/mg d'extract}$)

(c) $\mu\text{g d'equivalent de catéchine par mg d'extract}$ ($\mu\text{g EC/mg d'extract}$)

L'examen de ces résultats permet de mettre une corrélation linéaire significative entre la teneur en flavonoïdes et les composés phénoliques ($R^2=0.9589$,

$P \leq 0.05$), et entre la teneur en tanins et en composés phénoliques ($R^2=0.9898$, $P \leq 0.05$) dans les extraits d'*H. albus*.

Et aussi de mettre une corrélation linéaire significative entre la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques ($R^2=0.9606$, $P \leq 0.05$), et entre la teneur en tanins et en composés phénoliques ($R^2=0.9112$, $P \leq 0.05$) dans les extraits d'*U. rupestris*.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits des plantes est en fonction de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits [Stanković, 2011].

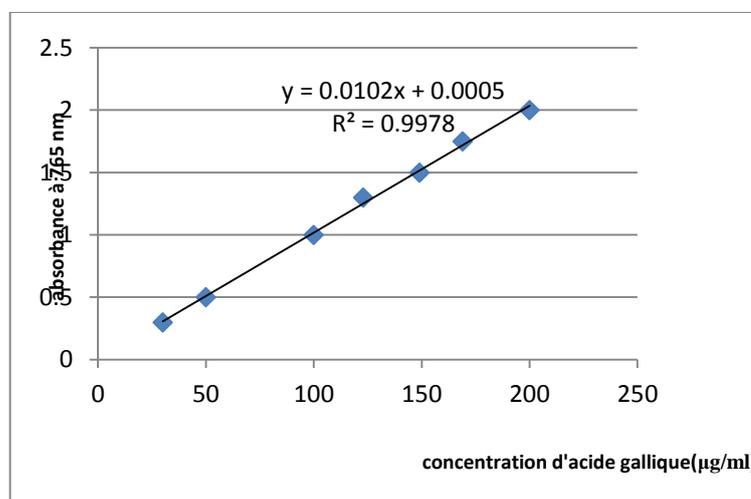


Figure 22. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

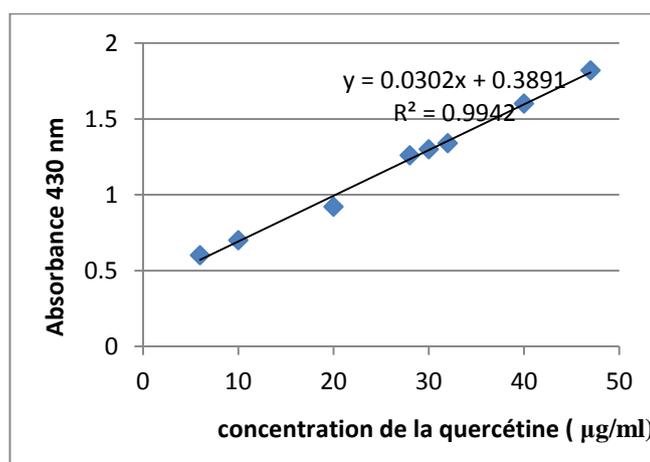


Figure 23. Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).

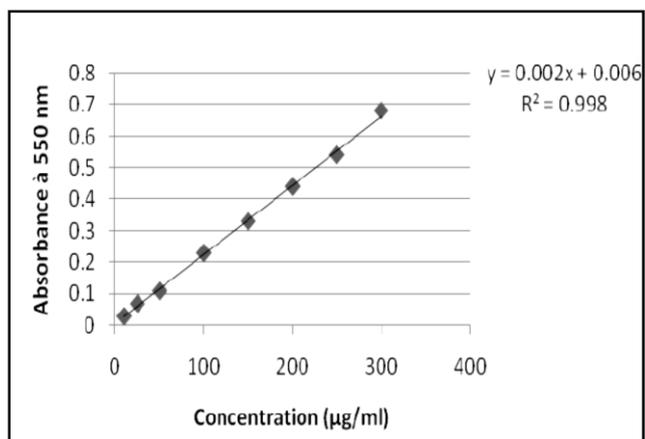


Figure 24. Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm SD de trois essais)

II.1.3. Séparation sur chromatographie sur colonne et CCM

Le tableau 5 montre le poids des extraits ainsi que le poids des phases obtenues

Tableau 5 : Masse des extraits et des phases aqueuses et butanoliques de *H.albus* et *U.rupestris*.

Extraits et phases	Poids (g)
Extrait HAMEOH	56.24
Extrait URMeOH	14.07
Extrait butanolique de <i>H .albus</i>	3.20
Extrait aqueuse d' <i>H .albus</i>	2.93
Extrait butanolique d' <i>U.rupestris</i>	3.44
Extrait aqueuse d' <i>U.rupestris</i>	2.58

La phase butanolique et aqueuse des deux plantes ont été testées sur CCM et nous avons trouvé que la phase aqueuse contient des sucres (Fig.25).



Figure 25 .Chromatogrammes des phases aqueuses et butanoliques des plantes *H.albus* (a) et *U.rupestris* (b).

Selon les résultats obtenus de CCM de *H.albus* et *U.rupestris*, les phases aqueuses n'ont pas migré car elles contiennent des sucres c'est pour cela nous avons choisis de travailler les phases butanoliques.

La phase butanolique de *H.albus* a subit une purification sur le gel de Séphadex LH 20 et ensuite nous avons obtenus 40 fractions, ces dernières ont été analysées avec CCM, ces fractions ont été réunies en 11 fractions séchées et pesées (Tableau 6).

Tableau 6.Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique de *H.albus*.

Fractions	Poids
F1	7 mg
F2	66 mg
F3	64 mg
F4	239 mg
F5	96 mg
F6	91 mg
F7	125 mg
F8	46 mg
F9	122 mg
F10	31 mg
F11	15 mg

Nous avons analysé ces 11 fractions sur CCM (Fig.26)

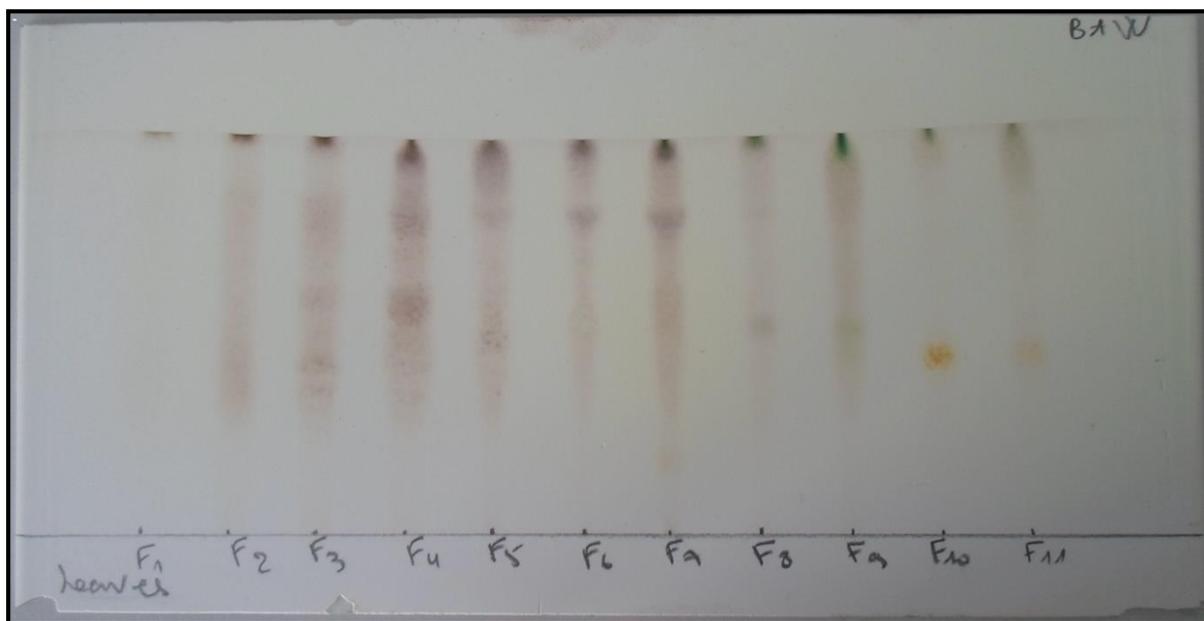


Figure 26. Chromatogramme de fractions obtenues de la phase butanolique *H.albus* après purification sur colonne de Séphadex.

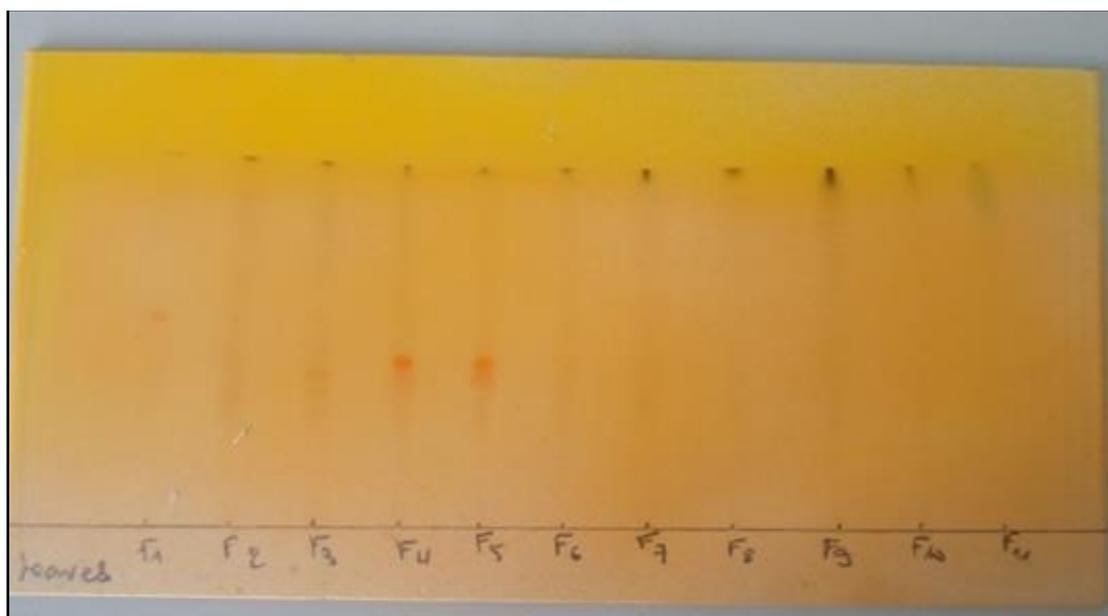


Figure 27. Chromatogramme de fractions obtenues de la phase butanolique *H.albus* après purification sur colonne de Séphadex révélé par la solution de Dragendorff

Pour la plante *U. rupestris*

La phase butanolique d' *U.rupestris* a subit une purification sur le gel de Séphadex LH 20 et ensuite nous avons obtenus 42 fractions, ces derniers ont été analysés avec CCM, ces fractions ont été réunies en 10 fractions séchées et pesées (Tableau 7).

Tableau 7 : Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique d' *U.rupestris*.

Fractions	Poids
F1	6 mg
F2	112 mg
F3	271 mg
F4	624 mg
F5	179 mg
F6	35 mg
F7	7 mg
F8	10 mg
F9	16 mg
F10	20 mg

Nous avons analysé ces 10 fractions sur CCM (Fig.28)

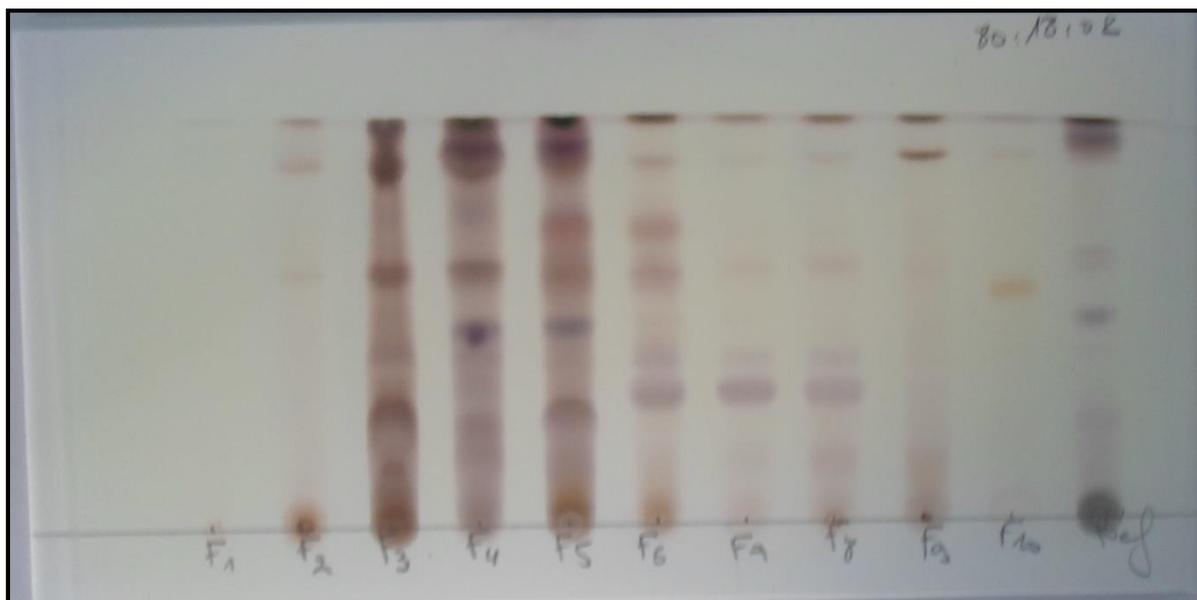


Figure 28.Chromatogramme de fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique d'*U. rupestris*.

II.1.4. Analyse par HPLC préparative

La plante H.albus

La fraction F10=31 mg de *H.albus* a donné un seul spot c'est-à-dire un seul produit, donc cette fraction est passée à l'analyse par RMN sans la passer à une purification par HPLC (Fig.29).



Figure 29.Chromatogramme de la fraction F10.

Encore, nous avons choisi la fraction F4 et cette dernière a subi une purification par l'HPLC préparative et elle a donné le chromatogramme suivant (Fig.30), puis les 4 produits obtenus de l'HPLC sont analysés sur CCM (Fig.31).

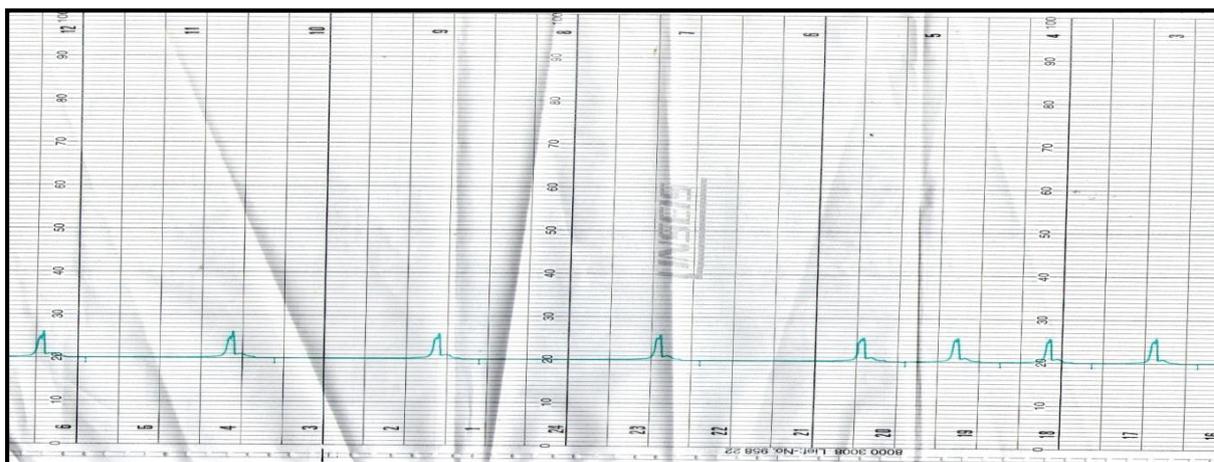


Figure 30.HPLC de la F4.

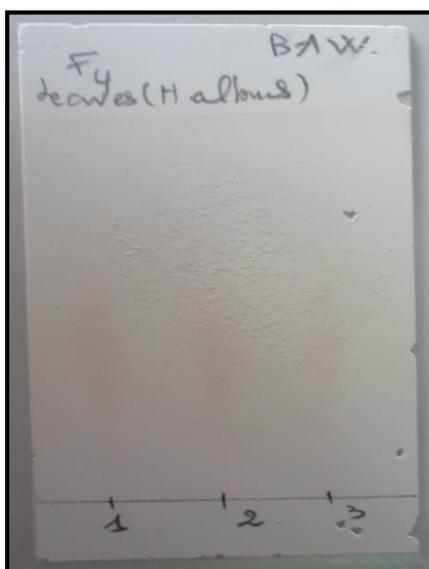


Figure 31. Chromatogramme après HPLC à partir des fractions F4 de *H.albus*.

Après HPLC préparative nous avons obtenu : F4-1 :32 mg, F4-2 :16 mg, F4-3 :32 mg
La fraction F7 a subi à une autre HPLC et a donné le chromatogramme suivant (Fig.32) et les produits obtenus de l'HPLC sont testés sur CCM (Fig.33) :

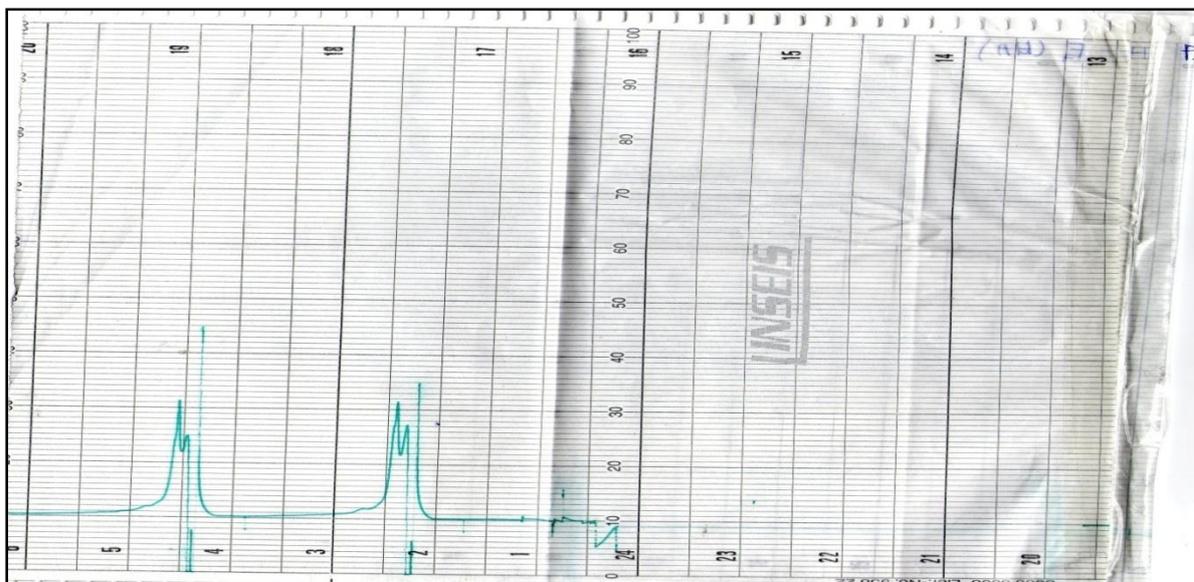


Figure 32. HPLC de la fraction F7 de *H.albus*.

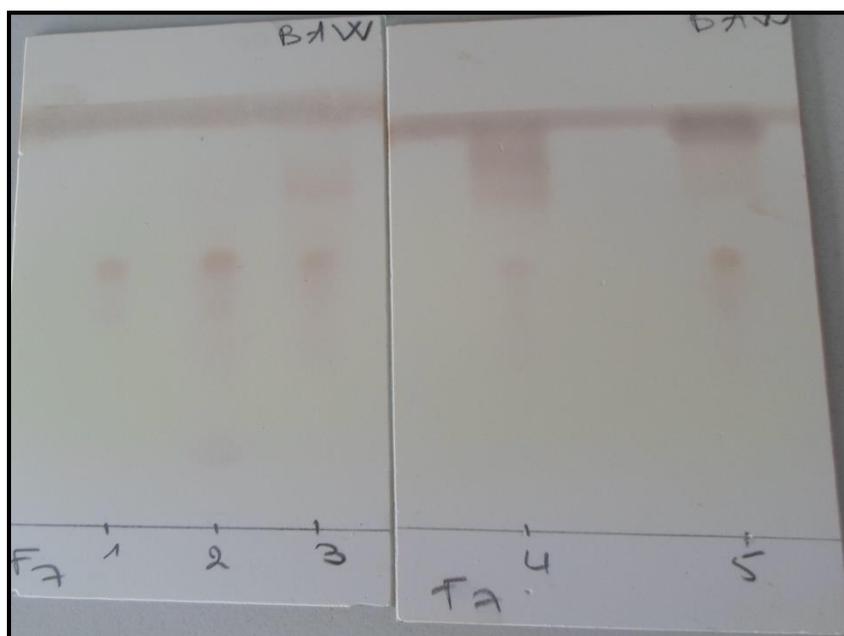


Figure 33. Chromatogramme après HPLC à partir des fractions F7 de *H.albus*.

Après HPLC préparative on obtenu : F 7-1 :2 mg, F 7-2 :6 mg, F 7-3 :32 mg, F 7-4 :4mg ,

F 7-5 :5 mg

Pour la plante *U.rupestris*,

La fraction F10=4 mg est destinée directement vers l'analyse par RMN.

La fraction F4 a subit à une purification par HPLC (Fig.34) puis les produits obtenus sont analysés avec CCM (Fig.35).

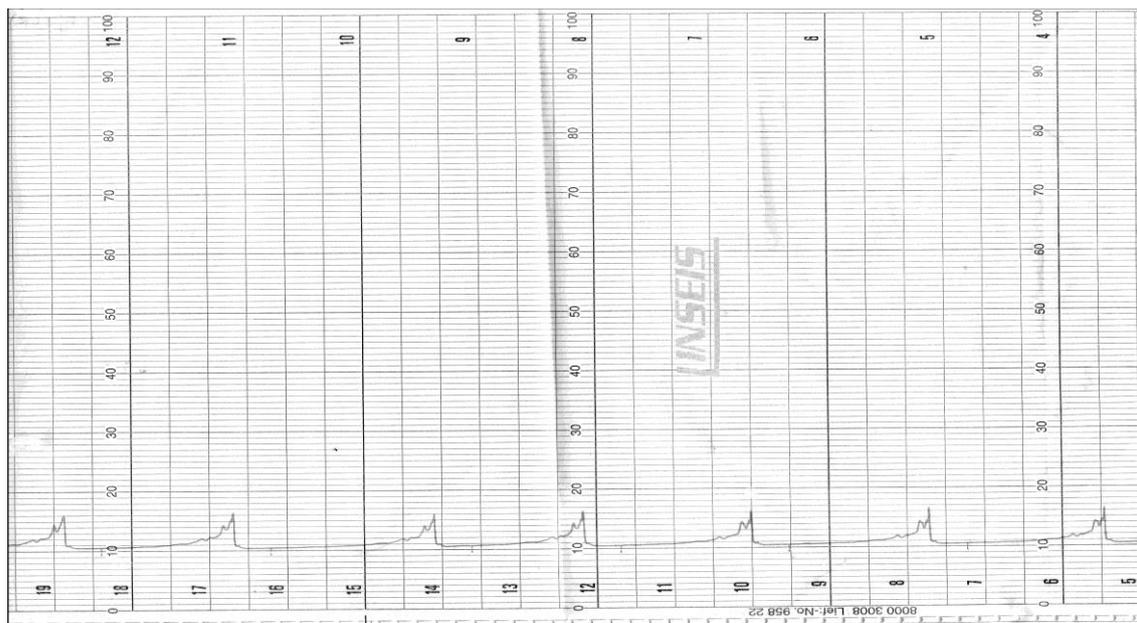


Figure 34. HPLC de la F4 d'*U. rupestris*.

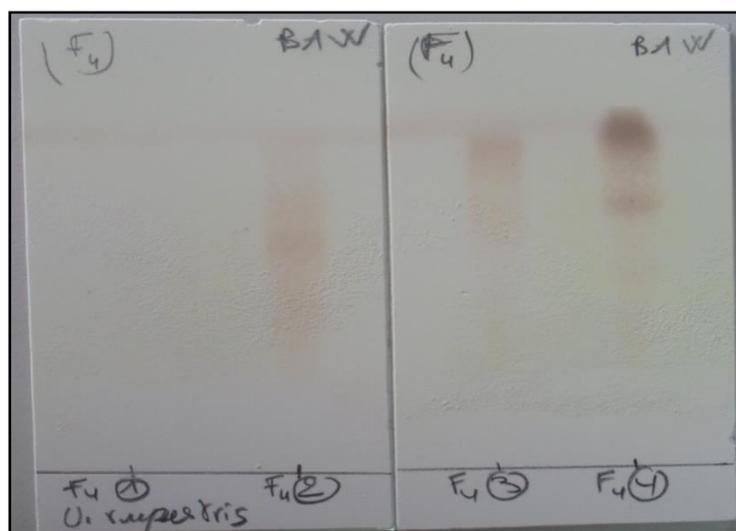


Figure 35. Chromatogramme après HPLC à partir des fractions F4 d'*U. rupestris*.

Après HPLC préparative, nous avons obtenu : F 4-2 : 29 mg , F 4-3 : 14 mg.

II.1.5. Analyse par RMN à proton

Les résultats de l'RMN des produits sont mentionnés dans le tableau 8 est ont donné (Tableau 8).

Tableau 8. Nature des produits obtenus après analyse par RMN à proton.

Produits	Nature
F4-2 de <i>H.albus</i> .	Alcaloïde
F7-1 de <i>H.albus</i> .	Phénol glycosylé
F7-2 d' <i>H.albus</i> .	Phénol glycosylé
F4-1 d' <i>H.albus</i> .	Acide gras
F10 de <i>H.albus</i> .	Phénol glycosylé
F4-3 de <i>H.albus</i> .	Acide gras
F10 d' <i>U.rupestris</i> .	Lignane
F4-3 d' <i>U.rupestris</i> .	Triterpène glycosylé

II.2. Evaluation des activités *in vitro*

II.2.1. Activité cytotoxique

Le cancer est connu médicalement comme une tumeur maligne caractérisée par une croissance incontrôlée de cellules anormales dans le corps. Le cancer peut survenir à la suite d'une défaillance de cette équilibre, en raison d'une augmentation de la prolifération cellulaire ou une diminution dans la mort cellulaire ou les deux [Kerr *et al.*, 1972]. Le cancer est causé par des facteurs endogènes et exogènes qui conduisent à une accumulation séquentielle d'altérations génétiques, un phénomène d'oncogenèse multi-étape [Lee et Park, 2010].

Tableau 9 : Effet cytotoxique de HAMeOH et URMeOH sur les trois lignées cellulaires cancéreuses.

Concentration (µg/ml)	Absorbance à 620 nm			% de viabilité cellulaire			% de l'inhibition de viabilité cellulaire (mortalité)		
	MCF7	HeLa	PC3	MCF7	HeLa	PC-3	MCF7	HeLa	PC-3
HAMeOH (1µg/ml)	0,46	0,65	0,46	89,22	81,8	85,22	10,78	18,20	14,78
HAMeOH (10 µg /ml)	0,41	0,39	0,45	82,22	72,1	81,24	17,78	27,90	18,76
HAMeOH (100 µg/ml)	0,28	0,32	0,28	59,74	55,56	51,11	40,26	44,44	48,89
HAMeOH (200 µg/ml)	0,17	0,20	0,12	35,76	35,21	22,11	64,24	64,79	77,89
URMeOH (1µg/ml)	0,45	0,73	0,42	86,76	91,80	85,22	13,24	8,20	14,78
URMeOH (10 µg /ml)	0,42	0,47	0,43	84,4	87,1	77,24	15,60	12,90	22,76
URMeOH (100 µg/ml)	0,41	0,15	0,40	82,74	80,56	72,11	17,26	19,44	27,89
URMeOH (200 µg/ml)	0,38	0,12	0,35	78,76	73,21	62,11	21,24	26,79	37,89
Mercapto (10 µg/ml)	0,66	0,75	0,60	82,67	94,00	75,22	17,33	6,00	24,78
Mercapto (20 µg/ml)	0,56	0,68	0,48	70,67	85,2	60,22	29,33	14,80	39,78
Mercapto (30 µg/ml)	0,52	0,52	0,38	65,22	66,22	48,24	34,78	33,78	51,76
Mercapto (40 µg/ml)	0,44	0,37	0,31	55,22	47,11	39,22	44,78	52,89	60,78
Mercapto (50 µg/ml)	0,40	0,28	0,22	50,67	36,1	28,1	49,33	63,90	71,90

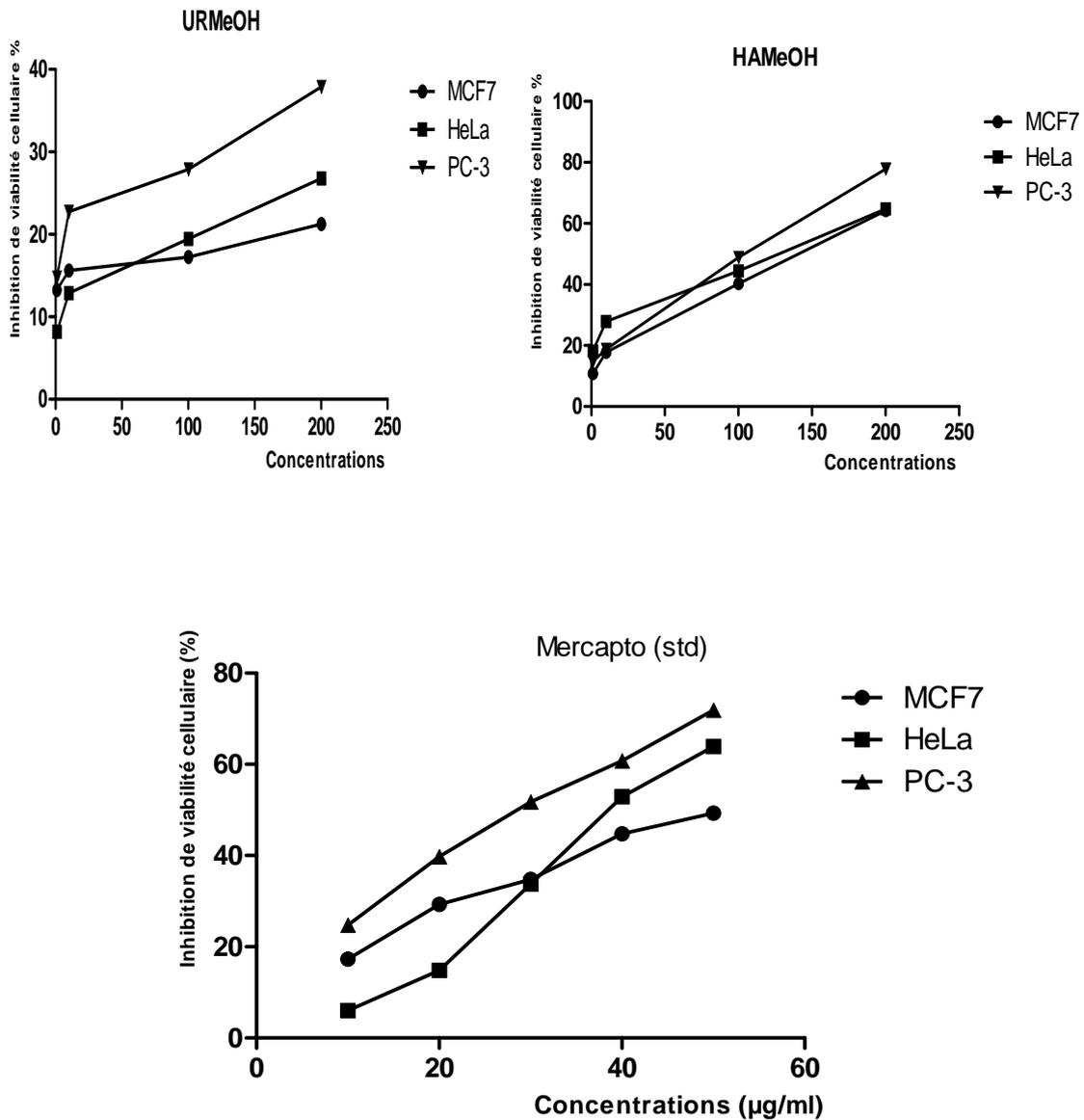


Figure 36. Effet dose dépendant de HAmOH , URMeOH et de Mercapto sur la viabilité des lignées cellulaires MCF7, HeLa et PC-3.

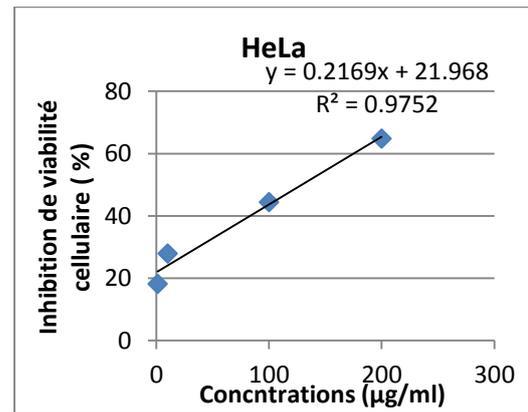
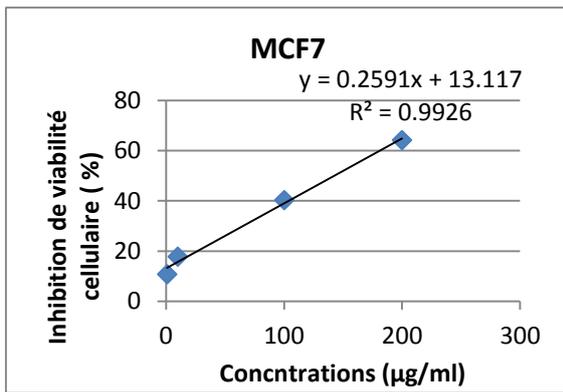


Figure 37. IC50 de HAMEOH sur les MCF7. Figure 38. IC50 de HAMEOH sur les HeLa .

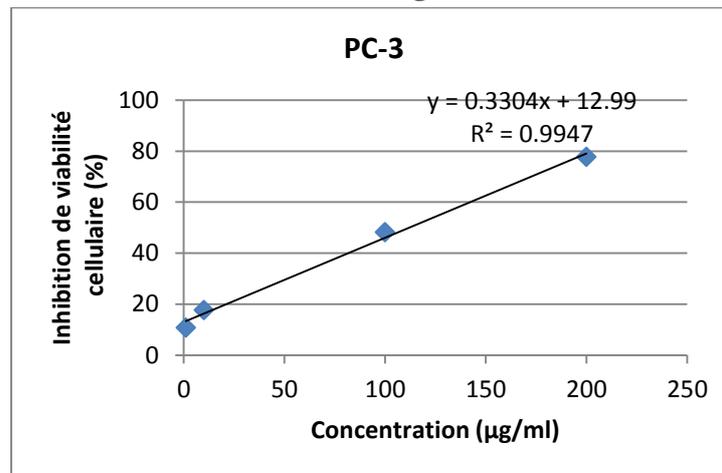


Figure 39. IC50 HAMEOH sur les PC-3.

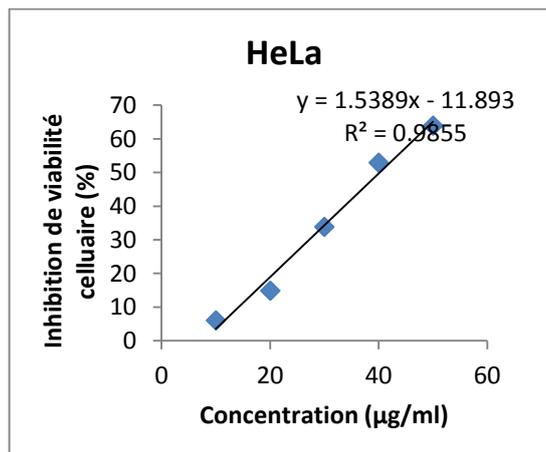
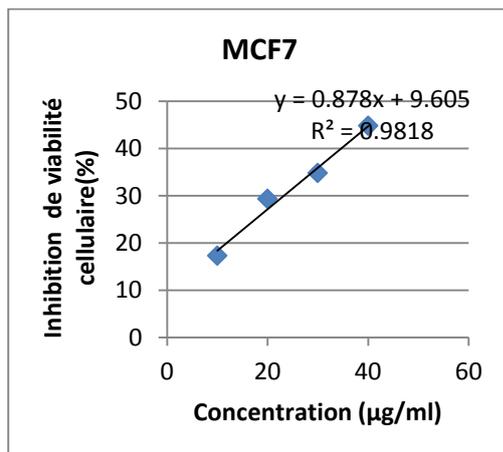


Figure 40. IC50 de Mercapto sur les MCF7. Figure 41. IC50 de Mercapto sur les HeLa.

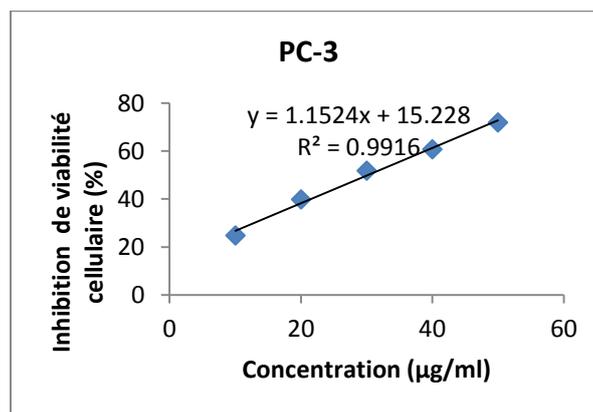


Figure 42. IC₅₀ de Mercapto sur les PC-3.

L'analyse colorimétrique par MTT est basée sur la capacité des enzymes succinate déshydrogénase mitochondriales des cellules vivantes à réduire le substrat hydrosoluble de couleur jaune qui est 3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphényle bromure de tétrazolium (MTT) en produit formazan insoluble coloré en bleu qui est mesuré spectrophotométriquement [Mantani *et al.*, 2001]. Cette méthode a pour but de déterminer le nombre des cellules viables dans l'étude de prolifération et de cytotoxicité [Sylvester, 2011].

Les déshydrogénases mitochondriales produites par les cellules vivantes réduisent le MTT en produit bleu formazan, ce qui reflète la fonction normale des mitochondries et de la viabilité des cellules [Lau *et al.*, 2004].

L'extrait HAMEOH avec la concentration 200 µg/ml montre une meilleure activité anticancéreuse et dose dépendant vis-à-vis aux cellules PC-3 avec une activité de 77.89 % et une IC₅₀ = 112.01 µg/ml (Graphe (Fig.42), suivi par les cellules HeLa où il présente une inhibition 64.79% avec la dose 200 µg/ml avec une IC₅₀ = 129.23 µg/ml (Fig.41) et une inhibition de 64.24 % sur les cellules MCF7 avec une valeur de IC₅₀ = 142.35 µg/ml (Fig.40).

Il a été trouvé que les lignanamides isolés des tiges de *H.niger* ont une activité cytotoxique vis-à-vis aux cellules LNCaP du cancer de la prostate qui sont le Grossamide qui présente un effet cytotoxique avec une IC₅₀ = 33 µM, cannabisin G avec une IC₅₀ = 33 µM et cannabisin D avec une IC₅₀ = 81 µM [Begum, 2010].

La viabilité cellulaire a été diminuée après le traitement par URMeOH par rapport au contrôle négatif qui présente une viabilité de 100% mais la valeur de l'IC₅₀ est non déterminé car le pourcentage d'inhibition n'atteint pas 50 %.

Le mercapto qui est utilisé comme un standard de référence a montré une meilleure inhibition sur les cellules PC-3 qui est 71.90% avec une IC₅₀= 30.17 µg /ml (Fig.42) suivi par les cellules HeLa avec une inhibition 63.90% et une IC₅₀=40.21 µg /ml (Fig.41) et dernièrement un effet d'inhibition de 49.33 % sur les MCF7 avec une IC₅₀=46.01µg/ml (Fig.40).

L'extrait HAMEOH a un effet cytotoxique sur les cellules PC-3 et les cellules Hela similaire à celui du Mercapto mais avec plus d'effet cytotoxique sur les cellules MCF7 par rapport au mercapto avec une différence significative ($P \leq 0.05$).

L'effet cytotoxique de l'extrait HAMEOH est du à sa richesse en polyphénols et en alcaloïdes.

Les polyphénols isolés des différentes plantes ont été considérées comme tueurs dans certain nombre des lignées cellulaires de cancer à différents stades d'évolution du cancer. Les activités anticancéreuses des flavonoïdes étaient décrit dans plusieurs études [**Mavundza et al., 2010 ;Rahman et al.,2011**].

Actuellement, quelques polyphénols isolés tels que le kaempférol, la quercétine, l'anthocyane, l'acide coumarique et l'acide ellagique ont démontré qu'ils inhibent la croissance des lignées cellulaires cancéreuses humaines provenant du sein (MCF-7), de la voie orale (KB, CAL 27), du côlon (HT-29, HCT-116), et de la prostate (LNCaP, DU-145) [**Zhang et al., 2010**].

Les flavonoïdes sont des scavengers très efficaces pour la plupart types de molécules oxydantes, y compris l'oxygène singulet et divers radicaux libres, qui sont peut-être impliqués dans les dommages de l'ADN et la promotion de la tumeur.

L'inhibition des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) par la quercétine a été rapportée par **Gibellini et al., (2010)**.

Actuellement, des recherches sur le potentiel anticancéreux de la quercétine ont exposé sa promesse d'être un agent anticancéreux. Au même temps, *in vitro* et *in vivo*, la quercétine était capable d'inhiber la viabilité des cellules leucémiques, du côlon, des cellules de carcinome de l'ovaire et en particulier les cellules du cancer du sein et d'autres cellules cancéreuses humaines.

Il a été trouvé que la quercétine isolée des différentes plantes a une activité cytotoxique avec la méthode de MTT sur différentes lignées cellulaires. La quercétine inhibe la croissance de MCF7 du cancer du sein avec IC₅₀ = 5.2 µg/ml [**Magdy et al., 2013**], HT-29 lignées du cancer de

colon avec $IC_{50} = 81.2 \text{ mM}$; HeLa du cancer de col de l'utérus avec $IC_{50} = 546.2 \text{ }\mu\text{g/ ml}$ [Murat *et al.*, 2011]; et HCT116 carcinome du colon humain avec $IC_{50} = 20.1 \text{ }\mu\text{g/ ml}$.

Encore, ils ont suggéré que la quercétine peut induire l'apoptose des cellules MCF7 par l'activation d'une cascade de caspase par la voie mitochondriale [Chou *et al.*, 2010; Mozghan *et al.*, 2011]. Encore, la quercétine peut moduler l'activité du récepteur d'œstrogène pour inhiber la croissance des cellules MCF7 [Urmila *et al.*, 2011].

Il a été trouvé aussi que la quercétine peut inhiber la viabilité des cellules HeLa par l'arrêt de la phase G2/M et l'apoptose par la voie mitochondrial par un mécanisme dépendant de la protéine p53 [Vidya *et al.*, 2010].

Dans la présente étude, il est fort possible que notre extrait HAMEOH peut déclencher l'apoptose via deux voies de signalisation : La voie extrinsèque induite par les récepteurs TNFR situés dans la membrane plasmique. Ce récepteur induit la cascade des caspases ce qui conduit la cellule à l'apoptose ou par la voie intrinsèque dirigée par les membres de la famille Bcl-2 tels que Bax, qui induit le relargage du cytochrome *c* et la cascade des caspases ce qui conduit aussi la cellule à l'apoptose [Hengartner ,2000 ; Kok *et al.*, 2005 ; Reuter *et al.*, 2008].

La mitochondrie joue un rôle primordial dans le processus apoptotique [Cory et Adams, 2002]. La voie de la mort mitochondrial est contrôlée par des membres de la famille Bcl-2 [Brunelle et Letai, 2009]. La famille Bcl-2 se compose des membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques [Xiao *et al.*, 2009]. Durant l'apoptose, les protéines pro-apoptotiques de la famille comprenant Bim et Bax peuvent se transférer hors la membrane externe des mitochondries, favorisant le dégagement des facteurs pro-apoptotiques en induisent l'apoptose [Burlacu,2007].

D'une autre part, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comprenant Bcl-2 et Bcl-XL séquestrent dans les mitochondries et empêchent le dégagement des facteurs pro-apoptotiques empêchant par la suite l'apoptose [Burlacu, 2007].

Plusieurs études ont indiqué l'activité cytotoxique importante et anticancéreuse des flavonoïdes [Kanadaswami *et al.*, 2005 ; Čanadanović-Brunet *et al.*,2008] et leur capacité de réduire la prolifération des cellules du cancer de sein [Brusselmans *et al.*,2005] .Ils ont prouvé que l'activité anticancéreuse des flavonoïdes incluent l'inhibition de la croissance des cellules, l'inhibition des activités de protéine kinase et l'induction de l'apoptose [Mosmann , 1983].

Les études précédentes suggèrent qu'il existe une corrélation entre la structure, la position, le nombre, et la nature des substituants des composés phénoliques et leurs effets anticancéreux [Yanez *et al.*, 2004]. Et qu'il existe une interaction directe avec le récepteur l'hydrocarbure arylique, l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase et leur effet pro-apoptotique [Kampa *et al.*, 2004].

D'autres travaux ont suggéré que l'effet antiprolifératif est lié à leur effet anti-oestrogénique de quelques flavonoïdes (isoflavonoïdes, quercétine). Les flavonoïdes peuvent également affecter la signalisation cellulaire et la progression du cycle cellulaire. Par exemple, les flavonoïdes du thé inhibent les voies de signalisation médiés par les facteurs de croissance épidermique et le facteur de croissance dérivé des plaquettes et inhibe l'angiogénèse.

La génistéine et la quercétine inhibent la protéine tyrosine kinase qui est également impliquée dans la prolifération cellulaire [Lamson et Brignall, 2000 ; Crombet *et al.*, 2002]. Encore, il a été montré que l'apigénine, la lutéoline et la quercétine ont pu provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose par un mécanisme dépendant de p53 [Marchand, 2002].

II.2.2. Activité antimicrobienne

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques des feuilles des plantes *H.albus* et *U.rupestris* par la méthode de diffusion en milieu solide et la microdilution en milieu liquide.

II.2.2.1. Méthode de diffusion en milieu solide

Les résultats du screening antimicrobien des extraits des deux plantes sont reportés dans la figure 43.

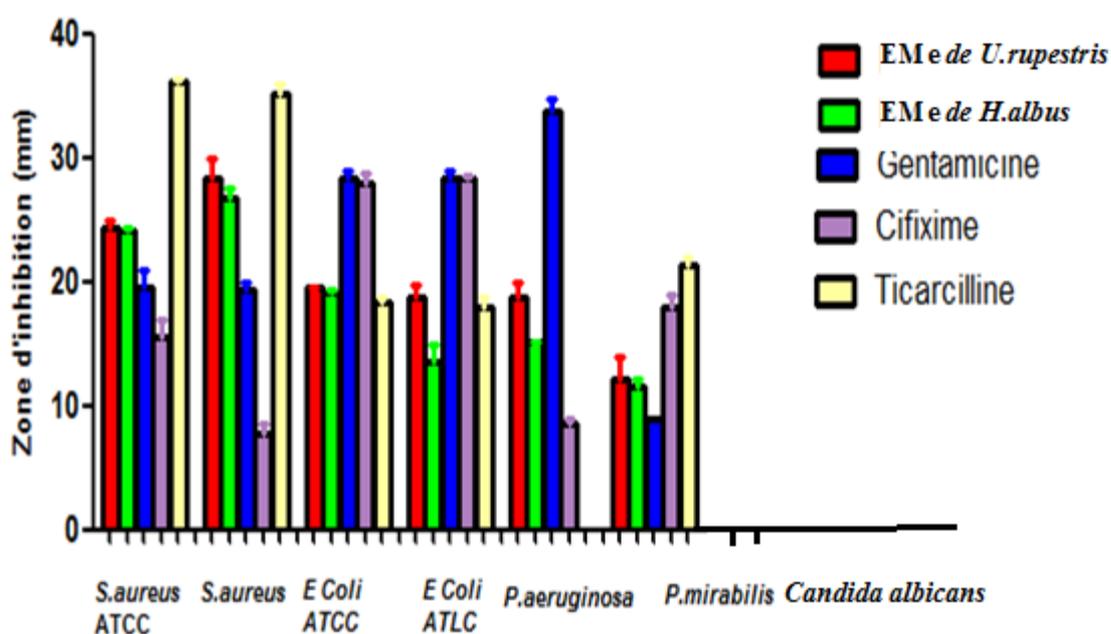


Figure 43.Activité antimicrobienne des extraits EMe de *H. albus* et EMe d'*U.rupestris* exprimés en diamètres de zones d'inhibition (mm).

Nous avons observé que les différentes souches bactériennes étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés, même s'il s'agit de deux souches d'une même espèce bactérienne comme : *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* clinique, ce qui montre le caractère mutagène de ces souches qui leur permet d'acquérir la résistance aux antibiotiques. Les *Pseudomonas* ont montré une multirésistance ce qui confirme les résultats trouvés par **Ferjani et al., (2007)**.

D'après la figure 42, les extraits polaires EMe d' *H.albus* et EMe d'*U. rupestris* ont montré une activité antimicrobienne avec toutes les souches microbiennes sauf la levure *Candida albicans*.

Comme a été rapporté dans la littérature, un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm [**Sagdiç, 2003**].

Il apparaît que le *S. aureus* Gram + est la bactérie la plus susceptible en comparaison avec les autres souches Gram- ; ce ci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram + et les bactéries Gram- [**Kelmanson et al., 2000**].

La paroi cellulaire des bactéries Gram + est constituée par une seule couche alors que la paroi cellulaire des Gram - a une structure multicouche liée à une membrane cellulaire externe [**Nikaido and Vaara, 1985**].

H.albus est très riche en alcaloïdes, d'où son activité antibactérienne d' EMe de *H.albus* peut être due à l'action synergique des polyphénols et des alcaloïdes.

Karou et al. (2005), ont montré aussi que les alcaloïdes sont connus par leurs propriétés anti microbiennes et anti-parasitaires.

Il a été révélé que certains constituants chimiques comme les tanins et les flavonoïdes servent de moyens de défense vis-à-vis de nombreux micro-organismes, et l'activité antibactérienne des flavonoïdes est probablement dûe à leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires de la paroi cellulaire bactérienne [**Doss et al., 2011**].

Théoriquement, les flavonoïdes et les alcaloïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase en inhibant la multiplication bactérienne. Une étude récente a montré l'effet bactéricide de certains flavonoïdes sur *S. aureus* [**Sato et al., 1995 ; Hatano et al., 2005**].

II.2.2.2.Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Nous rapportons dans la figure 44 les concentrations minimales inhibitrices (CMI) dans les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, dont les diamètres d'inhibition sont ≥ 12 mm.

Les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenues avec la méthode des disques en milieu solide.

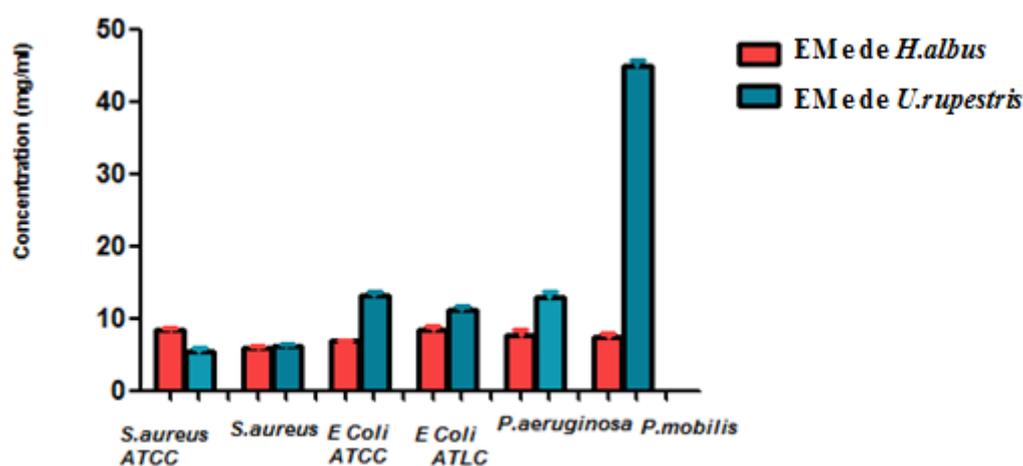


Figure 44. Activité antimicrobienne *in vitro* des extraits méthanoliques d'*H.albus* et *U.rupestris* respectivement exprimée en concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg / ml) contre les bactéries testées.

Ces résultats montrent qu'EMe d'*H. albus* a un effet sur toutes les souches bactériennes étudiées suivantes : *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus*, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* avec des valeurs de CMI: 8.30 mg /ml, 6.00 mg /ml, 6.93 mg /ml, 8.32 mg /ml, 7.63 mg /ml ,7.53 mg /ml respectivement avec le même effet sans différence significative ($P \geq 0.05$).

L'EMe d'*U. rupestris* a un effet sur toutes les souches bactériennes suivantes *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus*, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. Mirabilis* avec des valeurs de CMI : 5.43 mg /ml, 6.18 mg /ml, 13.22 mg /ml, 11.22 mg /ml, 12.88 mg /ml, 44.82 mg /ml respectivement.

L'EMe des feuilles d'*U. rupestris* a le même effet sur les souches *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* (Gram +) avec des valeurs de CMI de 5.43 mg/ml et 6.18 mg/ml respectivement sans différence significative ($P \geq 0.05$). Tandis que ces derniers restent significativement inférieurs aux CMI des bactéries : *E. coli* ATCC 5922, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. Mirabilis* (bactéries à Gram-), ceci revient à la différence dans la composition de la membrane plasmique.

La démonstration de l'activité antibactérienne contre les bactéries Gram+ et Gram - peuvent être le signe de la présence d'un principe actif à large spectre et ça sera un grand avantage dans la lutte contre de nombreux agents pathogènes très fréquents ces derniers temps [Doughari ,2006].

Alghazeer *et al.* (2012) ont montré que EMe de *H. albus* a une valeur plus faible de CMI (0,156 mg / ml) sur les souches Gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*), cette valeur est inférieure à celle trouvée dans notre étude. Ce même auteur a trouvé que l'extrait alcaloïdique d' *H. albus* a montré une activité remarquable sur *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella typhi* avec des valeurs de CMI (0, 156, 0, 313 et 0,313 mg/ml) respectivement. Il est fort probable que la toxicité de cette plante est principalement liée à la forte teneur en alcaloïdes.

II.2.3. Tests d'activité antioxydante

II.2.3.1. Méthode de blanchissement de β - carotène (BBC)

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits (EEp,EChl et EMe) des deux plantes est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (disparition de sa couleur) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique ($C_{18} : 2\Delta^{9,12}$) selon la méthode décrite par Kartal *et al.* (2007).

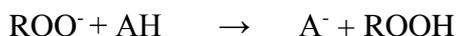
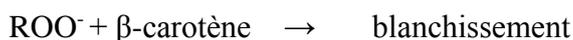
Dans le système β -carotène / acide linoléique, le β -carotène subit une décoloration rapide en absence d'un antioxydant. Les radicaux libres de l'acide

linoléique formés lors de la production d'un atome d'hydrogène à partir de l'un de ses groupes méthylène diallyliques, ces radicaux libres attaquent la β -carotène hautement insaturée. En conséquence, la β -carotène est oxydée et décomposée en partie; ensuite elle perd sa caractéristique de couleur orange, qui est mesurée par spectrophotométrie à 470 nm [Miladi et Damak, 2008 ; Rufino *et al.*, 2010].

Dans cet essai, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des hydroperoxydes diène conjugué résultant de l'oxydation des acides linoléiques. La β -carotène subit une décoloration rapide en absence d'un anti-oxydant, cependant la présence d'un anti-oxydant minimise son oxydation. Ce test mesure le potentiel des composés de la plante pour inhiber la formation d'hydroperoxyde diène conjugué durant l'oxydation de l'acide linoléique [Kadri *et al.*, 2011].

Il a été montré que l'antioxydant transfère des atomes d'hydrogène aux peroxydes (R_1R_2CHOO) formés au cours de l'oxydation de l'acide linoléique et les convertit en hydroperoxydes (R_1R_2CHOOH) laissant les molécules de β -carotène intactes et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène [Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Liu *et al.*, 2010].

Selon Terpinic *et al.*, (2009), les antioxydants font une concurrence avec la β -carotène pour les radicaux de peroxy et les réactions suivantes devaient être considérées pour se produire :



Lai et Lim (2011) ont observé que l'activité antioxydante par BBC a augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

La cinétique de BBC en absence et en présence des extraits (EEp, EChl et EMe) d'*H. albus* et d'*U. rupestris*, de l'antioxydant standard (α -Tocophérol) est représentée dans les figures 45 et 46.

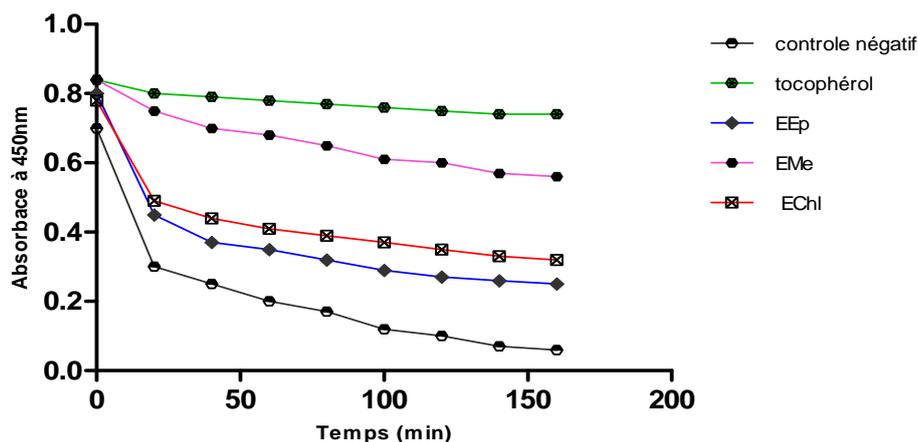


Figure 45. Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par les extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles d'*H. albus*.

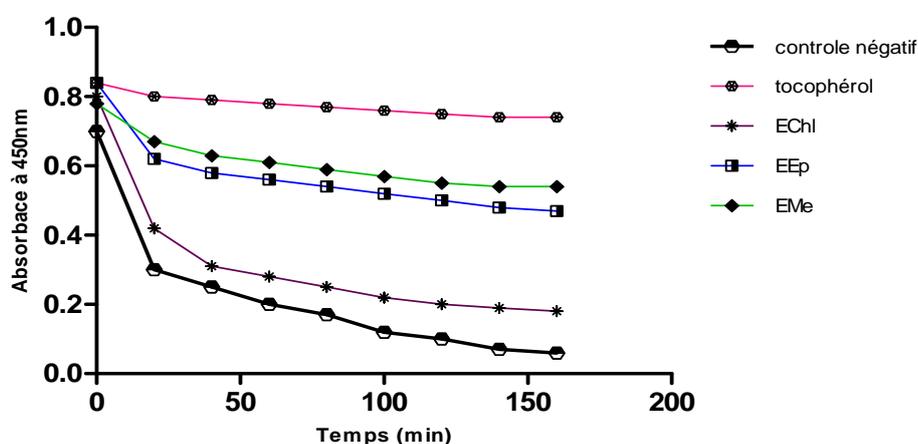


Figure 46. Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par les extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles d'*U. rupestris*

Le tableau 10 rapporte les valeurs moyennes de trois mesures d'AAR% \pm SD calculées à partir de la formule rapportée dans la partie matériel et méthodes, ces valeurs facilitent la comparaison de l'activité relative des différents extraits, du contrôle positif (α -tocophérol) et du contrôle négatif.

Tableau 10. Activité antiradicalaire des extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles d'*H. albus* et *U. rupestris* et du contrôle positif

Extraits et contrôle	AAR %
EEp (<i>H. albus</i>)	33.78 ± 1.28***
EChl (<i>H. albus</i>)	43.24 ± 0,92***
EMe (<i>H. albus</i>)	76.00 ± 0,92***
EEp (<i>U. rupestris</i>)	63.51 ± 1.28***
EChl (<i>U. rupestris</i>)	24.32 ± 0,92***
EMe (<i>U. rupestris</i>)	72.97 ± 0,92***
α-tocopherol	100 ± 0,00***
Contrôle (-)	00.00 ± 1,28

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± SD. Les comparaisons sont faites par rapport au contrôle négatif. ***P≤0.0001

D'après ces résultats, il est clair que tous les extraits testés d'*H. albus* et d'*U. rupestris* inhibent d'une manière hautement significative ($P \leq 0,0001$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène par rapport au contrôle négatif qui représente presque 100 % de la peroxydation.

Pour les extraits des deux plantes, l'inhibition la plus élevée a été fournie par l'EMe d'*H. albus* (76.00 %), suivie par l'EMe d'*U. rupestris* (72.97 %) sans différence significative entre ces deux extraits ($P \geq 0.05$).

L'EEp d'*U. rupestris* a montré une activité inhibitrice intermédiaire (63.51 %), l'EChl (43.24 %), et en dernier, c'est l'EChl d'*U. rupestris* qui représente la valeur inhibitrice la plus faible (24.32 %).

On peut donc résumer l'ordre décroissant des extraits testés en terme d'activité anti oxydante relative comme suit : α- tocophérol > EMe (*H. albus*) > EMe (*U. rupestris*) > EEp (*U. rupestris*) > EChl (*H. albus*) > EEp (*H. albus*) > EChl (*U. rupestris*).

Malgré cette inhibition, l'activité des extraits des feuilles d'*H. albus* et d'*U. rupestris* reste significativement inférieure ($P \leq 0,05$), par rapport au contrôle positif (α- tocophérol).

L'activité antioxydante des extraits polaires EMe de *H. albus* et EMe d'*U. rupestris* pourrait s'expliquer par leurs richesses en substances phénoliques. De nombreuses études ont montré les propriétés anti oxydantes des flavonoïdes et des tanins [Bruneton, 1999].

Les extraits polaires sont surtout riches en substances chimiques hydrosolubles, leur activité antioxydante démontrée par la méthode (BBC), peut être due surtout à la présence des composés phénoliques présents dans ces extraits, ce qui est confirmé par la corrélation linéaire notable et significative observée ($R^2=0.9999$, $p<0.05$) entre leur teneur en polyphénols et leur pouvoir antioxydant.

Comme dans le cas de l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs : la concentration de l'extrait, la méthode d'évaluation, la sensibilité des anti oxydants à la température du test et à la nature des extraits [Kadri *et al.*, 2011]. L'effet antioxydant de l'extrait peut également présenter un intérêt biologique car il peut empêcher l'oxydation des composants lipidiques dans les membranes cellulaires, par conséquent, l'extrait végétal peut se révéler bénéfique pour la santé [Baghiani *et al.*, 2010].

II.2.3.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles d'*H. albus* et d'*U. rupestris* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 515 nm.

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par leur activité inhibitrice dans une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 515 nm. Le standard utilisé était le α - tocophérol.

Les IC50 des différents extraits des feuilles d'*H. albus* et d'*U. rupestris* ainsi que le standard sont illustrées dans le tableau 11 ainsi que dans les figures 47 et 48 respectivement

Tableau 11. Activité antiradicalaire des extraits d'*H. albus* et *U. rupestris* .

Extracts and standards	IC50 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
EEp (<i>H. albus</i>)	-
EChl (<i>H. albus</i>)	330.19 ± 1.149
EMe (<i>H. albus</i>)	75.19 ± 0.211
EEp (<i>U. rupestris</i>)	610.34 ± 0.153
EChl (<i>U. rupestris</i>)	135.97 ± 0.584
EMe (<i>U. rupestris</i>)	35.33 ± 0.136
α -Tocopherol	15.08 ± 0.112

D'après les figures 59 et 60, nous avons constaté que les extraits des feuilles d'*H. albus* et *U. rupestris* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées.

Selon **Kadri et al. (2011)**, une valeur plus faible de l'IC₅₀ (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée.

L'activité antiradicalaire de l'EEp des feuilles d'*H. albus* n'a pu être réellement quantifiée car aux concentrations maximales testées, il ne capte pas plus de 40 % du DPPH. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits EChl (*H.albus*), EMe (*H.albus*), EEp (*U.rupestris*), EChl (*U.rupestris*) et EMe (*U.rupestris*) possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante.

La comparaison des extraits EMe (*U.rupestris*), EMe (*H.albus*), EEp (*U.rupestris*), EChl (*U.rupestris*) et l'EChl (*H.albus*) révèle que l'EMe (*U.rupestris*) représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ = 35.33 µg/ml suivi par l'EMe (*H.albus*) avec une IC₅₀ de l'ordre de 75.19 µg/ml. Tandis que l'EEp (*U.rupestris*) représente l'activité antiradicalaire la plus faible (IC₅₀ = 610 µg/ml).

Dans notre étude nous avons utilisé le α -tocophérol comme un antioxydant standard, ce dernier a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une IC₅₀ de l'ordre de 15.08 µg/ml.

En comparaison avec le α -tocophérol, les extraits testés s'avèrent moins actifs : l'EMe (*U.rupestris*), l'EMe (*H.albus*), EChl (*U.rupestris*), EChl (*H.albus*) et EEp (*U.rupestris*) sont respectivement 2.34 ,4.98 ,9.00, 21.29 et 40.47 moins actifs que le α -tocophérol.

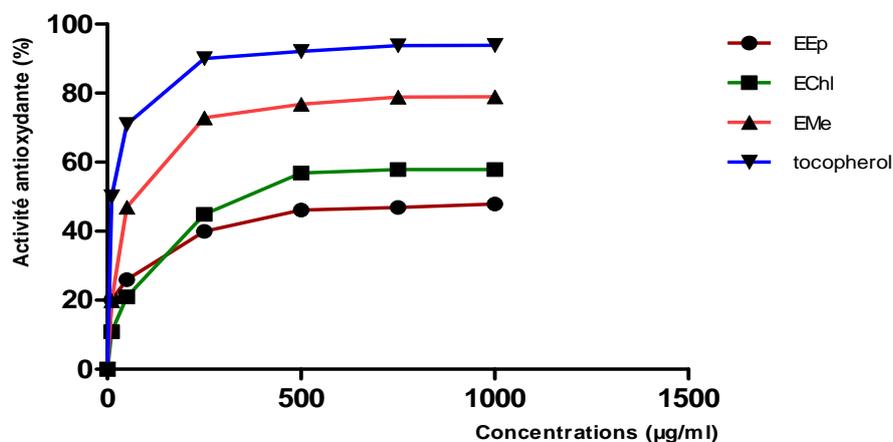


Figure 47. Activité antiradicalaire des extraits (EEp,EChl et EMe) des feuilles de *H.albus*.

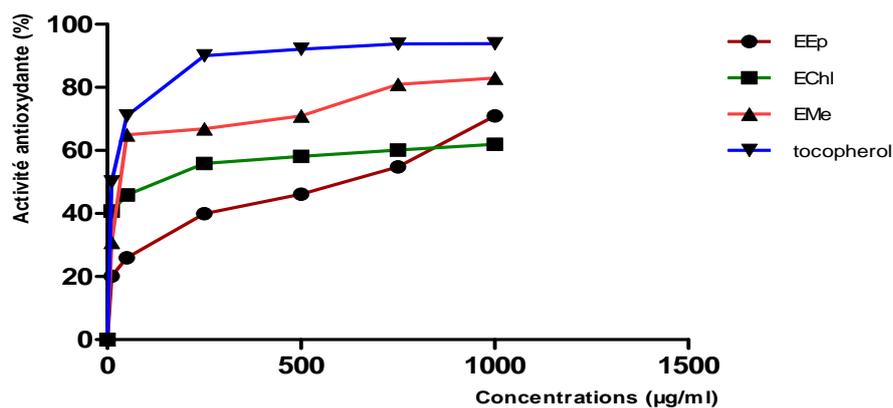


Figure 48. Activité antiradicalaire des extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles d'*U. rupestris*.

Alghazeer et al. (2012) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'*H. albus* donne une IC50 de 60.4 ± 1.1 qui est supérieur à celui qu'on a constaté dans notre étude ($IC_{50} = 35,33 \pm 0,136 \mu\text{g/ml}$).

Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres [**Roudsari et al., 2009**]. L'activité antiradicalaire des extraits EMe (*H. albus*) et EMe (*U. rupestris*) est probablement liée à leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins.

Ils a été suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire [**Yang et al., 2008**].

II-3. Activités pharmacologiques (*in vivo*)

II. 3.1. Test de toxicité

II. 3.1.1. Test de toxicité aigue

La toxicité aigue est la capacité d'une substance toxique de causer des effets via une seule administration pendant une courte durée [**Walum ,1998**].

Dans cette étude, l'administration par voie orale des doses (100, 200, 500, 1000, et 2000 mg kg⁻¹p.c) de HAMEOH n'induit aucun signe visible de toxicité ou mort instantanée chez les rats testés au cours de la période d'observation.

Encore, l'administration par voie orale d'URMeOH avec cette gamme de doses (jusqu'à 2000 mg kg⁻¹) n'induit aucun signe visible de toxicité ou mort chez les rats testés au cours de la période d'observation (Tableau 12).

Tableau 12: Détermination de LD50 de HAMEOH et URMeOH par la méthode arithmique de Karbar [Turner, 1965].

Groupes	Nombre des rats	Nbre d'animaux décédés	différence de dose (a)	Moyenne de mortalité (b)	Probit (a×b)
Groupe contrôle (eau distillée)	6	0
HAMEOH 100 mg /Kg	6	0	100
HAMEOH 200 mg/ Kg	6	0	300
HAMEOH 500 mg / Kg	6	0	500
HAMEOH 1000 mg/ Kg	6	0
HAMEOH 2000 mg / /Kg	6	0	1000
URMeOH 100 mg/Kg	6	0	100
URMeOH 200 mg/Kg	6	0	100
URMeOH 500 mg/Kg	6	0	300
URMeOH 1000 mg/Kg	6	0	500
URMeOH 2000 mg/Kg	6	0	1000

La LD50 est calculée comme suit:

LD50=LD100- (a X b /N) Ou :

LD50= la dose qui cause la mortalité de 50 % des animaux.

LD100= la dose qui cause la mortalité de 100 % des animaux (dans ce cas est >2000 mg /Kg p.c.)

N= nombre d'animaux par groupe.

a X b = différence de dose multiplie par la moyenne de mortalité.

LD50= (>2000) – (X 0/6)

= >2000 - 0

= > 2000 mg /Kg p.c.

Donc la LD50 est > 2000 mg /Kg p.c. pour les deux extraits HAMEOH et URMeOH.

L'évaluation de la toxicité aigue est la première étape dans l'investigation toxicologique des substances inconnues. L'index de la toxicité aigue est la LD50. La classification des substances toxiques par voie orale a été faite selon [OECD, Paris, France] selon cette classification : très toxique (<5 mg /kg); toxique (>5<50 mg /kg) ; nocif (>50<500 mg /kg p.c) et non toxique (>500<2000 mg / kg p.c) [Walum ,1998]. La LD50 a été trouvé supérieur à 2000 mg /Kg p.c pour l'extrait méthanolique des feuilles d'*H.albus* et *U.rupestris* est donc c'est une indication que ces extraits sont relativement non toxiques par la voie orale.

II. 3.1.2. Test de toxicité subaigüe

La toxicité subaigüe est la capacité d'une substance toxique de causer des effets via plusieurs administrations pendant une durée de un à trois mois [Walum, 1998].

Dans la toxicité subaigüe, les 1/20 ième et 1/10 Ième de safe dose (2000 mg/Kg p.c) trouvée dans le test de toxicité aigüe ont été choisis comme des doses thérapeutiques (des doses qui seront testées dans la toxicité subaigüe) qui sont 100 mg /Kg p.c. et 200 mg /Kg p.c.

Les résultats montrent qu'il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) dans les poids corporels, et le poids d'organes des lots traités avec HAMEOH (100 et 200 mg/Kg p.c.) après 28 jours de traitement par rapport aux lots témoins (Tableau 13).

Le bilan biochimique des groupes traités avec HAMEOH et du contrôle sont présentés dans le tableau 14. Aucune différence significative n'a été constatée ($P > 0,05$) dans les paramètres biochimiques analysées après 28 jours durant le traitement avec les doses thérapeutiques (100 et 200 mg /Kg p.c) par rapport au contrôle, sauf une élévation d'une façon significative du taux d'urée et de la créatinine ($P < 0,001$) qui a été révélée chez les groupes traités avec le HAMEOH (100 et 200 mg / kg p.c).

Il n'y avait pas d'effet sur les niveaux d'indicateurs de foie tels que (ALAT), (ASAT), (ALP) et la BT. Ces résultats démontrent que l'extrait de *H.albus* n'a pas provoqué de dommages du foie, ce qui a été confirmée par l'observation histologique de cet organe. Mais l'histologie rénale a montré la présence d'un granulome macrophagique périvasculaire chez les groupes traités avec (100 et 200 mg / kg) ce qui est compatible avec le bilan biochimique, ce qui est traduit par l'élévation du taux d'urée et de la créatinine dans le bilan biochimique. Nos résultats sont conformes avec notre évaluation histologique (Figure 49 et 50).

Les transaminases ASAT et ALAT sont des biomarqueurs pour prévoir la toxicité des extraits vis-à-vis au foie et leur élévation indique un mal fonctionnement du foie. Ainsi que d'urée et de la créatinine sont des bons indicateurs de la toxicité rénale [Nirmal et al., 2013].

Les paramètres hématologiques (HGB, GR, GB, HCT, PLT, VGM, CCMH, les neutrophiles, les basophiles, les lymphocytes, les éosinophiles et les monocytes) n'ont pas montré aucune altération significative ($P \geq 0,05$) chez les groupes traités avec HAMEOH par rapport au contrôle normal (Tableau 15).

Tableau 13 : Effet de HAmEoH et URMeOH sur le poids corporel et le poids des organes dans la toxicité subaiguë chez les rats.

	Contrôle (eau distillée)	HAmEoH (100 mg/Kg p.c)	HAmEoH (200 mg/Kg p.c)
Poids corporel			
Initiale	131.7 ± 1.52	132.3 ± 1.52	132.7 ± 2.51
Finale	175.0 ± 3.00	177.7 ± 2.88	175.7 ± 5.85
Poids d'organes			
Foie	10.63 ± 0.57	10.67 ± 0.17	11.11 ± 0.63
Reins	1.20 ± 0.047	1.15 ± 0.055	1.073 ± 0.065
Pancréas	1.040 ± 0.079	1.14 ± 0.005	1.06 ± 0.065
Coeur	0.82 ± 0.070	0.82 ± 0.026	0.85 ± 0.55

résultats sont la moyenne ± s.d. (n=6).La comparaison est faite par rapport au contrôle. Pas de différence significative (P>0.05).

Tableau 14 : Effet de HAmEoH sur les paramètres biochimiques dans la toxicité subaiguë chez les rats.

Paramètres	Groupe Controle	Groupe traité HAmEoH	
		100 mg/kg p.c	200 mg/kg p.c
Glucose (g/L)	1.21±0.23	1.21±0.11	0.87±0.13
Urée (g/L)	0.36±0.05	0.79 ±0.11**	0.83±0.08**
Créatinine (mg/L)	6.73±1.04	21.99 ±0.46**	29.98±2.16**
Cholestérol (g/L)	0.77±0.09	0.79±0.10	0.66± 0.17
Triglycérides (g/L)	0.60±0.18	0.63±0.11	0.60 ± 0.07
ASAT (U/L)	138.7±3 .16	148.0±7.70	137.0±5.71
ALAT(U/L)	37.00±2.16	35.75±1.25	31.25±2.50
ALP (U/L)	261.5±11.09	250.98±20.20	266.5±18.27
BT (mg/L)	0.85±0.08	0.55±0.11	0.69±0.21

Les résultats sont la moyenne ± s.d. (n=6).La comparaison est faite par rapport au contrôle. *P < 0.05 et **P < 0.001.

Tableau 15: Effet de HAMEOH sur les paramètres hématologiques dans la toxicité subaiguë chez les rats Wistar.

Paramètres	Groupe Contrôle	Groupes traités avec HAMEOH	
		100 mg/kg p.c	200 mg/kg p.c
GR ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	8.273 \pm 0.57	7.657 \pm 0.60	8.33 \pm 0.15
HGB (g/dL)	13.03 \pm 0.45	13.50 \pm 0.30	12.97 \pm 0.37
HCT (%)	38.20 \pm 0.70	39.53 \pm 2.76	38.90 \pm 1.3
PLT ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	327.3 \pm 26.63	254.00 \pm 4.42 **	304.3 \pm 6.02
CCMH (g/dL)	31.94 \pm 2.50	36.11 \pm 3.32	29.12 \pm 0.21
GB ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	6.153 \pm 0.08	5.970 \pm 0.11	6.230 \pm 0.13
VGM (fl)	44.89 \pm 1.38	44.59 \pm 1.51	47.42 \pm 4.00
Neutrophiles (%)	20.54 \pm 1.73	20.12 \pm 1.20	21.81 \pm 0.57
Eosinophiles (%)	1.537 \pm 0.57	2.38 \pm 0.10	2.56 \pm 0.49
Basophiles (%)	00.00 \pm 0.00	00 .00 \pm 0.00	00.00 \pm 0.00
Lymphocytes (%)	77.04 \pm 4.43	71.39 \pm 7.05	73.16 \pm 3.62
Monocytes (%)	1.85 \pm 0.07	1.94 \pm 0.17	1.72 \pm 0.11

Les résultats sont la moyenne \pm s.d. (n=6). La comparaison est faite par rapport au contrôle (n=6). **P < 0.001.

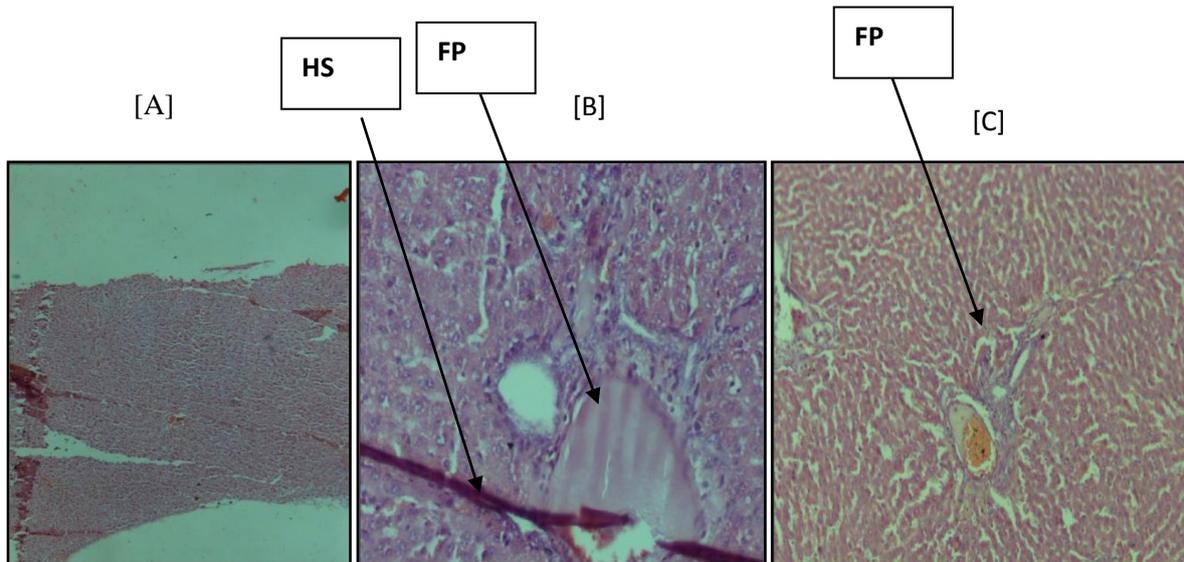


Figure 49. Histologie du foie des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles d *H.albus* [A] groupe contrôle, [B] groupe traité avec HAMEOH [100 mg/kg p.c.] : discrète (FP : fibrose portale + HS : hémorragie sinusoïdale), [C] groupe traité avec HAMEOH [200 mg/kg p.c.] : une discrète fibrose portale. Les sections du foie colorées par hématoxyline et l'éosine (100X).

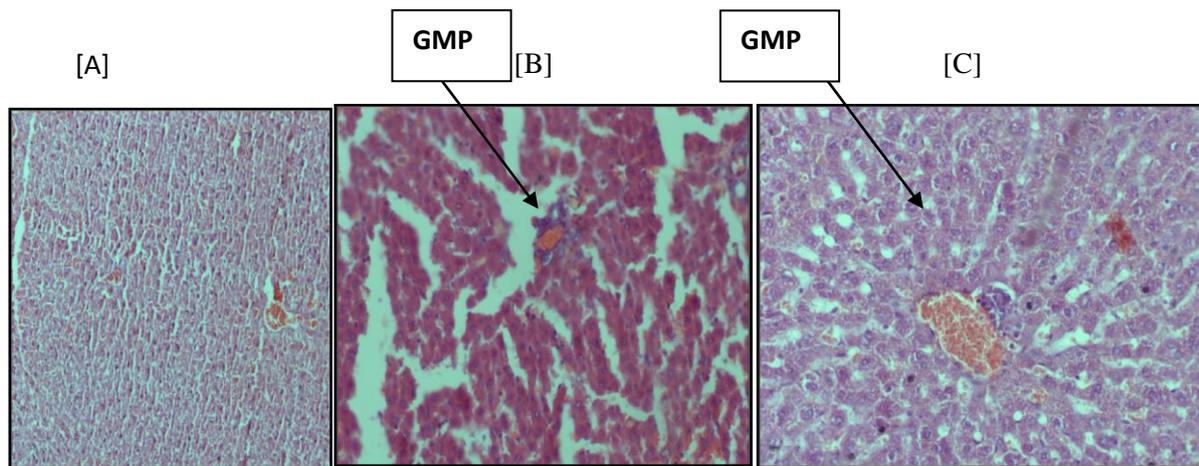


Figure 50. Histologie des reins des groupes traités avec l'extrait méthanolique des feuilles de *H.albus* [A] groupe contrôle, [B] groupe traité avec HAMEOH [100 mg/kg p.c.] : GMP : granulome macrophagique perivascularaire, [C] groupe traité avec HAMEOH [200 mg/kg p.c.] : GMP: granulome macrophagique perivascularaire . Sections des reins colorées par l'hématoxyline et l'éosine (100X).

En ce qui concerne la toxicité subaiguë, l'URMeOH n'a pas montré aucun décès pendant la période de traitement avec les doses thérapeutiques (pendant 28 jours) ni pour le groupe contrôle ni pour les groupes traités. Les animaux n'ont pas montré de changements dans le comportement général ou d'autres activités physiologiques.

Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) dans les poids corporelles et les poids d'organes entre les animaux du groupe contrôle et les groupes traités après 28 jours de traitement (Tableau 16).

Les analyses biochimiques après l'administration d'URMeOH (100 et 200 mg/Kg p.c.) ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation significative ($P \geq 0,05$) dans les différents paramètres biochimiques: glucose (g /L), Urée (g /L), la créatinine (mg /L), Cholestérol (g /L), TG (g/L), ALP (U/L), ASAT (U/L), ALAT(U /L) et BT (mg/L) chez les différents groupes d'animaux traités avec l'extrait (100 et 200 mg / kg p.c) par rapport au contrôle (Tableau 17).

Comme il n'y a pas d'aucun changement au niveau du taux de glucose et de cholestérol ceci témoigne qu'URMeOH n'a aucun effet sur le métabolisme des lipides et les hydrates de carbone chez les rats [Hilaly *et al.*, 2004].

Pour la toxicité du foie, les transaminases, ASAT, et ALAT sont considérés de bons indicateurs et de bons biomarqueurs de la fonction du foie [Hilaly *et al.*, 2004].

L'estimation hématologique a montré qu'il n'y a aucun changement au niveau des paramètres hématologiques ($P > 0,05$) (HGB), (GR), (GB), (HCT), (PLT), (VGM), (CCMH), les neutrophiles, les basophiles, les lymphocytes, les éosinophiles et les monocytes chez tous les groupes traités par rapport au groupe contrôle (Tableau 18).

Le système hématopoïétique est très sensible aux substances toxiques et il très important dans la physiologie de l'être animal ainsi que de l'être humain [Adeneye et Adokiye, 2008].

Après l'étude histopathologique, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de changements histopathologiques après l'administration d'URMeOH avec les doses (100 mg /Kg et 200 mg /Kg p.c.) chez les rats après une période de 28 jours en comparant avec le contrôle négatif et ce qui est conforme avec le bilan biochimique et hématologique (Figure 51 et 52).

Tableau 16 : Effet d'URMeOH sur le poids corporel et le poids des organes (g) sur les rats dans la toxicité subaigüe.

	Contrôle (eau distillée)	URMeOH (100 mg/Kg p.c)	URMeOH (200 mg/Kg p.c)
Poids corporel			
Initiale	174.0 ± 3.0	173.7 ± 1.52	174.3 ± 1.52
Finale	241.3 ± 2.51	244.0 ± 3.05	241.7 ± 1.52
Poids des organes			
Foie	11.65 ± 0.01	11.54 ± 0.03	11.57 ± 0.07
Reins	1.21 ± 0.01	1.26 ± 0.02	1.28 ± 0.03
Pancreas	1.08 ± 0.01	1.11 ± 0.00	1.11 ± 0.03
Coeur	0.92 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.88 ± 0.03

Les valeurs sont la moyenne ± s.d (n=6). Pas de différence significative (p>0.05) entre le groupe traité avec URMeOH et le groupe contrôle (P>0.05).

Tableau 17: Effet d'URMeOH sur les paramètres biochimiques des rats dans la toxicité subaigüe.

Paramètres	groupe contrôle	Groupes traités avec URMeOH	
		100 mg/kg p.c	200 mg/kg p.c
Glucose (g/L)	0.92 ± 0.05	1.04 ± 0.11	1.10 ± 0.05
Urée (g/L)	0.44 ± 0.06	0.40 ± 0.08	0.42 ± 0.05
Créatinine (mg/L)	12.75 ± 0.90	11.70 ± 2.05	11.98 ± 0.54
Cholestérol (g/L)	0.82 ± 0.04	0.77 ± 0.02	0.81 ± 0.03
TG (g/L)	0.63 ± 0.03	0.68 ± 0.03	0.61 ± 0.02
ASAT (U/L)	131.3 ± 1.56	136.9 ± 3.94	139.5 ± 4.60
ALAT (U/L)	46.37 ± 2.90	43.15 ± 1.65	46.30 ± 2.52
ALP (U/L)	149.7 ± 1.54	153.1 ± 1.42	151.5 ± 2.33
BT (mg/L)	0.81 ± 0.01	0.84 ± 0.05	0.81 ± 0.02

Les valeurs sont la moyenne ± SD (n=6). Pas de différence significative (p>0.05) entre les groupes traités avec et le groupe contrôle (P>0.05).

Tableau 18: Effet d'URMeOH sur les paramètres hématologiques des rats Wistar dans la toxicité subaiguë.

Paramètres	Groupe contrôle	Groupes traités avec URMeOH	
		100 mg/kg p.c	200 mg/kg p.c
GR ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	7.75 \pm 0.01	7.70 \pm 0.02	7.72 \pm 0.04
HGB (g/dL)	14.91 \pm 0.06	14.92 \pm 0.04	15.02 \pm 0.11
HCT (%)	44.58 \pm 1.03	42.88 \pm 0.72	44.64 \pm 0.51
PLT ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	794.3 \pm 3.03	803.3 \pm 5.03	795.0 \pm 4.35
VGM (fL)	56.07 \pm 1.19	55.58 \pm 2.11	59.57 \pm 1.22
CCMH (g/dL)	36.81 \pm 2.17	34.71 \pm 0.94	35.33 \pm 0.39
GB ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	7.33 \pm 0.11	7.78 \pm 0.22	7.62 \pm 0.33
Neutrophiles (%)	25.58 \pm 1.56	26.77 \pm 0.90	24.36 \pm 0.61
Eosinophiles (%)	1.68 \pm 0.02	1.73 \pm 0.03	1.56 \pm 0.11
Basophiles (%)	00.00 \pm 0.00	00 .00 \pm 0.00	00.00 \pm 0.00
Lymphocytes (%)	65.33 \pm 1.04	65.17 \pm 1.61	65.48 \pm 1.54
Monocytes (%)	1.58 \pm 0.02	1.62 \pm 0.03	1.63 \pm 0.05

Les valeurs sont la moyenne \pm S.D; La comparaison est faite par rapport au contrôle négatif. Pas de différence significative ($P \geq 0.05$).

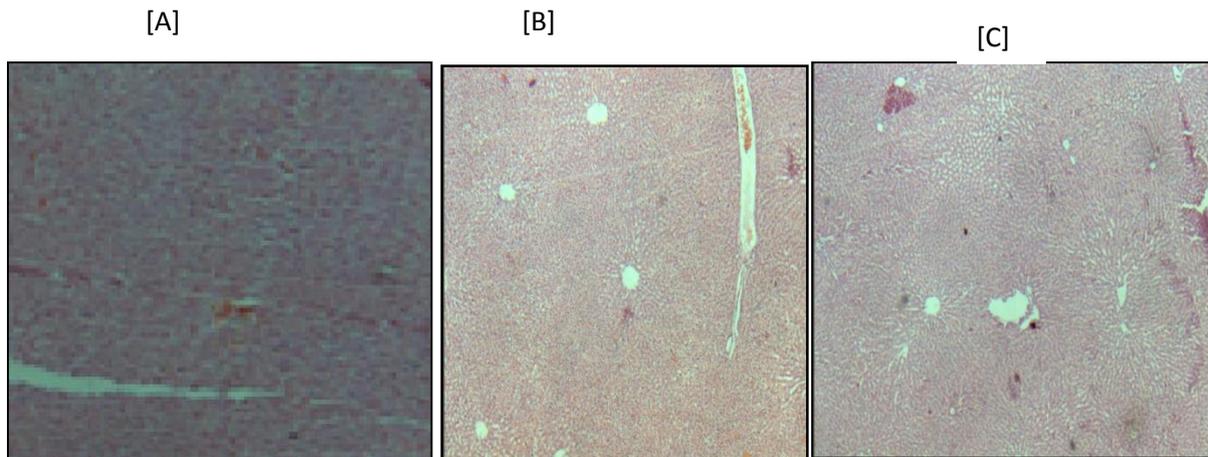


Figure 51. Histologie du foie des groups traités avec l'extrait méthanolique des feuilles d'*Umbilicus rupestris* [A] groupe contrôle, [B] groupe traité par l'extrait méthanolique [100 mg/kg p.c] montrant une architecture normale, [C] groupe traité avec URMeOH [200 mg/kg p.c] montrant une architecture normale. Les sections du foie colorées par hématoxyline et l'éosine (100X).

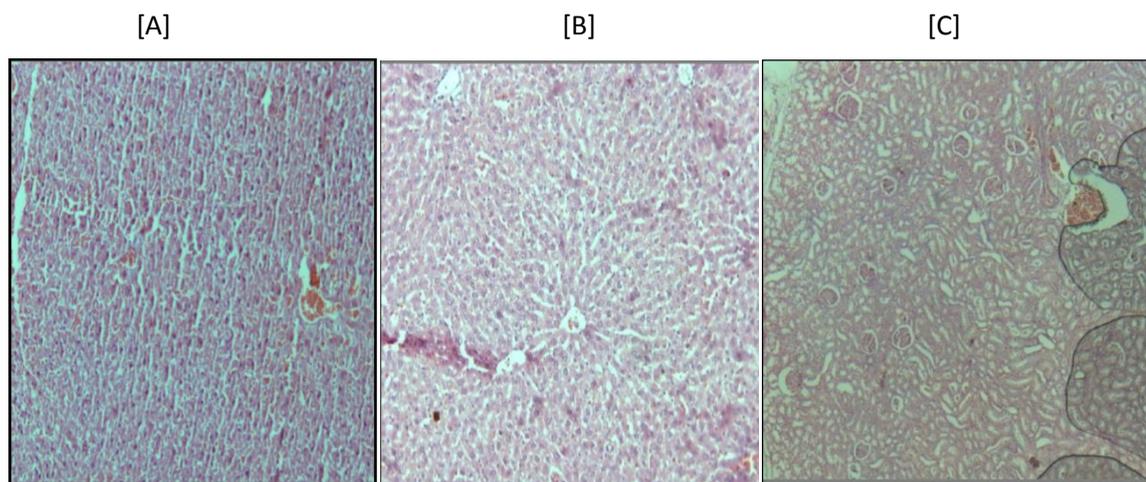


Figure 52. Histologie des reins des groups traités avec l'extrait méthanolique des feuilles d'*U.rupestris* [A] groupe contrôle, [B] groupe traité avec URMeOH [100 mg/kg p.c] montrant une architecture normale, [C] groupe traité avec URMeOH [200 mg/kg p.c] montrant une architecture normale. Sections des reins colorées par l'hématoxyline et l'éosine (100X).

II.3.2. Activité analgésique

II.3.2.1. Activité analgésique centrale

Un analgésique central est un analgésique qui supprime ou atténue la douleur par action centrale sans provoquer une perte de conscience.

Le traitement des douleurs induites par les stimuli thermiques est connu par les antalgiques à action centrale [Chau, 1989].

Les résultats de l'activité antinociceptive de *H.albus* et *U.rupestris* sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19: Effet des extraits HAMEOH et URMeOH sur les stimuli thermique (Hot Plate Test) induisant la douleur chez les rats.

Traitement	Temps de latence de réponse nociceptive (sec)			
	15 min	30 min	45 min	60 min
Contrôle (Eau distillée)	0.95 ±0.31	1.00 ± 0.20	0.92±0.04	1.13±0.41
HAMEOH (100mg/Kg p.c)	1.36 ± 0.38	2.20 ±0.31**	2.82±0.25***	3.07± 0.32**
HAMEOH (200mg/Kg p.c)	1.71 ± 0.44	2.88 ±0.43**	3.99±0.10***	4.60 ±0.17 ***
URMeOH (100mg/Kg p.c)	1.12 ± 0.32	1.41 ±0.10	1.33±0.13	1.70 ±0.01
URMeOH (200mg/Kg p.c)	1.11±0.01	1.18±0.03	1.37±0.47	1.45±0.55
Morphine (10 mg/Kg p.c)	3.53 ± 0.22***	4.16±0.30***	5.46±0.20***	9.60±0.78***

Les résultats sont exprimés en moyenne ±S.D (n=6),* (P<0.05), ** (P<0.001), *** (P<0.0001) .La comparaison est faite par rapport au contrôle.

Les résultats montrent que le temps de réaction à la douleur a diminué d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) après 15 min du traitement avec la morphine sulfate par rapport au contrôle. Le traitement avec HAMEOH (100 et 200 mg/Kg) a fait diminué le temps de réaction de douleur d'une manière significative ($P \leq 0.001$) et dose-indépendante après 30 min tandis que URMeOH (100 et 200 mg/Kg p.c.) n'a pas diminué le temps de réaction ($P > 0.05$).

L'augmentation du temps de réaction à la douleur (période de latence) indique le niveau de l'effet analgésique induit par les extraits ou par le standard.

H.albus est riche en alcaloïdes, ces derniers sont connus par l'inhibition de perception des douleurs [Uche et Aprioku, 2008 ; Amritpal et al., 2008].

Il a été prouvé que les produits isolés des plantes *Sinapis arvensis* et *Withania somnifera* qui appartiennent à la famille des Solanacées sont des antalgiques narcotiques [Sengupta et al., 1998].

Oto et al., (2013) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Hoscyamus reticulatus* L. a montré un effet antinociceptive centrale après 30 min de son administration.

II.3.2.2. Activité analgésique périphérique

Un analgésique périphérique est un analgésique qui supprime ou atténue la douleur par action périphérique sans provoquer une perte de conscience.

La méthode de l'acide acétique est la méthode la plus répandue dans l'évaluation de l'activité analgésique périphérique [Duraisankar et Ravichandran, 2012].

L'administration orale de HAMEOH (100 et 200 mg /Kg) chez les rats a réduit significativement ($P < 0,0001$) et d'une manière dose-dépendante le nombre de contractions abdominales induites par l'acide acétique chez les rats. HAMEOH avec les doses (100 et 200 mg / kg p.c) a montré un effet protecteur de 92,97% et 94,00%, respectivement. HAMEOH avec la dose de 200 mg / kg p.c. inhibe la douleur d'une manière significative ($p \leq 0,05$) par rapport à l'acide acétyle salicylique (87,09%) (Fig.53).

Les deux concentrations 100 et 200 mg/Kg p.c. d'URMeOH ont diminué le nombre des contractions d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) par rapport au contrôle négatif avec un effet analgésique de 34% et 56 % respectivement.

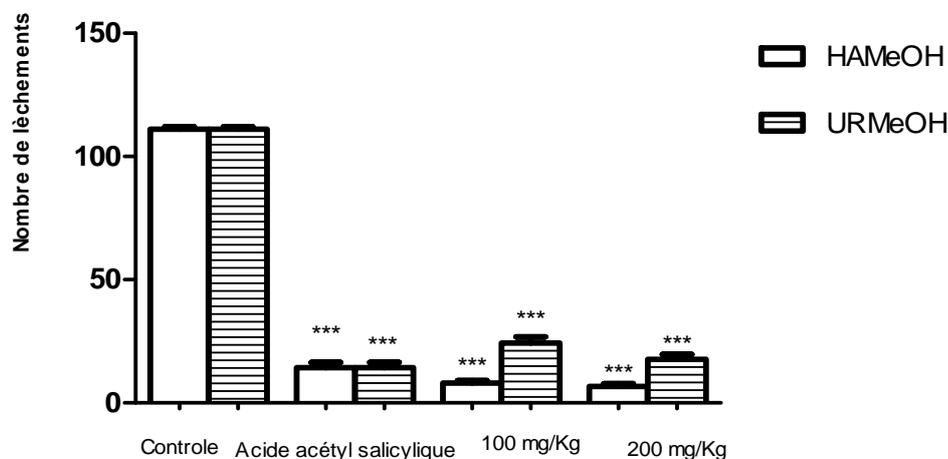


Figure 53. Effet de HAMEOH et URMeOH sur la douleur induite par l'acide acétique chez les rats.

Chaque barre représente la moyenne \pm s.d (n=6) ; *** $P < .0001$ différence hautement significative comparant avec le contrôle.

L'acide acétique provoque l'augmentation de prostaglandine E 2 (PGE2), prostaglandine F2 α (PGF2 α) et les lipoxygénases dans le fluide péritonéale qui stimulent les neurones nociceptifs [Deraedt *et al.*, 1980 ; Pal et Pawar ,2011].

Ces fibres sont sensibles aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) et aux antalgiques narcotiques [Santos *et al.*, 1997 ; Reichert *et al.*, 2001 ; Jamaluddin *et al.*, 2011].

Nos résultats suggèrent que les extraits HAMEOH et URMeOH ont inhibé la voie de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase et par la suite la synthèse de la prostaglandine et donc l'inhibition du mécanisme périphérique de la douleur. Ou bien l'inhibition de la libération de tumor necrosis factor (TNF), interleukine-1N et l'interleukine-8 par les cellules péritonéales résidentes [Jamaluddin *et al.*, 2011].

Al-Ashaal *et al.*, (2013) ont constaté que les alcaloïdes de type tropanes de la plante *Atropa belladonna* (Solanacée) ont une activité analgésique périphérique contre l'acide acétique.

Begum *et al.*, (2010) ont enregistré que l'extrait méthanolique de *Hyoscyamus niger* L. a prolongé le temps de réaction dans le test de plat chaud et réduit la réponse de lèchement de la patte dans le test de torsions abdominales induit par l'acide acétique d'une manière dose dépendante ce qui montre la meilleure activité de l'extrait.

II.3.2.3. Test à la formaline

L'essai formaline est un modèle applicable et fiable de nociception. Cette méthode élucide des activités centrales et périphériques. L'injection sous cutanée de 20 μ L de la formaline à 5% dans la patte derrière droite du rat a produit une réponse nociceptive biphasique (phase I appelée la douleur neurogène et une 2^{ième} phase appelée la douleur inflammatoire).

Comme il a été montré dans la Fig.54, HAMEOH (100 et 200 mg/kg p.c) réduit d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) et de manière dose dépendante le temps de lèchement dans les deux phases (phase précoce et retardée). HAMEOH a réduit la nociception dans la première phase avec 32,85% et 45,91% à 100 et 200 mg/kg p.c. respectivement.

URMeOH (100 et 200 mg/kg) et l'indométacine n'ont pas réduit le temps de lèchement durant cette phase ($P > 0.05$).

Pendant la deuxième phase, HAMEOH avec les doses 100 et 200 mg/kg p.c. a réduit le temps de lèchement d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) avec effet protecteur maximum de 48,55 % et 58,05 %, respectivement tandis que l'indométacine a un effet de 46,28%. En plus l'URMeOH avec les mêmes doses a pu réduire le temps de lèchement durant la phase retardée d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) avec effet protecteur maximum de 32,43 % et 44,83 %. L'indométacine a réduit le temps de lèchement d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) avec un effet analgésique 46,28 %.

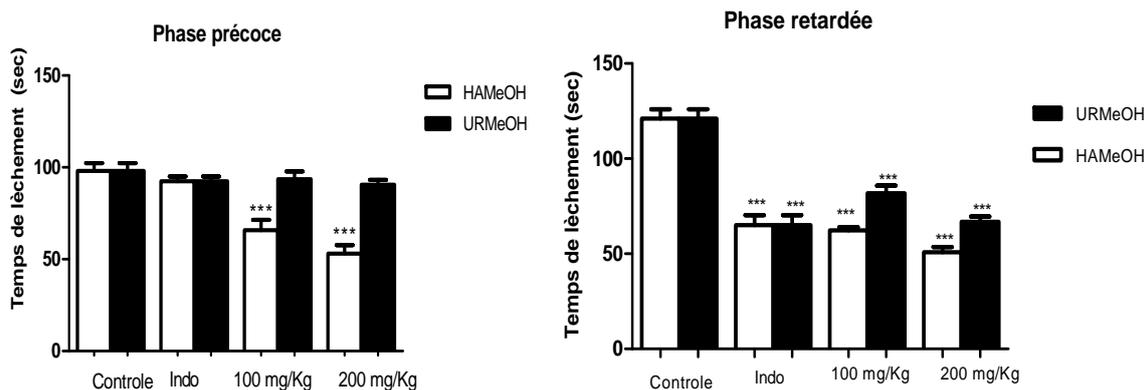


Figure 54. Effet analgésique de HAMEOH, URMeOH et l'indométacine durant les deux phases : la phase précoce et retardée.

Chaque barre représente la moyenne \pm s.d (n=6); *** $P < .0001$ différence hautement significative comparant avec le contrôle.

Le test à la formaline provoque la création de deux phases : précoce et retardée. La phase précoce (phase neurogénique) est caractérisée par l'activation des fibres C et la libération de la substance P [Shibata *et al.*, 1989] et une phase retardée qui est due à la libération des médiateurs de l'inflammation tels que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, et les prostaglandines initiés par les fibres C [Tjolsen *et al.*, 1992].

Les composés à action centrale comme les antalgiques narcotiques inhibent les deux phases ; la phase précoce ou retardée tandis que les composés à action périphérique comme les stéroïdes et NSAID inhibent seulement la phase retardée et ça est due à l'inhibition de la libération ou la synthèse de PG [Banerjee *et al.*, 2013].

L'extrait HAMEOH a montré un effet analgésique sur les deux phases ce qui confirme le blocage des nocicepteurs accompagné par l'inhibition de la formation des médiateurs inflammatoires tandis que l'extrait URMeOH a inhibé seulement la deuxième phase en raison de l'inhibition de la libération ou la synthèse de la prostaglandine.

II.3.3. Activité antipyrétique

L'effet de HAMEOH et URMeOH sur l'hyperpyrexie induite par la levure de bière est montré dans le tableau 20. L'injection sous-cutanée de la suspension de la levure de bière a causé l'élévation de la température chez les rats après 17h d'administration de la suspension.

Le traitement avec HAmEoH et URMeoH (100 et 200 mg/Kg p.c) a diminué significativement ($P \leq 0.05$) et d'une manière dose dépendante la température rectale. La réduction de la température rectale élevée induite par la levure a été observée à partir de la 3^{ème} heure après traitement par HAmEoH à partir de la 5^{ème} heure après traitement par URMeoH.

Tableau 20: Effet d'HAmEoH et URMeoH sur la pyrexie induite par la levure de bière.

Traitement	Température rectale (°C) avant et après le traitement						
	17h	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Controle (eau distillée)	36.43±0.05	38.56±0.02	38.95±0.08	38.63±0.11	38.43±0.05	38.57±0.15	38.47±0.05
HAmEoH (100mg/Kg p.c)	36.33±0.30	38.63±0.15	38.62±0.36	38.13±0.05**	38.07±0.05*	37.90±0.17**	37.50±0.10** *
HAmEoH (200mg/Kg p.c)	36.43±0.15	38.37±0.03	38.74±0.10	37.90±0.20***	37.33±0.15***	37.10±0.10***	37.13±0.15** *
URMeoH (100mg/Kg p.c)	36.56±0.75	38.66±0.9	38.65±0.67	38.71±0.43	38.34±0.11	37.77±0.02***	37.29±0.06* **
URMeoH (200mg/Kg p.c)	36.37±0.56	38.61±0.23	38.37±0.55	38.77±0.67	38.41±0.04	37.62±0.04***	36.21±0.03* **
Paracetamol (2mg/Kg p.c)	36.37±0.11	38.38±0.22	38.65±0.02	38.03±0.11**	36.67±0.15***	36.57±0.05***	36.10±0.10** *

Chaque valeur présente la moyenne ±SD. (n=6) , * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$, Ces résultats sont comparés par rapport au control négatif.

La pyrexie ou la fièvre est causée soit par une infection, des dommages de tissu, une inflammation ou par le rejet de greffe. Le tissu infecté ou endommagé provoque la formation des médiateurs pro-inflammatoires (les cytokines comme les interleukines 1 β , α , β et TNF- α), qui augmentent la synthèse de PGE2 au niveau de l'hypothalamus et déclenche par ce fait l'élévation de la température corporelle [Math *et al.*, 2011 ; Duraisankar *et Ravichandran*,2012] .Ce même phénomène a été rapporté par Kluger, (1991).

Cependant, les pyrogènes exogènes comme les microbes provoquent la pyrexie en augmentant la température par la stimulation des cytokines pyrogéniques. Les bactéries Gram-avec une membrane de polysaccharides peuvent agir sur l'hypothalamus de la même façon qu'IL-1b [Shah *et Seth*, 2010].

Les agents antipyrétiques inhibent la fièvre par l'inhibition de la synthèse de PGE2 au sein du cerveau par l'inhibition de l'expression de COX 2 ou par l'inhibition de IL- 1 α [Kurokawa *et al.*, 1998]. En général les NAIDS produisent leur action antipyrétique par l'inhibition de la synthèse de PG au sein de l'hypothalamus [Weissmann *et al.* ,1980].

Par conséquent, il s'avère que l'action antipyrétique de HAMEOH et URMeOH peut être liée à l'inhibition de la synthèse de PG dans l'hypothalamus. La régulation de la température corporelle exige un équilibre sensible entre la production et la perte de la chaleur et l'hypothalamus règle le point de réglage pour rendre la température à sa valeur normale [Ushikubi *et al.*, 1998].

L'effet antipyrétique des extraits HAMEOH et URMeOH est due probablement à la présence des alcaloïdes et les flavonoïdes. Ces derniers sont connus avec leur effet antipyrétique par la suppression de TNF- α ainsi que les alcaloïdes par leur effet antipyrétique [Adesokan *et al.*, 2008].

Delporte *et al.*, (1998) ont constaté que l'extrait méthanolique, l'extrait etherpetrolique et l'extrait dichlorométhanolique de la plante *Solanum ligustrinum* (Solanaceae) a un effet antipyrétique contre l'infection induite par l'injection d'une suspension de *E.Coli*.

Begum *et al.*, (2010) a démontré aussi que l'extrait des tiges de la plante *Hyoscyamus niger* a un effet antipyrétique contre la fièvre induite par la levure de bière.

II.3.4. Activité anti inflammatoire

II.3.4.1. L'œdème induit par la carragenane

La carragenane est un polysaccharide sulfaté obtenue à partir des algues, c'est un agent largement utilisé pour induire l'inflammation et augmenter la perméabilité vasculaire [Manjamalai *et al.*, 2011].

Comme il est montré sur la figure 55, l'injection sous cutanée de carragénane peut produire un œdème inflammatoire qui augmente rapidement, atteignant son maximum 30min après l'injection.

HAMEOH (100 et 200 mg/kg p.c.) ont présenté une activité anti-inflammatoire significative ($P < 0.001$) avec un effet de 54.48 et 62.75 % respectivement à la 6^{ème} heure.

URMeOH (100 et 200 mg/kg p.c.) induit significativement ($P < 0.001$) un effet anti-inflammatoire qui augmente progressivement et atteint le maximum (54,64 % et 74,07 %) respectivement.

L'indométacine (10 mg/kg p.c.) a montré un effet anti-inflammatoire de 67,04% aux 6^{ème} heures (Fig.55).

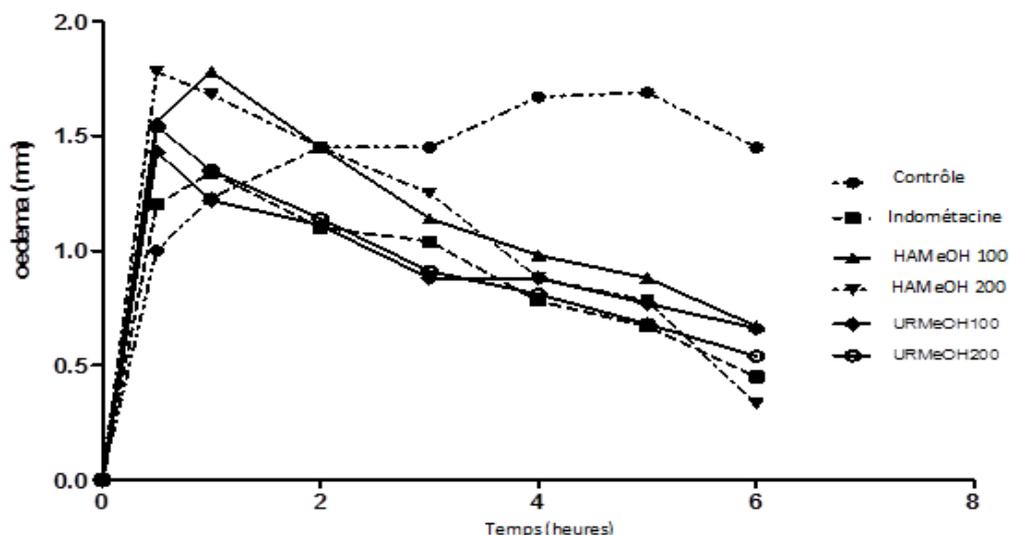


Figure 55. Effet anti-inflammatoire d'URMeOH et HAMEOH sur l'œdème de la patte du rat induite par la carragénane. Chaque point représente la moyenne \pm s.d (n=6); * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

La comparaison est faite par rapport au contrôle.

L'inflammation induite par la carragénane est utile pour détecter les agents anti-inflammatoires oraux actifs et c'est une méthode fréquemment employée pour évaluer l'effet anti-œdémateux des produits naturels [Jaijoy *et al.*, 2010].

L'œdème est produit à cause d'un dégagement des médiateurs pharmacologiques tels que : l'histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), les kinines, PGs et les cytokines pro-inflammatoires.

Selon Tjolsen *et al.*, (1992), la carragénane provoque un effet biphasique, la phase précoce résulte de la sécrétion de l'histamine, la sérotonine et les leukotriènes et la phase retardée est due à la libération du bradykinine et la PG après la mobilisation des leucocytes.

La carragénane induisant l'inflammation conduit à l'infiltration des neutrophiles et la production des radicaux libres dérivés des neutrophiles, tels que le peroxyde d'hydrogène, le superoxyde et les radicaux de l'OH [Dawson *et al.*, 1991].

Les deux extraits HAMEOH et URMeOH ont exercé leur effet anti-inflammatoire durant les deux premières heures (la phase précoce), probablement par l'inhibition de la synthèse de l'histamine et de sérotonine, et un effet après la troisième heure qui peut être dû à l'inhibition de COX et la synthèse de PG [Hirasawa *et al.*, 1991].

II.3.4.2.L'œdème de la patte induit par l'Histamine et la Sérotonine

L'histamine et la sérotonine sont des substances effectives qui augmentent la perméabilité vasculaire.

La figure 56 montre les effets d'URMeOH et HAMEOH sur l'œdème de la patte induit par l'histamine et la sérotonine. L'URMOH (200 mg/kg p.c.) a montré une activité anti-inflammatoire significative avec un effet maximal de 59,47 % sur l'œdème induit par l'histamine et de 51,80 % sur celui provoqué par la sérotonine.

L'HAMEOH (200 mg /Kg p.c.) a présenté un effet anti-inflammatoire significatif avec un effet de 54.90% sur l'œdème induit par l'histamine et de 45.81% sur l'œdème induit par la sérotonine.

L'indométacine a empêché de manière significative ($P < 0,05$) l'inflammation induite par l'histamine et la sérotonine avec 68,91 et 71,12 % respectivement.

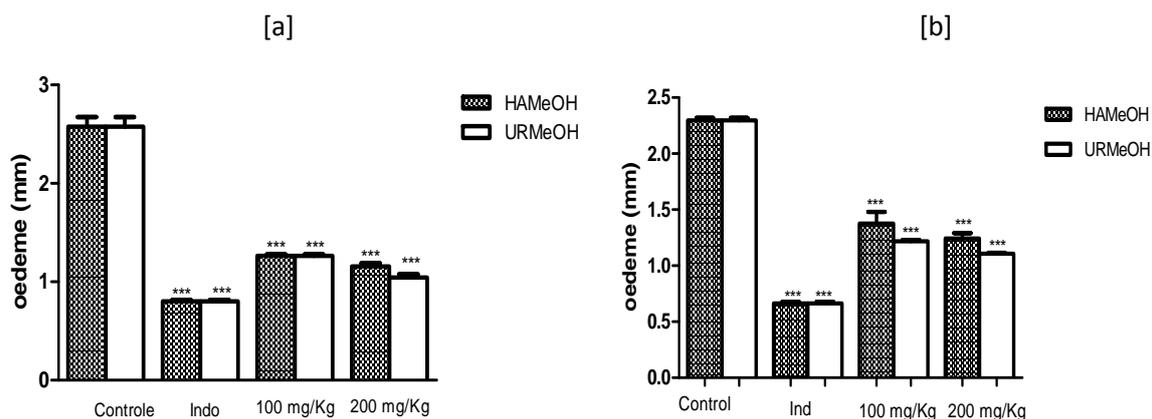


Figure 56. Effet d'URMeOH et HAMEOH sur l'œdème de la patte induit par l'histamine (a) et sérotonine (b). Chaque barre représente la moyenne \pm SD de 6 animaux ; *** $P < 0.0001$: différence significative par rapport au contrôle.

Selon Sowemimoa *et al.*, (2013), les extraits qui peuvent inhiber l'inflammation induite par les médiateurs ont la capacité d'inhiber la synthèse de d'histamine et la sérotonine.

Dimo *et al.*, (2006) ont trouvé que la plante *Kalanchoe crenata* (Crassulacée) a un effet antiinflammatoire contre l'inflammation induite par l'histamine (47.51%), et la sérotonine (54.71%).

II.3.4.3.L'œdème de la patte induite par la solution formaline

La formaldéhyde induisant l'arthrite est l'une des méthodes importantes pour évaluer l'effet anti-arthrite des extraits de plantes [Kore *et al.*, 2011].

HAMeOH (200 mg/kg p.c) a fait réduire d'une manière significative la formation de l'œdème de la patte avec 19.20% et 39.03% dans la 2^{ème} et 4^{ème} heure respectivement.

URMeOH (200 mg/kg p.c) a réduit d'une manière significative la formation de l'œdème de la patte avec 25,19 % et 36,33 % dans la 2^{ème} et 4^{ème} heure respectivement.

Encore l'indométacine a empêché de manière significative l'inflammation aiguë induite par la formaline avec un effet de 39,42 % lors de la 4^{ème} heure (Figure 57-a).

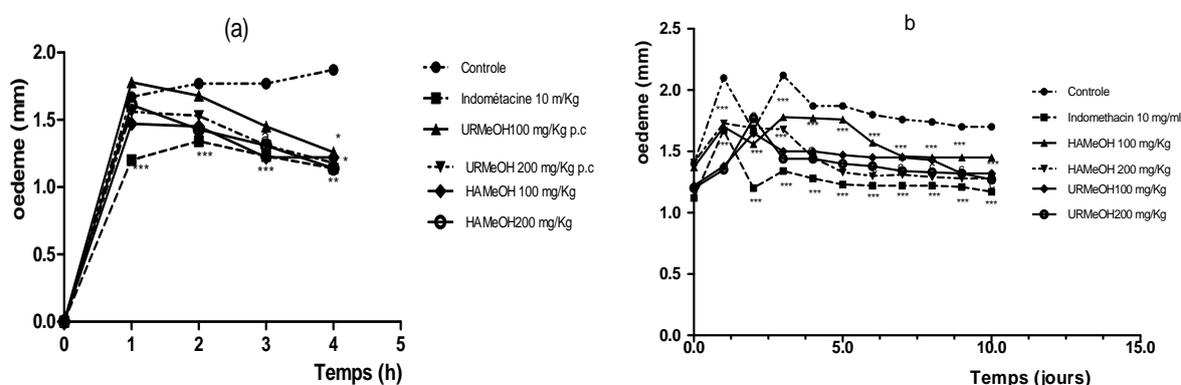


Figure 57. Effet d'URMeOH sur l'inflammation aiguë (a) et chronique (b) sur la patte du rat induite par la solution formaline. Chaque point représente la moyenne \pm SD, (n= 6); * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$ différence significative par rapport au contrôle négatif.

HAMeOH (100 et 200 mg/kg p.c.) a diminué d'une manière significative l'arthrite induite par le formaldéhyde avec un effet de 16.03 % et 20.75 %, respectivement lors du 3^{ème} jour. Et il a empêché l'inflammation chronique avec 14.70 et 24.70%, respectivement le 10^{ème} jour.

URMeOH (100 et 200 mg/kg p.c.) a empêché de manière significative l'arthrite induite par le formaldéhyde avec 29.24 % et 32.07 %, respectivement dans le 3^{ème} jour. Et il a empêché l'inflammation chronique avec 22.35 % et 25.29 %, respectivement le 10^{ème} jour (Figure 57-b).

Encore l'indométacine a empêché de manière significative l'inflammation aiguë induite par la formaline avec un effet de 36.79 % et 31.17 % le 3^{ème} jour et le 10^{ème} jour respectivement (Figure 57-b).

L'inflammation aiguë induite par la formaline résulte des dommages de cellules, ce qui provoque la production des médiateurs endogènes, tels que l'histamine, la sérotonine, les prostaglandines, et du bradykinine [Tjolsen *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1995].

Les extraits HAMEOH et URMeOH peuvent contenir des substances antiprolifératives et antiarthritiques contre la formaline-induisant l'œdème qui est un dispositif typique d'une réaction inflammatoire aigüe et chronique et ce qui renforce les résultats de Banerjee *et al.*, (2000).

Moradi *et al.*, (2013) ont rapporté l'activité antinflammatoire de l'extrait méthanolique des tiges de *Hyoscyamus niger* contre l'inflammation induite par le test formalin. Tandis que, Gupta *et al.*, (2010) ont montré que les extraits des feuilles de la plante *Bryophyllum pinnatum* (Crassulacée) ont un effet anti-arthrite causé par la solution formaline.

II.3.4.4.Péritonite induite par la carragénane chez les rats

La péritonite aiguë induite par la carragénane est un modèle bien connu et couramment utilisé dans l'étude des processus inflammatoires aiguës menant à l'évaluation de migration des leucocytes en comptant le nombre total de leucocytes et de neutrophiles qui atteignent la cavité péritonéale pendant le processus d'inflammation aiguë [Scognamillo-Szbo *et al.*,2004].

L'extrait HAMEOH a empêché la migration des leucocytes vers le péritoine avec des pourcentages (21.67 et 35.17 %) pour les doses (100 et 200 mg/kg p.c.) respectivement et spécialement les neutrophiles qui interviennent dans le cas d'inflammation avec une inhibition 49.29 et 48.23 % pour les deux concentrations 100 et 200 mg/Kg p.c. tandis que l'extrait URMeOH a empêché également la migration des leucocytes (41,63 et 61,60 %) et celle des neutrophiles (23.59 et 42.60%) pour les mêmes doses respectivement. Cependant l'inhibition des leucocytes produite par l'indométacine (10 mg/kg p.c.) est 47% et celle des neutrophiles est 30.28% (tableau 21).

Tableau 21: Effet d'URMeOH et HAMEOH sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans le fluide péritonéale dans la péritonite induite par la Carragenane chez les rats.

Traitement	Nbre des leucocytes (10^5 ml ⁻¹)	Inhibition des leucocytes (%)	Neutrophiles (10^5 ml ⁻¹)	Inhibition des Neutrophiles (%)
Contrôle (eau distillée)	5.26 ±0.64	-	2.84±0.05	-
HAMEOH (100 mg/kg p.c)	4,12±0.08**	21.67	1,40±0.11***	49.29
HAMEOH (200 mg/kg p.c)	3,41±0.09***	35.17	1,37±0.16***	48.23
URMeOH (100 mg/kg p.c)	3.07±0.08***	41.63	0.67±0.02***	23.59
URMeOH (200 mg/kg p.c)	2.02±0.09***	61.59	1.21±0.03***	42.60
Indométacine(10mg/kg p.c)	2.78±0.09***	47.14	0.86±0.04***	30.28

Valeurs calculés en moyenne ± S.D. (n=6). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle

, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

Le mécanisme d'action par lequel la carragénane induit des processus inflammatoires est une synergie entre plusieurs médiateurs inflammatoires, tels que la bradykinine, sérotonine, histamine, les prostaglandines, les leucotriènes B4 et d'autres agents chimiotactiques [Foster *et al.*, 1986].

D'après nos résultats, il est possible que nos extraits ont inhibé la libération de certains médiateurs de l'inflammation de la cavité péritonéale et même la migration des leucocytes vers le site d'inflammation.

Selon Wagner et Roth, (2000), les leucocytes migrent à l'endroit de l'inflammation en réponse aux stimuli chimiotactiques et jouent un rôle important dans la pathogénie des désordres inflammatoires aigus et chroniques.

Pendant la phagocytose, les leucocytes activés libèrent des radicaux superoxydes et d'autres contenus cytoplasmiques dans l'endroit de l'inflammation; ceci peut causer des dommages au tissu [Weissmann *et al.*, 1980].

Alves *and al.* (2009) ont rapporté que la réduction des neutrophiles durant la péritonite peut être due à la production des cytokines pro-inflammatoires tel que: TNF and IL - 1 β . Nos

extraits peuvent être à l'origine d'une réduction de la migration des neutrophiles dans la cavité péritonéale par ses effets sur ces cytokines.

II.3.4.5.Effet de la stabilisation de la membrane

La membrane cellulaire constitue généralement une première ligne de protection de la cellule. Ce principe souligne les divers intérêts et méthodes pour évaluer les caractéristiques intrinsèques de la membrane: sa stabilité, la fluidité, déformabilité et d'autres propriétés viscoélastiques. La fragilité osmotique des GR par exemple dépend des changements structuraux spécifiques que leur membrane subit lorsque la cellule est soumise à un stress osmotique.

L'effet de HAMEOH et URMeOH sur la stabilité de la membrane des érythrocytes des érythrocytes humains *in vitro* est montré dans le tableau 22.

HAMEOH (100 et 200 mg/Kg) ont un effet sur la stabilité des membranes des érythrocytes en inhibant l'hémolyse induite par l'hypotonicité avec un effet de 43.45 et 47.33 % pour les doses 200 et 400 µg / ml respectivement et inhibe l'hémolyse induite par la chaleur par un effet 37.78 et 39.23% pour les deux doses 200 et 400 µg / ml respectivement.

URMeOH (100 et 200 mg/Kg) a montré un effet de stabilisation contre l'hémolyse provoquée par l'hypotonicité avec un pourcentage 34.12 et 40.00 % pour les doses 200 et 400 µg / ml respectivement et un effet sur l'hémolyse induite par la chaleur avec un effet de 22.05 et 29.13% pour les deux doses 200 et 400 µg / ml respectivement. Sachant que l'indométhacine utilisé comme standard de référence a inhibé l'hémolyse induite par l'hypotonicité et celle provoquée par la chaleur avec des pourcentages de 53.28 et 51.66 % respectivement.

Tableau 22: Effet de HAMOH et URMeOH sur la stabilisation de la membrane des érythrocytes.

Composés testés	Pourcentage d'inhibition de la membrane (%)	
	Chaleur	Hypotonicité
HAMEOH 200 µg/mL	37.78	43.45
HAMEOH 400 µg/mL	39.23	47.33
URMeOH 200 µg/mL	22.05	34.12
URMeOH 400 µg/mL	29.13	40.00
Indo 100 µg/mL	51.66	53.28

Au cours de l'inflammation, il ya la lyse des lysosomes qui libèrent les enzymes qui provoquent un désordre.

Les AINS exercent leurs effets bénéfiques en inhibant la libération des enzymes lysosomales en stabilisant les membranes lysosomales [Mounnissamy *et al.*, 2008].

L'exposition des GR à de substances nocives telles que le salicylate de méthyle ou la phénylhydrazine ou leur exposition à l'hypotonie, la chaleur, a comme résultats la lyse des membranes, accompagné de l'hémolyse et l'oxydation de l'hémoglobine [Feirrali *et al.*, 1992].

La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et selon Chou, (1997), la stabilisation de la membrane érythrocytaire par l'extrait implique qu'il a la capacité de stabiliser la membrane lysosomale.

Les composés avec la propriété stabilisante de membranes sont bien connus avec leur capacité d'interférer dans la réponse inflammatoire précoce, surtout l'empêchement du dégagement des phospholipases qui déclenchent la formation des médiateurs inflammatoires [Aitadafoun *et al.*, 1996].

Anosike *et al.*, (2012) ont trouvé que l'extrait de la plante *Solanum aethiopicum* (Solanacée) a un effet sur la stabilisation de la membrane érythrocytaire en inhibant l'hémolyse induite par la chaleur avec des pourcentages 46.53% et 61.88 % pour les concentrations 400 et 600 µg/ml respectivement et l'hémolyse induite par l'hypotonie avec des effets 40.8 % pour la concentration 400 µg/ml.

II.3.5. Activité antidiabétique

II.3.5.1. Tolérance au glucose

Le diabète est un trouble métabolique chronique de glucides, de protéines et de matières grasses en raison de la carence absolue ou relative de la sécrétion d'insuline avec ou sans résistance à l'insuline. Il est caractérisé par l'hyperglycémie chronique qui pourrait conduire à la morbidité et la mortalité [Mohammed *et al.*, 2007 ; Oyedemi *et al.*, 2011].

Le taux de glucose chez les rats diabétiques et les autres groupes après l'administration de glucose est présenté dans la figure 58.

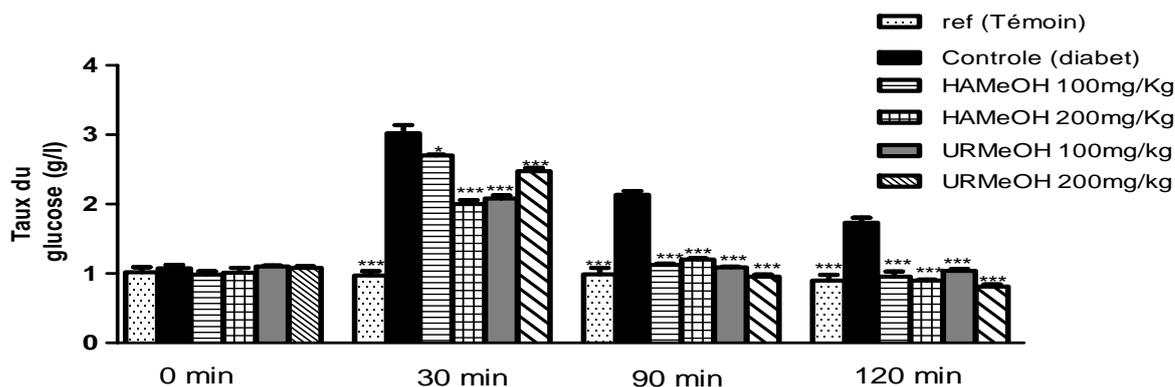


Figure 58. Tolérance au glucose pour le groupe contrôle et les autres groupes. Valeurs exprimées en moyenne \pm S.D. ($n=6$). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

Le taux de glucose chez le groupe contrôle (groupe diabétique) a atteint un taux maximal 3.02 g/l après 30 min de surcharge de glucose et cette valeur est significativement supérieur par rapport au groupe témoin ($P \leq 0.0001$).

Il est bien clair que nos extraits ont diminué le taux de glucose d'une manière significative ($P \leq 0.05$) après à 30, 90 et 120 min de surcharge de glucose par rapport au contrôle diabétique, ce qui veut dire que les extraits HAmEoH et URMeOH ont amélioré le taux de la glycémie post- prandiale et ils l'ont rendu à sa valeur normale.

Islam et al., (2009) ont suggéré que l'amélioration de la glycémie post prandiale est due à l'utilisation de glucose par les tissus périphériques d'où l'augmentation de la tolérance au glucose.

La digestion des carbohydrates et l'absorption du glucose sont le meilleur contrôle de la glycémie après les repas riches en glucides. Les enzymes α -amylase et α -glucosidase sont les enzymes clés responsables de la digestion des glucides alimentaires en glucose. Le glucose libéré est absorbé par les entérocytes intestinaux via des transporteurs spécifiques. Donc, l'inhibition des enzymes digestives ou les transporteurs de glucose par les polyphénols permettrait de réduire le taux de libération de glucose et son absorption au niveau de l'intestin grêle et par conséquent l'inhibition de l'hyperglycémie postprandiale [**Hanhineva et al., 2010**].

Ils ont montré que les composés phénoliques sont également capables de réguler la glycémie post-prandiale et favorise la tolérance au glucose par une facilité de réponse à l'insuline et l'atténuation de sécrétion de peptide insulinothèque dépendant du glucose (GIP) et le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [**Hanhineva et al., 2010**].

II.3.5.2. Le diabète induit par la streptozotocine (STZ)

Après 72h d'injection de STZ, 9 animaux ont été trouvés morts et nous avons sélectionné juste les animaux qui ont une glycémie à jeun ≥ 190 mg/L [Azmi et Shamim, 2012] parce qu'il y a des rats qui n'ont pas déclenché de diabète.

Le poids corporel du contrôle diabétique a montré une chute de poids corporel d'une façon proportionnelle avec le temps par contre le groupe témoin, les groupes traités avec les extraits HAmEoH, URMeOH, la metformine et l'insuline ont montré une augmentation dans le poids corporel d'une manière significative ($P \leq 0.05$) débutant de 10^{ème} jour de traitement jusqu'au la fin du mois (Fig.59).

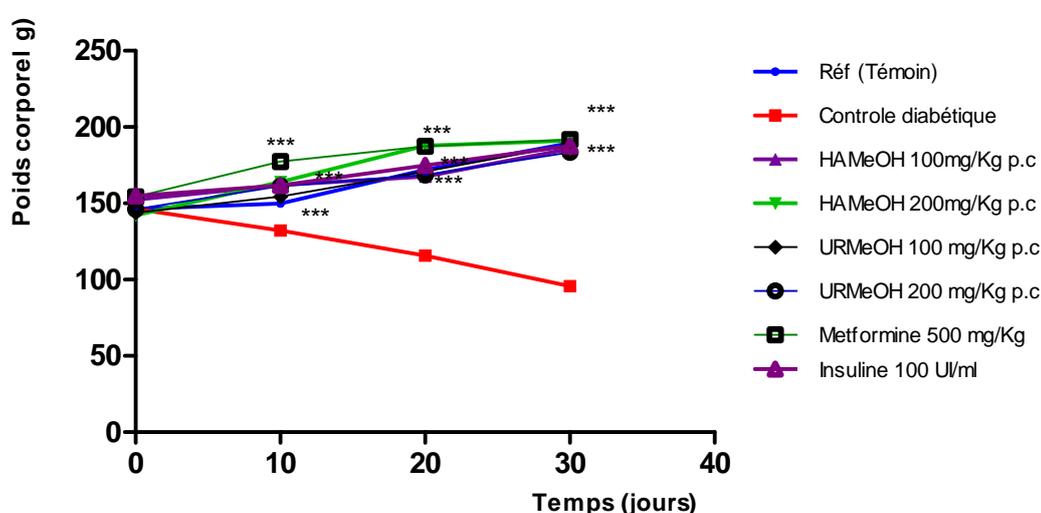


Figure 59. Changement du poids corporel des différents groupes durant 30 jours. Valeurs sont la moyenne \pm S.D. ($n=6$). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

Plusieurs études sur le diabète induit par STZ ont prouvé que ce dernier provoque la perte du poids corporel, qui est dû à l'augmentation de la fonte musculaire [Swanston- Flatt *et al.*, 1990] par l'utilisation des protéines tissulaires [Chatterjea et Shinde, 1976].

L'augmentation du poids corporel chez les rats diabétiques traités par les extraits par rapport aux rats diabétiques non traités peut être due à son effet protecteur et la lutte contre la fonte musculaire, c'est à-dire l'inversion de la gluconéogenèse et la glycogénolyse [Leelavinothan et Saravanan, 2006].

Nos extraits ont fait diminuer d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) le taux de glucose et le taux de HbA1C par rapport au contrôle diabétique mais sans rendre les valeurs à la normale.

La capacité des extraits HAMEOH et URMeOH de diminuer le taux du glucose à un niveau normal est un effet essentiel pour le foie de revenir à son homéostasie normale pendant le diabète. La metformine et l'insuline qui sont utilisés comme des standards de référence encore ont diminué d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) le taux de glucose et le taux de HbA1C par rapport au contrôle diabétique (Tableau 23). Et il n' y a aucune différence significative ($P > 0.05$) entre l'effet des extraits et l'effet de l'insuline et la metformine sur le taux de glucose et le taux de HbA1C.

Tableau 23 :Taux de glucose, insuline, hémoglobine et hémoglobine glyquée (HbA1C) et la présence du glucose et les corps cétoniques dans les urines.

Groupes	Glucose (g/l)	Insuline (μ U/ml)	Hb (g/dl)	HbA ₁ C (%)	Glucose des urines	CC
Référence (eau distillée)	0.89±0.08****	19,93 ± 1,99***	12,80 ± 0,89***	4,66 ± 0,72***	abs	abs
Controle diabétique	3,46 ± 0,31	2,13 ± 0,17	8,64 ± 0,45	11,52 ± 1,61	+++	+++
HAMEOH 100 mg/Kg p.c	3,20 ± 0,04***	3,16 ± 2,67***	11,87 ± 0,06***	9,04 ± 0,21 ***	++	++
HAMEOH 200 mg/Kg p.c)	2,10 ± 0,02***	3,51 ± 2,10***	12,57 ± 0,39***	7,73 ± 0,15***	++	+
URMeOH (100 mg/Kg p.c)	2,39 ± 0,02***	4,81 ± 1,32***	14,28 ± 0,56***	8,43 ± 0,47***	+	+
URMeOH (200 mg/Kg p.c)	2,11 ± 0,08***	5,99 ± 3,26***	13,38 ± 0,36***	8,49 ± 0,52***	+	+
Metformine (500mg/Kg)	1.60± 0,05***	4,35 ± 0,32***	12,88 ± 0,20***	7,13 ± 0,20***	+	+
Insuline (100UI/ml)	0,95 ± 0,05***	20,35 ± 0,32***	12,88 ± 0,20***	5,13 ± 0,20***	abs	abs

Les valeurs exprimées en moyenne \pm S.D. ($n=6$). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$. +++ (300mg/dl), ++ (100 mg/dl), + (50 mg/dl).

La STZ est un analogue de la nitroso-urée, dans lequel le groupement N-méthyl- N-nitroso-urée (MNU) est relié à l'atome de carbone-2 d'un hexose. La STZ est connu par sa toxicité sélective sur les cellules β - pancréatique car il est sélectivement accumulé dans les cellules β - du pancréas en induisant la faible affinité au glucose pour le transporteur de type GLUT2 [Tjälve, 1983

, **Karunanayake et al., 1990**]. Mais les cellules productrices d'insuline qui n'expriment pas ce transporteur de glucose sont résistantes à la STZ [**Ledoux et Wilson, 1984 ; Schnedl et al., 1994 ;Elsner et al., 2002**].

Il a été rapporté que la STZ est fixée par les cellules- β par l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT-2 et elle cause l'alkylation et la méthylation de l'ADN et il agit comme l'oxyde nitrique [**Delancy et al., 1995 ; Vishnu et al., 2009 ; Lal et al., 2012**]. Les cellules β sont en particulier sensibles aux dommages causés par l'oxyde nitrique et les radicaux libres en raison de leurs niveaux bas en enzymes du balayage des radicaux libres [**Ishrat et al., 2006**]. Ainsi il provoque la réduction d'adénosine triphosphate et de NAD^+ de la cellule [**Heller et al., 1994**].

En général, la toxicité de la STZ dépend de son activité d'alkylation d'ADN via sa fraction méthyl-nitrosourée, en particulier la position O6 de la guanine [**Ledoux et al., 1986 ; Wilson et al., 1988 ; Murata et al., 1999**]. Le transfert du groupe méthyle de STZ à la molécule d'ADN provoque des dommages [**Pieper et al., 1999**] parmi les, la fragmentation de l'ADN [**Yamamoto et al., 1981**] encore, la glycosylation des protéines [**Konrad et Kudlow, 2000**] bien que la STZ méthyle également des protéines [**Wilson et al., 1988**].

La méthylation de l'ADN est finalement responsable de la mort des cellules- β , mais il est probable que la méthylation des protéines contribue à des défauts de fonctionnement des cellules β après leur exposition à la STZ [**Lenzen, 2008**].

Les mécanismes par les quel le stress oxydant est impliqué dans les complications diabétiques sont partiellement connu, y compris l'activation des facteurs de transcription, les produits terminaux avancés de glycation (AGEs) et l'activation de la protéine kinase C [**Bunn et al., 1978 ; Kumar et al., 2006**].

Le diabète induit par la STZ a induit l'anémie chez les rats diabétiques mais le traitement par les extraits HAMEOH et URMeOH avec les deux concentrations fait augmenter le taux d'hémoglobine d'une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) (Tableau 23) ceci peut être expliqué que l'extrait a la capacité de détacher le glucose de l'hémoglobine.

Les valeurs de HbA1c ont augmenté d'une façon proportionnelle avec l'augmentation du taux de la glycémie à jeune. Donc, la mesure de l'HbA1c est un indice très sensible pour le contrôle glycémique [**Pari et Saravanan, 2002**] (Tableau 23).

L'augmentation observée du niveau de HbA1C chez le groupe diabétique (contrôle) est due à la présence des quantités excessives de glucose dans le sang et l'excès de glucose combinant avec l'hémoglobine et les niveaux bas d'hémoglobine totale observés dans les rats diabétiques pourraient être due à la formation accrue de l'HbA1c [Alyassin et Ibrahim 1981 ; Sheela et Augusti, 1992].

De plus, l'activité anti-hyperglycémique des deux extraits HAMEOH et URMeOH ont été associées à une augmentation du niveau d'insuline dans le plasma d'une manière significative ($P \leq 0.0001$) par rapport au contrôle diabétique qui montre un taux bas d'insuline, nous avons suggéré que les extraits ont une activité insulinogénique par la stimulation de la sécrétion d'insuline à partir du reste des cellules- β [Chattopadhyay, 1999 ; Pari et Latha , 2002].

Le mécanisme possible par lequel les deux extraits apportent leur action anti-hyperglycémique peut être par l'induction de la sécrétion d'insuline pancréatique à partir de cellules- β d'îlots de Langerhans ou grâce au transport accru du glucose sanguin vers les tissus périphériques [Pari et Latha , 2002].

Après l'administration de la STZ à une dose unique de (55 mg / kg), le taux de sucre dans l'urine était chez le contrôle diabétique est de grade +++ (300mg/dl) et celui des corps cétoniques (+++). L'extrait HAMEOH (100 mg/Kg) a pu réduire le niveau de sucre dans l'urine à un grade ++ (100 mg/dl) et des corps cétoniques (++) , tandis que l'URMeOH (100 et 200 mg/Kg) ont rendu le glucose (+) et des corps cétoniques (+), Aussi, le traitement avec la metformine a rendu le niveau de glucose dans les urines à + (50 mg/dl) et de corps cétonique (+) cependant le groupe traité avec l'insuline n'a pas montré ni la présence de glucose ni des corps cétoniques dans les urines. Les résultats sont résumés dans le Tableau 23.

L'acidocétose diabétique survient comme une conséquence de la carence relative ou absolue en insuline, généralement accompagnée d'une augmentation des hormones de contre-régulation telles que le glucagon, le cortisol et l'épinéphrine [Savage *et al.*, 2011].

La lipolyse accrue augmente le taux des acides gras libres dans le sérum avec production de grandes quantités de corps cétoniques (acétone, l'acétoacétate et le 3-bêta-hydroxybutyrate) et résulte une acidose métabolique [Savage *et al.*, 2011].

Le diabète a induit l'élévation du taux d'urée et de la créatinine d'une manière significative ($P \leq 0.0001$) par rapport au groupe témoin. Le traitement par les extraits

HAMeOH, URMeOH , la metformine et l’insuline ont réduit d’une manière hautement significative ($P \leq 0.0001$) les taux d’urine et la créatinine jusqu’aux valeurs normales.

Les concentrations des lipides, tels que le cholestérol et le TG sont corrélées et sont significativement élevées ($P \leq 0.01$) chez les rats diabétiques par rapport au groupe témoin (Tableau 24), ceci est du probablement à l’insuffisance de l’insuline, qui est responsable de l’accumulation des lipides et la diminution de la sécrétion d’insuline ce qui provoque l’augmentation du métabolisme des lipides au niveau des tissus adipeux [Rajalingam *et al.*, 1993 ; Pattabiraman et Muthukumar, 2011].

Les deux concentrations 100 et 200 mg/Kg de l’extrait HAMeOH ont réduit le taux de cholestérol avec un pourcentage de 23,35 et 34,37 % et celui de TG avec 42,63 et 27,41 % respectivement.

Aussi, l’extrait URMeOH (100 et 200 mg/Kg) ont pu réduire le taux de cholestérol avec un pourcentage de 42,3 et 50,67 % et celui de TG avec 36,02 et 34,40 % sachant que la metformine et l’insuline ont fait diminuer le taux de cholestérol avec 44,93 et 45,81 % respectivement et le taux de triglycéride avec 51,07 et 60,21 %.

Tableau 24: Effet de HAMeOH et URMeOH sur le taux de l’urée, la créatinine, le cholestérol, et les triglycérides chez les rats diabétiques.

Groupes	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)	Cholesterol (g/l)	TG (g/l)
Réf (eau distillée)	0,39±0.0650***	7,55 ± 1.74***	1,49 ±0.25***	1,15±0.037***
contrôle diabétique	0,7± 0,045	18,82 ± 0,22	2,27± 0,02	1,86 ± 0,05
HAMeOH (100 mg/Kg)	0,26 ± 0,04***	10,40 ± 0,57***	1,740 ± 0,05***	1,067 ± 0,15***
HAMeOH (200mg/Kg)	0,45 ± 0,07***	11,58 ± 0,35***	1,49 ± 0,06***	1,35 ± 0,05***
URMeOH (100 mg/Kg)	0,37 ± 0,06 ***	7,54 ± 1,93***	1,31 ± 0,01***	1,19 ± 0,07***
URMeOH(200 mg/Kg)	0,40 ± 0,01***	8,03 ± 1,18***	1,12 ± 0,04***	1,22 ± 0,09***
Metformine (500 mg/Kg)	0,40 ± 0,02***	12,59 ± 0,49***	1,25 ± 0,14***	0,91 ± 0,05***
Insuline (100 UI /ml)	0,49 ± 0,30***	14,59 ± 0,79***	1.23 ± 0,21***	0,74 ± 0,09***

Valeurs en moyenne ±S.D. (n=6). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

Il a été prouvé que la plupart des anomalies lipidiques les plus courantes dans le diabète sont l’hypertriglycémie et hypercholestérolémie [Khan *et al.*, 1995].

Le potentiel de diminution des lipides est sensiblement bénéfique pour les sujets atteints de diabète et les maladies cardio-vasculaires.

Ces changements peuvent être bénéfiques dans la prévention des complications du diabète ainsi que l'amélioration du métabolisme des lipides chez les diabétiques [Gupta *et al.*, 2005 ;Ozen *et al.*, 2012].

La diminution du taux de lipides dans le sérum à l'aide de thérapie diététique ou d'un médicament semble être associée à une diminution du risque des maladies vasculaires chez l'espèce humaine [Rhoads *et al.*, 1976].

Il a été trouvé encore que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins empêchent les enzymes α -amylase et β -glucosidase qui sont des enzymes clés dans le métabolisme des glucides [Hanhineva *et al.*, 2010].

Les polyphénols peuvent abaisser le taux de glucose dans le sang avec différents mécanismes, parmi les : inhibition de la digestion des glucides et l'inhibition de l'absorption de glucose par l'intestin, ils stimulent la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas, la modulation de la libération du glucose par le foie, l'absorption de glucose par les tissus sensibles à l'insuline et la modulation des voies de signalisation intracellulaire [Hanhineva *et al.*, 2010].

Le diabète a provoqué encore une augmentation des activités des enzymes PAL et LDH d'une manière significative ($P \leq 0.0001$) par rapport au groupe référence mais le traitement avec HAMEOH (100 et 200 mg/Kg), URMeOH (100 et 200 mg/Kg), la metformine et l'insuline ont fait abaisser leurs activités d'une manière significative ($P \leq 0.0001$).

Encore une diminution de taux de glycogène a été constatée chez le lot diabétique non traité d'une manière significative ($P \leq 0.0001$) par rapport au lot témoin, mais le traitement par les standards de référence et par les extraits a augmenté le taux de glycogène hépatique d'une manière significative ($P \leq 0.0001$) et l'augmentation de l'activité de LDH dans le diabète millitus a été rapportée par Pozzilli *et al.* (1997).

D'après les résultats obtenus, les lots traités avec les extraits HAMEOH, URMeOH et avec la metformine et l'insuline ont montré une augmentation hautement significative ($P \leq 0.0001$) du taux de glycogène (Tableau 25).

Tableau 25: Taux de LDH , PAL plasmatique et le taux glycogène hépatique après 30 jours de traitement.

Groupes	Glycogène (mg de glucose/g tissue humide)	PAL (UI/L)	LDH (UI/L)
Eau distillée (Réf)	69,48 ± 3,03***	81.38± 6.55***	191.8 ±1.552***
Contrôle diabétique	21,49 ± 2,12	284,4 ±12,48	370,0 ± 27,84
HAMeOH (100 mg/Kg p.c)	59,54 ±1,07***	127,5 ± 15,15***	209,5 ±4,875***
HAMeOH (200 mg/Kg p.c)	57,15 ± 0,28***	75,81 ± 6,47***	217,1±3,561***
URMeOH (100 mg/Kg p.c)	49,20 ± 0,79***	111,8 ± 2,07***	194,7±12,59***
URMeOH (200 mg/Kg p.c)	51,89 ± 1,52***	103,8 ± 1,48***	198,9 ± 24,95***
Metformine (500 mg/Kg p.c)	48,48 ± 1,43***	94,09 ± 5,20***	214,1 ± 9,459***
Insuline (100 UI/ml)	66,56 ± 1,43***	81,81± 4,34***	188,54 ± 5,15***

Valeurs en moyenne ±S.D. (n=6). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle diabétique * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

La teneur basse en glycogène dans les muscles squelettiques et dans le foie est due à la diminution de glycogène synthétase [Grover *et al.*, 1999 ;Sumana et Suryawashi ,2001] et l'augmentation de l'activité de glycogène phosphorylase [Roesler et Khandermal, 1986].

On suggère que les rats diabétiques traités avec les extraits HAMeOH et URMeOH , le groupe traité par la metformine et le groupe traité par l'insuline ont pu restaurer le niveau du glycogène hépatique par la diminution de l'activité de glycogène phosphorylase et l'augmentation de l'activité du glycogène synthase [Carabaza *et al.*, 1990].

Nos extraits sont riches en polyphénols, les terpénoïdes et les acides phénoliques qui sont connus par leur effet antidiabétique [Rhemann et Khurshid, 1989 ; Manickam *et al.*, 1997].

Certains polyphénols, y compris les catéchines et épicatechines, acides chlorogénique, acide férulique, l'acide caféique et l'acide tannique, la quercétine et la naringénine, pourraient altérer l'absorption de glucose par les entérocytes par l'inhibition des transporteurs de glucose dépendant de Na^+ , SGLT1 (sodium glucose transporter-1) et SGLT2 (sodium glucose transporter-2) [Kobayashi *et al.*, 2000 ; Johnston *et al.*,2005].

Des études *in vitro*, ont montré que certains composés phénoliques tels que la quercétine et le resveratrol améliorent la prise du glucose dépendant de l'insuline par les cellules des muscles et les adipocytes par la translocation du transporteur de glucose, GLUT4 (Glucose transporter type 4), à la membrane plasmique principalement par l'induction de la protéine d'AMP-activant voie de la kinase (AMPK) [Park *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2010].

Il a été constaté que quelques polyphénols sont également capables d'induire le phosphatidylinositide 3-kinase (PI3k) comme voie de signalisation principale pour la régulation pour la prise de glucose [Kumar *et al.*, 2009].

II.3.6. Activité anti-ulcéreuse

L'ulcère gastroduodéal (UGD) décrit un état dans lequel il ya une discontinuité dans toute l'épaisseur de gastre et la muqueuse duodénale qui persiste à cause de l'existence de l'acide et la pepsine dans le suc gastrique [Madhu *et al.*, 2012].

Les ulcères gastroduodéaux sont provoqués par un déséquilibre entre les mécanismes défensifs (barrière mucoale défensive, sécrétion de bicarbonate, PG) et les mécanismes agressifs (acide, pepsine et *Helicobacter pylori*) de la muqueuse [Tipnis *et Bajaj*, 2003 ; Raju *et al.*, 2009 ; Madhu *et al.*, 2012].

L'éthanol produit des lésions nécrotiques par son action directe sur l'estomac ce qui réduit les facteurs de défense comme la sécrétion du bicarbonate et la production du mucus [Marhuenda *et al.*, 1993].

L'éthanol peut atteindre la muqueuse par la rupture de la barrière de mucus-bicarbonate et la rupture des cellules dans la paroi des vaisseaux sanguins. Ces effets sont probablement dus aux quelques phénomènes biologiques, comme la peroxydation des membranes, la formation des radicaux libres, l'effort oxydant intracellulaire, le changement de la perméabilité et la dépolarisation de la membrane mitochondrial avant la mort cellulaire [Sannomiya *et al.*, 2005].

L'administration de l'éthanol absolu par la voie orale est nocive à l'estomac par ses effets sur la muqueuse gastrique en perturbant la barrière et la provocation des changements microvasculaires prononcés en quelques minutes après son application [Moleiro *et al.*, 2009].

En outre, il produit des lésions hémorragiques linéaires, des œdèmes submucosales étendus, une friabilité de la muqueuse, une infiltration inflammatoire des cellules et une perte épithéliale des cellules dans l'estomac, qui sont des caractéristiques typiques des dommages causés par un alcool [Wallace *et al.*, 1992 ; Jelski *et al.*, 2009].

La pathogénie des dommages muqueux gastriques induit par l'éthanol produit la libération directement et indirectement des divers médiateurs tels que les lipoxygénases, les cytokines, et les radicaux libres dérivés d'oxygène [Wallace *et al.*, 1992 ; Abdel-Salam *et al.*, 2001].

La sécrétion de mucus est considérée comme un facteur défensif crucial pour la protection de la muqueuse gastrique contre les lésions gastriques [Oluwole *et al.*, 2008].

En outre, la perturbation des facteurs défensifs, tels que la sécrétion de mucus, la sécrétion de bicarbonate et le débit sanguin de la muqueuse provoque des ulcères L'éthanol cause encore des lésions gastriques par la production des leucotriènes [Goel et Bhattacharya, 1991].

De nombreux médicaments incluant les inhibiteurs de la pompe à protons, des analogues de prostaglandines, des antagonistes des récepteurs de l'histamine et les agents cytoprotecteurs sont disponibles pour le traitement de l'ulcère gastro-duodéal. Mais la plupart de ces médicaments produisent plusieurs effets indésirables y compris la toxicité et peuvent même altérer les mécanismes biochimiques du corps surtout après l'usage chronique [Ariyphisi *et al.*, 1986].

Actuellement, les produits d'origine naturelle sont généralement utilisés pour éviter l'usage chronique des médicaments. Plusieurs produits naturels ont été signalé comme possédant une activité anti-ulcérogène par leur effet de défense de la muqueuse [Sairam *et al.*, 2001].

L'extrait HAMEOH a fait réduire la surface d'ulcère d'une manière significative ($P < 0.05$) avec une inhibition de 63 % et 95.90 % pour les doses (100 et 200 mg/kg p.c) respectivement. Encore URMeOH a pu inhiber d'une manière significative ($P < 0.05$) l'ulcère avec une inhibition (48.98% et 65.94%) pour les doses (100 et 200 mg/kg p.c.) respectivement.

Sachant que l'oméprazole qui a été utilisé comme un standard de référence a réduit d'une manière significative ($P \leq 0.05$) l'ulcère avec un effet (60.23%) (Fig.60).

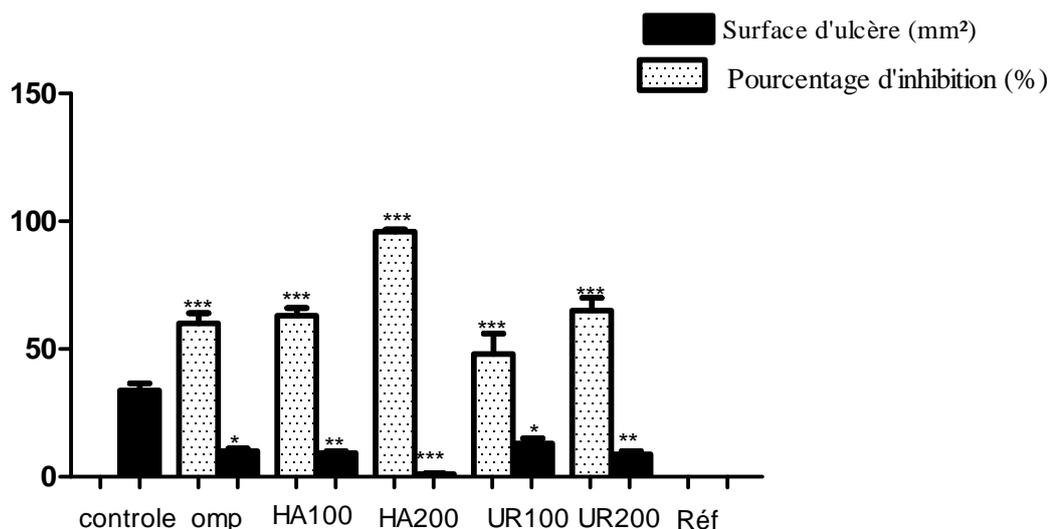


Figure 60. Effets des HAMEOH et URMeOH sur la surface d'ulcère (mm²) et pourcentage d'inhibition. Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Chez le groupe contrôle, des blessures graves ont été observées au niveau de la muqueuse gastrique. L'éthanol a produit une nécrose hémorragique visible de la muqueuse gastrique. Il a provoqué des perturbations de l'épithélium de surface et des lésions nécrotiques qui ont pénétré profondément dans la muqueuse et un papillome kératosique (Fig.61).

Cependant, chez les animaux traités avec les extraits, l'ensemble des signes observés chez le groupe contrôle ont été réduit d'une manière significative surtout avec l'extrait HAMEOH 200 mg/Kg p.c. (Fig.62, 63,64 et 65).

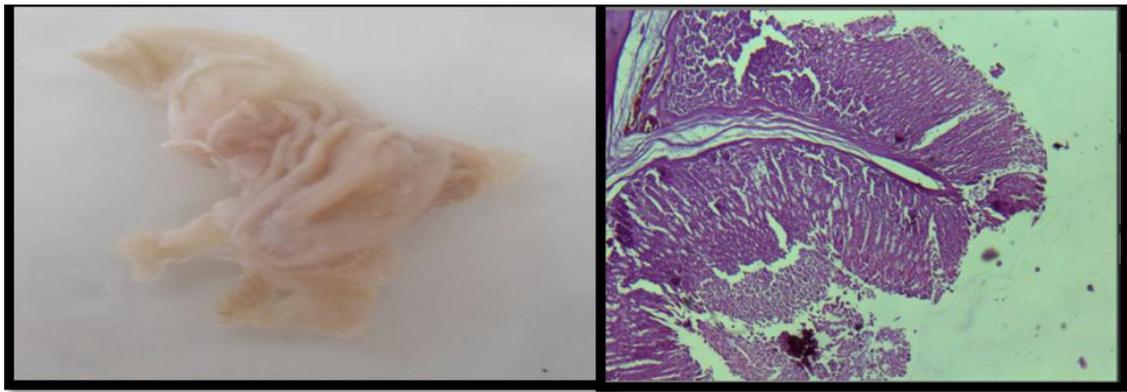


Figure 61. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec l'eau distillée.

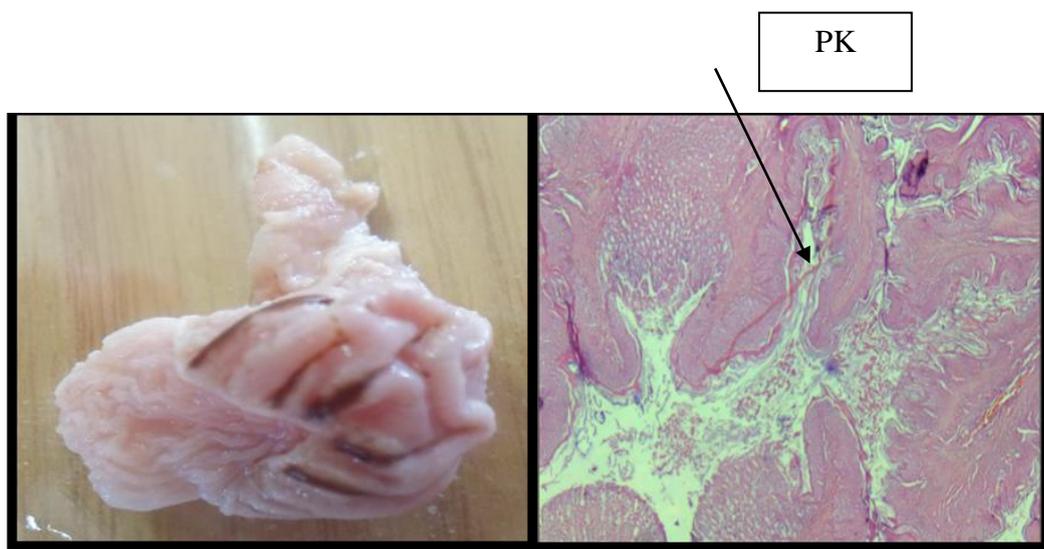


Figure 62. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec l'éthanol (contrôle de l'ulcère), présence de papiollome kératosique (PK).

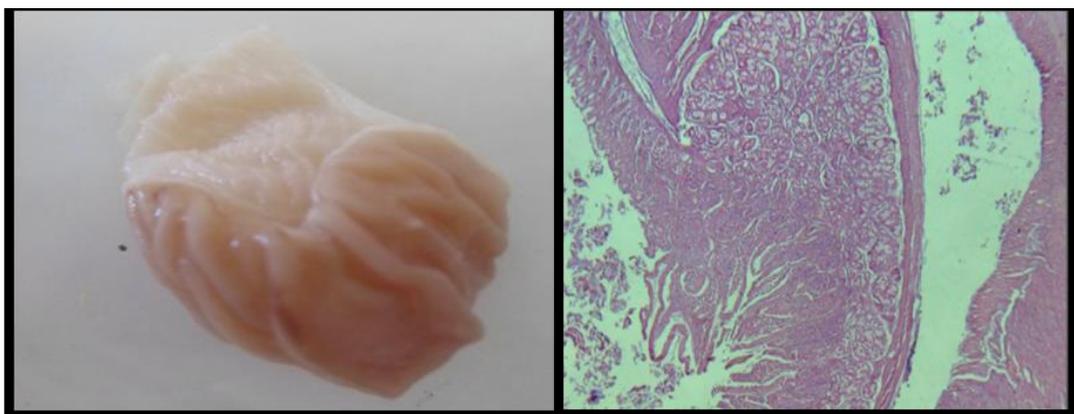


Figure 63.Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec de l'oméprazole.

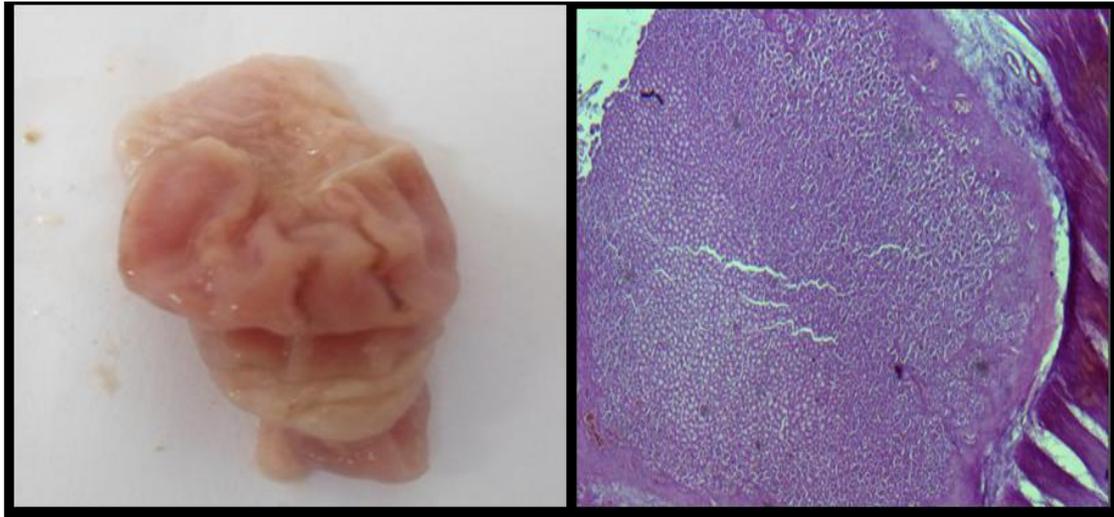


Figure 64. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec HAmOH (100mg/kg p.c).

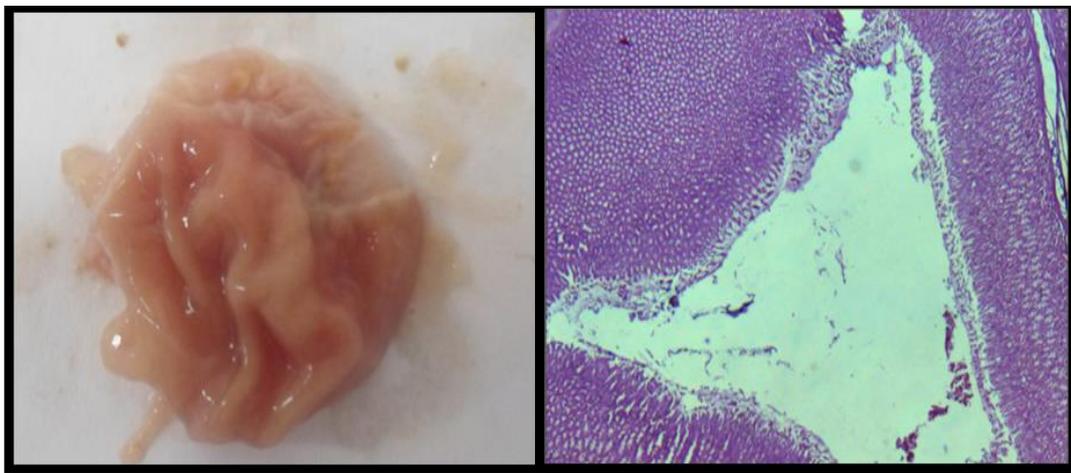


Figure 65. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec HAmOH (200mg/kg p.c).

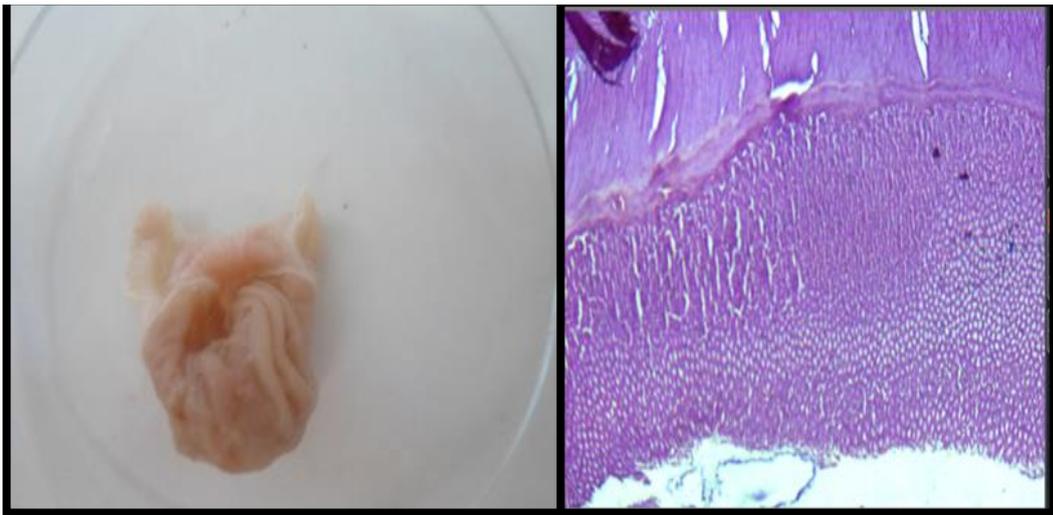


Figure 66. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec URMeOH (100 mg/kg p.c).

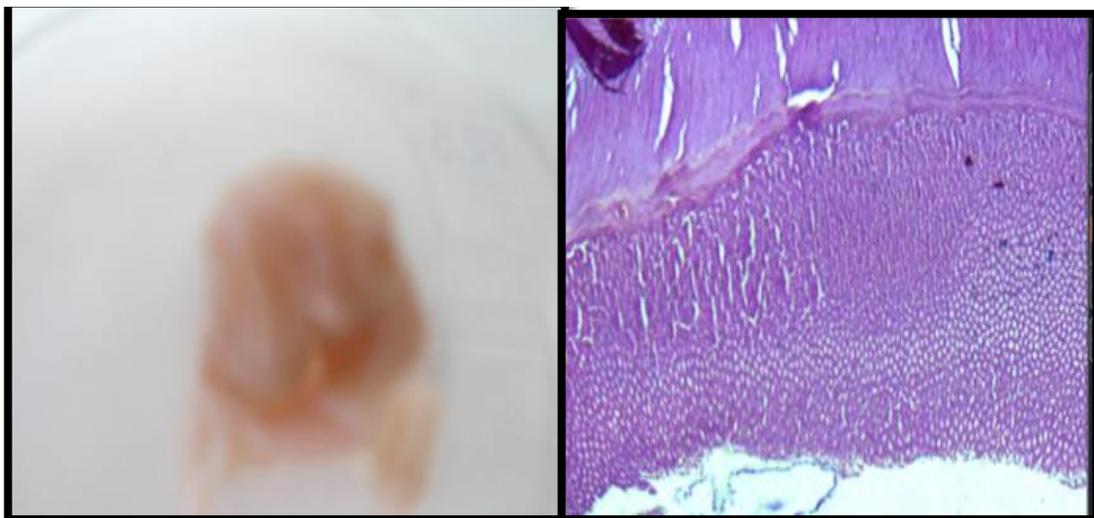


Figure 67. Aspect macroscopique et l'étude histologique de la muqueuse gastrique chez les rats prétraités avec URMeOH (200mg/kg p.c).

L'effet anti-ulcéreux des extraits méthanoliques de *H. albus* et *U. rupestris* est dû à leurs richesses en métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes, les saponines et les tanins qui ont été signalés connus par leur activité anti-ulcérogène et anti-gastrique [Nwafor *et al.*, 1996].

De nombreux travaux ont rapporté que les flavonoïdes et les tanins jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques [Martin *et al.*, 1993].

Les flavonoïdes sont des antioxydants hydrosolubles et des piègeurs puissants des radicaux libres qui empêchent l'ulcération et les lésions cellulaires oxydatives [Del-Rio *et al.*, 1992 ; Salah *et al.*, 1995].

Ce sont des composés majeurs qui sont connus par leurs effets antiulcéreux par l'inhibition des lésions de la muqueuse gastrique [Martin *et al.*, 1993].

Il a été également rapporté que les flavonoïdes assure une protection contre le cancer gastrique [Havsteen *et al.*, 2002].

Selon Havsteen *et al.*, (2005), l'effet antiulcéreux des flavonoïdes est dû à l'inhibition de la régulation de la phosphorylation des protéines. L'inhibition de la signalisation influence sur la protéine phosphatase qui inverse l'action de la protéine P- kinase (Fig.68).

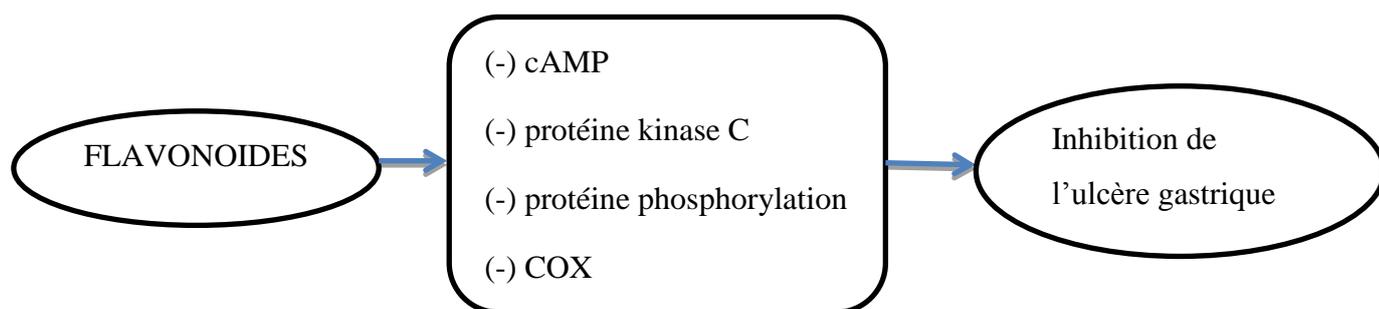


Figure 68. Mécanisme d'action des flavonoïdes dans l'ulcère gastrique [Havsteen *et al.*, 2005].

Selon les résultats de la mesure du volume de jus gastrique, nous avons constaté qu'il y a une diminution significative ($P < 0.05$) du volume de jus gastrique chez les rats traités par HAMEOH (200 mg/kg p.c) et par l'oméprazole par rapport au contrôle et aucune différence entre les rats traités avec URMeOH par rapport au contrôle (Fig.69).

En plus, nous avons constaté qu' il y a une augmentation hautement significative ($P < 0.0001$) de la valeur du pH chez les rats traités avec HAmEoH (100 et 200mg/kg p.c) avec des valeurs de (5.035 ± 0.035) et (5.240 ± 0.240) respectivement par rapport au contrôle qui présente un pH de (3.525 ± 0.1768) .

Encore une augmentation hautement significative ($P < 0.0001$) des valeurs de pH chez les groupes traités avec URMeOH (100, 200 mg/kg p.c.) et l'oméprazole par rapport au contrôle avec des valeurs de (5.355 ± 0.417) , (5.475 ± 0.332) et (6.94 ± 0.332) respectivement a été constatée (Fig.81).

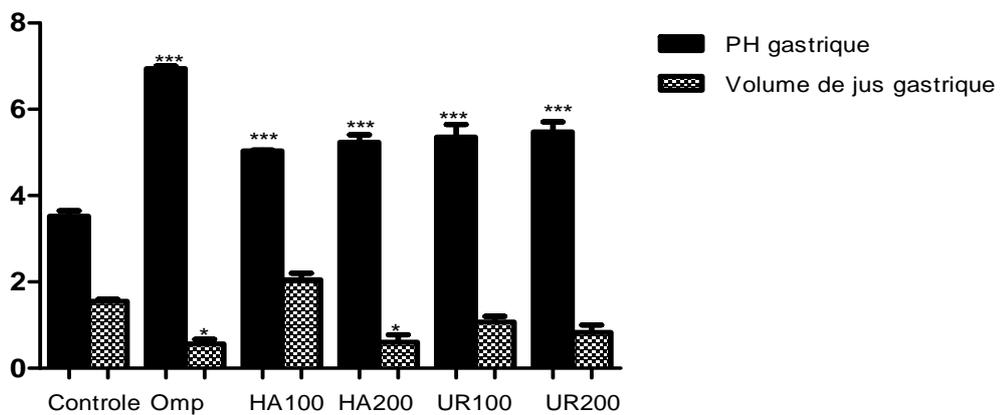


Figure 69. Effet de HAmEoH et URMeOH sur le pH gastrique et le volume de jus gastrique.

Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$.

Pour l'acidité totale, l'oméprazole a montré une diminution significative ($P < 0.05$) par rapport au contrôle. Et cette diminution a été remarquée d'une manière significative ($P < 0.05$) aussi chez le groupe traité avec HAmEoH 100 mg/Kg et 200 mg/Kg (Fig.70).

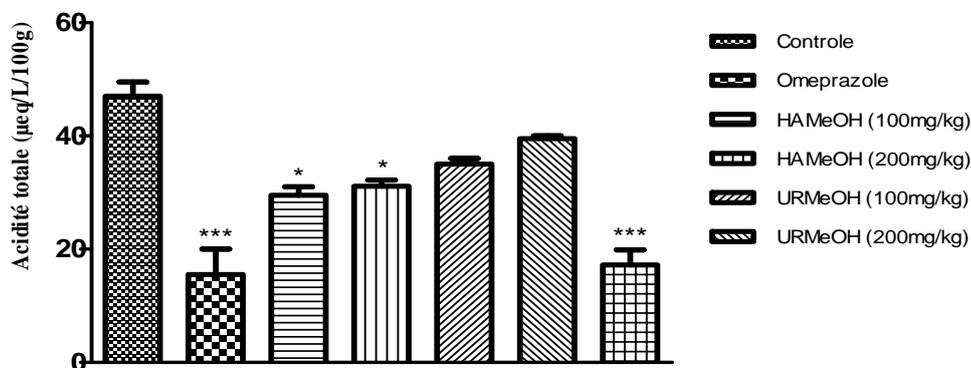


Figure 70. Effet de HAmEoH et URMeOH sur l'acidité totale ($\mu\text{eq/L/100g}$).

La gastrine est la seule hormone capable de réguler la sécrétion d'acide par l'augmentation de la masse des cellules pariétales et stimulation de l'expression de la pompe acide H⁺, K⁺-ATPase. Bien que les cellules pariétales expriment la protéine H⁺, K⁺-ATPase [Koh *et al.*, 1997 ; Friis-Hansen *et al.*, 1998].

Donc, il apparait que le mode d'action de l'extrait HAMEOH est similaire à celui de l'oméprazole, qui se lie très spécifiquement à une seule sous-unité de la H⁺, K⁺-ATPase à la surface sécrétoire de la cellule pariétale et l'inactive, et il permet de réduire la sécrétion d'acide quelle que soit la source de stimulation de sécrétion. L'oméprazole est efficace dans le traitement d'UGD et le reflux gastro-œsophagien après son utilisation soit à long ou à court terme [Ode et Asuzu ,2011].

Conclusion et perspectives

Le monde naturel est plein de plantes et d'autres sources qui sont à l'origine des molécules bioactives. Les sources de ces substances bioactives comprennent les plantes et les sources d'origine animale. Les molécules bioactives sont des molécules importantes qui sont biologiquement actives dérivées des sources naturels ou et par synthèse chimique.

Lors de ce travail, nous avons évalué quelques activités pharmaco biologiques de l'extrait méthanolique des feuilles des plantes *H.albus* et *U.rupestris*.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que les deux plantes sont riches en polyphénols et avec le test de $AlCl_3$ leur richesse en flavonoïdes.

L'évaluation des activités biologiques sur un model animal en utilisant des rats de type Wistar des extraits (HAMEOH et URMeOH) vis-à-vis aux pathologies très répandues dans notre pays comme le diabète, l'ulcère, la fièvre, la douleur, le cancer a montré qu'ils peuvent les exploiter dans le domaine pharmaceutique.

L'étude phytochimique par les techniques de purification CCM, HPLC préparative et d'identification par RMN des extraits a révélé la présence des produits importants comme les phénols glycosylés et les alcaloïdes dans *H.albus* et les lignanes et triterpène glycosylé dans *U.rupestris*.

Selon les résultats obtenus, on peut conclure que les extraits méthanoliques des feuilles des deux plantes ont montré des activités : antibactérienne, antioxydante, antidiabétique, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et anticancéreuse.

Nos résultats ont montré que tous les extraits méthanoliques testés témoignent d'activités biologiques *in vitro* et *in vivo*. Cependant d'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- 1) L'identification exacte de ces composés en rajoutant l'RMN à carbon 13 et l'RMN bidimensionnel.
- 2) Etude des activités biologiques des produits purifiés pour arriver aux principes actifs.
- 3) Pour l'activité anticancéreuse, une cytométrie à flux et Western blot sont nécessaires pour une très bonne évaluation et pour déterminer le mode de mort cellulaire.
- 4) Tester d'autres activités : l'activité néphroprotectrice contre les urolithiases, l'activité antispasmodique, l'activité antiparasitaire.

Bibliographie

Références

Abdel-Salam O. M. E., Czimmer J., Debreceni A., Szolcsányi J., and ozsik G. M', (2001). Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation, An overview, *Journal of Physiology Paris*, 95 (6):105–127.

Adeneye A.A. et Adokiye S.B., (2008). Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen- induced nephrotoxic rats, *J Ethnopharmacol*, 118:318–332.

Adesokan A.A., Owoyele B.V., Akanji M.A., Soladoye A.O., (2008). Effect of administration of aqueous and ethanol extracts of *Enantia chlorantha stem* bark on brewer's yeast induced pyresis in rats. *Journal of Biochemistry*; 2(7):165-169.

Adamse P. and Egmond V.H.P. (2010). Method development and analysis of mycotoxins and phycotoxins in food; Tropane alkaloids in food. *Food Safety* , 11:1-24.

Aitadafoun M., Mounieri C., Heymann S.F., Binistic C. , Bon C. and Godhold J., (1996). 4 Alkoxybenzamidés as new potent phospholipase A2, inhibitors. *Biochemical pharmacology*, 51:737-742.

Akowuah, G. A., Zhari, I., Norhayati, I., Sadikun, A. and Khamsah, S. M. (2004). Sinensetin, eupatorin, 3'- hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chemistry*, 87 (4): 559-566.

Al-Ashaal H.A., Aboutabl M.E., Maklad Y., El-Beih Y.A.,(2013). Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L.: *in vitro* production and pharmacological profile, *Egyptian pharmaceutical journal*, 12 (2):130-135.

Alghazeer R., El-Saltani H., Saleh N., Al-Najjar A., Hebail F.,(2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal libyan plants extracts. *Natural science*, 4 (5):325-333.

Allorge L., (1996). Madagascar centre de speciation et d'origine du genre *Kalancho* (crassulaceae) *Biogéographie de Madagascar*; 137-145.

Alves C.F., Alves V.B.F., de Assis I. P., et al. (2009), Antiinflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 1097-1104.

Alyassin D. et Ibrahim K., (1981). A minor haemoglobin fraction and the level of fasting blood glucose. *J.Fac.Med.Unive.Baghdad.*, 23:373-380.

Amritpal S.S., Samir M., Ravi S., (2008). Anti-inflammatory and analgesic agents from indian medicinal plants, *Int J. integr. Bio. Rev.*, 3(1): 51-72.

Anosike C.A., Obidoa O. and Ezeanyika L.U., (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20 (76):2-7.

Ariyphisi I., Toshiharu A., Sugimura F., Abe M., Matsuo Y., Honda T., (1986). Recurrence during maintenance therapy with histamine H2 receptors antagonist in cases of gastric ulcers. *Nikon University J Medical.*, 28:69-74.

Atmani D ., Nassima C ., Dina A ., Meriem B ., Nadjjet D ., Hania B ., (2009). Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science*; 5: 225-237.

- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 89: 27-36.
- Ayoola G.A., Coker H.A., Adesegun S.A., Adepoju A.A. , Obaweya K. , Ezennia E.C.,(2008).** Atangbayilal Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 3, 1019-1024.
- Azmi M.B. and Qureshi S.A.(2012).**Methanolic Root Extract of *Rauwolfia serpentina* Benth Improves the Glycemic, Antiatherogenic, and Cardioprotective Indices in Alloxan-Induced DiabeticMice. *Advances in Pharmacological Sciences*,1: 1-16.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., et al., (2010).** Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus L* extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae* , 1: 2. 128- 136.
- Bahorun T., (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritas*, p 83-94.
- Banerjee M., Pal S., Bhattacharya B., Ghosh B., Mondal S., Basu J. A.,(2013).** Comparative study of efficacy and safety of *gabapentin versus* amitriptyline as coanalgesics in patients receiving opioid analgesics for neuropathic pain in malignancy. *Indian J Pharmacol*, 45(4):334-338.
- Banerjee S., Sur T.K., Mandal S., Das P.C., and Sikdar S.,(2000).**Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 32 (1): 21–24.
- Bastos L.F., Merlo L.A., Rocha L.T., Coelho M.M.,(2007).**Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. *Eur J Pharmacol*, 576: 171-179.
- Begum A.S., Verma S., Sahai M., Schneider K., Sussmuth R., (2009).** Hyoscyamal, a new tetrahydrofuranolignan from *Hyoscyamus niger* Linn. *Nat Prod Res*, 23: 595–600.
- Begum A.S.,(2010).**Bioactive Non-alkaloidal Secondary Metabolites of *Hyoscyamus niger* Linn. Seeds: A Review. *Research Journal of Seed Science*, 3(4):210-217.
- Bonet A. M. et Valle`s J., (2007).** Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology*,110 (1):130-47.
- Bonet A.M., Parada M., Selga A., Valle`s J., (1999).**Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda` and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 68:145–168.
- Boros B ., Jakabova S ., Dornyei A ., Horvath G., Pluhare Z ., Kilar F., Felingera ., (2010).**Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species.*Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
- Borris R.P. (1996).**Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51(1):29–38.
- Brain K.R. et Turner T.D., (1975).** The practical evaluation of phytopharmaceuticals. 2nd Edn. *Bristol: Wright Science technica*, pp:81- 82.
- Brunelle J.K. et Letai A. (2009).**Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.*; 122:437–441.

- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575.
- Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G., Swinnen J.V. (2005).** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* 280: 5636-5645.
- Bunn, H.L., Gabby, K.H., and Gallop , P.M. (1978).** The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*, 200:21-27.
- Burlacu A., (2007).** Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*, 7:249-257.
- Campos J.J., Azevedo A.O, De Souza Filho J.D., Perez A.C., Braga F.C., (2013).** Bioguided isolation of myricetin-3-O-B-galactopyranoside with antinociceptive activity from the aerial part of *Davilla elliptica* St-Hil. *Journal of ethnopharmacology*, 150:270-274.
- Canadanović-B.J., Cetković G., Djilas S., et al., (2008).** Radical scavenging, antibacterial and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts, *Journal of Medicinal Food*, 11(1):133-1143.
- Carabaza A., Ricart M.D., Mor A., Guinovart J.J. and Ciudad C.J. (1990).** Role of AMPc on the activation of glycogen synthase and phosphorylase by adenosine, fructose and glutamine in rats hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 265:2724-2732.
- Carlo G.D., Autore G., IZZOA A., Moiolino P., Mascolo N., Viola P., Diurno M.V., Capawa F. (1993).** Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats; structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol*, 45:1045-59.
- Cartier O. et Roux D. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème édition wolters. Kluxer, P: 92.
- Catherine C., Malc S., Esther H.L., Vadimir A., Krutorslaikh, et al. (1996).** Lack of tumour-Promoting effects of flavonoids: studies on rat liver preneostatic foci and on *In vivo* and *In vitro* gap junctional inter cellular communication. *Nutr Cancer*, 26:251-63.
- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Sukan V., Ozek F., T., Baser K.H.C., (2007)** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*, , depending on location and seasonal variations. *Food chemistry*, 100 (2):553–559.
- Chang C.J., Tzeng T.F., Liou S.S., Chang Y.S., and Liu I.M. (2012).** Acute and 28-Day Subchronic Oral Toxicity of an Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith in Rodents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10:2-11.
- Chatterjea M.N, Shinde R. (1976).** Diabetes mellitus, textbooks of medical biochemistry. 5th edn. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi., pp: 34-57.
- Chattopadhyay R.R., (1999).** Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azardirachta indica* leaf extract. Part.V. *J. Ethnopharmacol.*, 67:373-376.
- Chau T.T. (1989).** Analgesing testing in animals model. in pharmacological methods in the control of inflammation. *Alan R. Liss, Inc*, pp 195-212.
- Chen Y.F., Tsai H.Y., Wu T.S. (1995).** Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med*, 61: 2-8.
- Chou C.C., Yang J.S., Lu H.F., (2010).** Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 33(8):1181-1191.

- Chou C.T., (1997).**The anti inflammatory effect of *Tripterygium wilfordii* Hook F on adjuvant induced paw edema in rats and inflammatory mediators release.*Phytotherapy Res*, 11:152-154.
- Cory S. et Adams J.M., (2002).** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2(9):647-556.
- Cotelle N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.*, 1: 569-590.
- I. 1. **Crombet R. T., Rak J., Pérez R.and Vilorio-Petit A.(2002).** Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody. *International journal of cancer*,111 (6):567-575.
- Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents.*Clinical Microbiology Reviews*, 12(4). 564–582.
- Critchfield J.W., Butera S. T., and Folks T.M., (1996).** Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12 (1):39– 46.
- Cushnie T. P. T.and Lamb A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5): 343–356.
- Dacosta Y. (2003).**Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris*, 317.
- Dashputre N.L. et Naikwade N.S.,(2011).** Evaluation of Anti-Ulcer Activity of Methanolic Extract of *Abutilon indicum* Linn Leaves in Experimental Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(2): 97-100.
- Daunay M.C. , Laterrot H., Janick J. (2007).** Iconography of the Solanaceae from Antiquity to the XVII th Century: a Rich Source of Information on Genetic Diversity and Uses. *Vith International Solanaceae Conference*, 745:59-88.
- Dawson J., Sedgwick A. D., Edwards J. C. W., and Lees P.,(1991).**A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in themouse. *International Journal of Tissue Reactions*, 13:4,171–185.
- Dedier P., (1994).** Travaux pratique de biologie. *Bordas Eds ; 2 : 54-83.*
- Delancy, C.A., Dunger A., Dimatteo M. et al.,(1995).** Comparison of inhibition of glucose stimulated insulin secretion in rats islets of Langerhans by STZ and methyl and ethyl nitrosoureas and methane sulphonates. Lack of correlation with nitric oxide releasing or alkylating ability. *Biochem. Pharmacol.*, 50: 2015-2020.
- Delporte C., Backhouse N., Negrete R., Salinas P., Rivas P., Cassels B. K. and Feliciano S. A. (1998).**Antipyretic, Hypothermic and Antiinflammatory Activities and Metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytotherapy research*, 12:118–122.
- Del-Rio A., Obdulio B.G., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., (1992).** Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.*, 45:4505-4515.
- De Pasquale R., Germano M.P., Keita A., Sanogo R., Iauk L. (1995).**Antiulcer activity of *Pteleopsis suberosa*. *J Ethnopharmacol* , 47(1):55-58.
- Deraedt R., Jouquey S., Delevallée F., Flahaut M., (1980).**Release of prostaglandins E and F in an allergic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* , 61(1):17-24.
- Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A., (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisés traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie* , 7:1073-1080.

- Dimo T., Fotio A., Nguelefack T., Asongalem E., and Kamtchouing P., (2006).** Antiinflammatory activity of leaf extracts of *Kalanchoe crenata* Andr. *Indian Journal of Pharmacology*, 38 (2): 115– 119.
- Dohou N ., Yani K ., Thahrouch S ., Idrissi Hassani L.M ., Badoc A ., mira G .N.(2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine; *Thynelaea lythroides* .*Bull..Soc.Pharm.Bordeaux*, 142:61-78.
- Dolara P ., Luceri C ., De Filippo C ., Femia AP ., Giovannelli L ., Carderni G ., Cecchini C ., Silvi S ., Orpianesi C ., Cresci A ., (2005).** Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*, 591: 237–246.
- Doss A., Vijayasanthi M., Parivuguna V., Venkataswamy R.,(2011).** Antimicrobial effects of the Flavonoid fractions of *Mimosa pudica* L. Leaves. *J Pharmacy Res.*, 4 (5):1438-1439.
- Doughari J.H. (2006).** Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn . *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*,5 (2): 597-603.
- Dramane S., (2010).** Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Cote d'Ivoire .*Euro Journal of Scientific Research* , 40 (2) :307-31 7.
- Duraisankar M., Ravichandran V., (2012).**Antipyretic Potential of Polyherbal Ayurvedic Products. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2):146-150.
- Eddy N.B. et Leimback D., (1953).**Synthetic analgesic. II. Dithienyl butenyl and dithienyl butylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 107: 385–393.
- El-Shazly A., Tei A .,Witte L., El-Domiati M. and Wink M., (1997).**Tropane alkaloids of *Hyoscyamus boveanus*,*H.desertorum*,*H.muti* and *H.albus* from E.*Chemical ecology* ,52:729-739.
- Elsner M.,Tiedj M.,Guldbakke B.,Munday R.,Lenzen S.,(2002).**Importance of GLUT 2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia*, 45:1542-9.
- Essawi T. et Srour M. ,(2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J.Ethnopharm*, 70: 343-349.
- Evans W.C. (2002).** Pharmacognosy. *15th edition W.B. Saunders, Toronto, Harcourt Pub Ltd.*, pp: 516-525.
- Feirrali M., Signormi C., Ciccolili L., Comporti M., (1992).**Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, devicene and iso-uranil. *Biochem Journal* , 285:295–301.
- Felicia V.S., Najla G., Ann P.C., Madeleine M., Keneeth K.C. (1996).** Inhibition of Human Breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoides and citrus juices. *Nutr Cancer*, 26:167-81.
- Ferjani A., Horiguchi G., Yano S. and Tsukaya H., (2007).** Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiology*, 144: 988-999.
- Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques* , pp 121-216.

- Foster S.J., Mc Cormick M.E., Howarth A., Aked D. (1986).** Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by leucotriene B₄, *Biochemical Pharmacology*, 35:1709–1717.
- Friis-Hansen L., Sundler F., Li Y. et al., (1998).** Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice. *Am J Physiol*, 274 :561–568.
- Garcia-Closas R., Gonzalez CA., Agudo A., Riboli E., (1999).** Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*, 10:71-75.
- Garg G., Nigam S., Ogle C., (1993).** Gastric antiulcer effects of the leaves of the neem tree . *Planta medica*, 59: 215-215.
- Gerdin B. et E. Srenso (1983).** Inhibitory effect of the flavonoid on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*, 2 (1): 39–46.
- Ghasemzadeh A. et Ghasemzadeh N. (2011).** Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (31):6697-6703.
- Gibellini L., Pinti M., Nasi M., De Biasi S., Roat E., Bertoncetti L., Cossarizza A., (2010).** Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin . *Cancers*, 2: 1288-1311.
- Goel R. K. et Bhattacharya S. K., (1991).** Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29(8):701–714.
- González-Tejero R. M., Casares-Porcel M., Sánchez-Rojas P.C., (2008).** Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 341–357.
- Gonzleza A.J., Garca-Barriusob M., Amichb F., (2010).** Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131:343–355.
- Goullé J.P., Pépin G., Dumestre T. V., Lacroix C. (2004).** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*. pp :22-35.
- Griffin W.J. et Lin G.D. (2000).** Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochem.*, 53:623-637.
- Grover S.A., Levington C., Paquet S. (1999).** Identifying adults at low risk for significant hyperlipidemia: a validated clinical index . *Journal of Clinical Epidemiology*, 52:49–55.
- Gupta R., Lohani M., Arora S.(2010).** Anti-inflammatory activity of the leaf extracts/fractions of *bryophyllum pinnatum* saliv.syn . *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1):16-18.
- Gupta R.K., Kesari A.N., Watal G., Murthy P.S., Chandra R., Tandon V.,(2005).** Nutritional and hypoglycemic effect of fruit pulp of *Annona squamosa* in normal healthy and alloxan-induced diabetic rabbits. *Ann Nutr Metab*, 49:407–413.
- Hanato T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T. (1988).** Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull*, 36: 2090–2097.

- Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H. and Poutanen K., (2010).** Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 1365-1402.
- Harborne J.B ., (1999).** An overview of antinutritional factors in higher plants. In: Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding Caygill JC and Mueller-Harvey I.eds. *Nottingham Univ Press, UK*; pp: 7-16.
- Harborne J.B. and Williams C.A. (2000)** .advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*,55: 481-504.
- Harrison A. P. and Bartels E. M. (2006).** A Modern Appraisal of Ancient Etruscan Herbal Practices.*American Journal of Pharmacology and Toxicology*,1(1): 21-24.
- Hartmann T., (1991).** Alkaloids. In herbivores; their interaction with secondary plant metabolites, Vol. I, The chemical participants, *2nd ed., G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds Academic press, San Diego*, pp: 33-85.
- Haslam E ., (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod*,59: 205–215.
- Hatano T., Kusuda M., inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T.,(2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66:2047-2055.
- Havsteen B.H. (2005).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids.*Pharmacology and Agents*, 26: 343-356.
- Havsteen B.H.(2002).**The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap*, 96: 67-202.
- He Q., Kim J., and Sharma R. P. (2004).** Silymarin protects against liver damage in balb/c mice exposed to fumonisin b1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. *Toxicological Sciences*, 80 (2): 335–342.
- Hegnauer R . (1988).** Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*, 27: 2423-2427.
- Heimler D ., Vignolini P ., Giulia Dini M ., Francesco Vincieri F ., Rmani A.(2006).**Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties *.Food Chemistry* ,99:464-469.
- Heller B., Burkle A., Radons J., fengler E., Jalowy A., Muller M., Bukkart V.. (1994).** Analysis of O2 Radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol. Chem.*, 375: 597-602.
- Hengartner M.O.(2000).** The biochemistry of apoptosis. *Nature* , pp: 770-776.
- Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyouss B. (2004):** Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals.*J Ethnopharmacol*, 91:43–50.
- Hirasawa N., Watanabe M., Mue S., Tsurufuji S. and Ohuchi K.(1991).**Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in airpouch- type carrageenan inflammation in rats. *Inflammation*, 15: 117-126.
- Ho S.T., Tung Y.T., Cheng K.H., Wu J.H.(2010).** Screening, determination and quantification of major antioxidants from *Balanophora laxiflora* flowers. *Food Chemistry*, 122; 584–588.

- Humam M., Bieri S., Geiser L., Munoz O., Veuthery J.L., Christen P. (2005).** Separation of four isomeric tropane alkaloids from *Schizanthus Grahamii* by non-Aqueous capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.* 16 :349-356.
- Hunskar S. et Hole K. (1987).**The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30 (1): 103–114.
- Ishrat T., Khan M.B., Hoda M.N., Yousuf S., Ahmad M., Ansari M.A., Ahmad A.S. and Islam F. (2006).**Coenzyme Q10 mod- brain antioxidants, streptozotocin & alloxan 7 ulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav. Brain Res*, 171:9- 16.
- Islam M. A., Afia Akhtar M., Khan M. R. I., Hossain M. S., Alam M. K., Wahed M. I. I., Rahman B. M., Anisuzzaman A. S. M., Shaheen S. M., and Maruf A., (2009)** .Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Different Fractions of *Catharanthus Roseus* (Linn.) on Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J. Sci. Res.*, 1 (2):334-344.
- Iwueke A.V. and Nwodo O. F.C. (2008).** Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistry*, 20: 63 – 70.
- Jaijoy K., Soonthornchareonnon N., Panthong A., Sireeratawong S. (2010).**Antiinflammatory and analgesic activities of the water extract from the fruit of *Phyllanthus emblica* Linn. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 3(2):28-35.
- Jamaluddin A.T., Nazmul Q., Asif A.M., Amran H.M., Shams K. M. , Apurba S.A.(2011)** .Analgesic activity of extracts of the whole plant of *Amaranthus spinosus* Linn. *International Journal of Drug Development & Research* ,3(4):189-193.
- Jelski W., Kozlowski M., Laudanski J., Niklinski J., and Szmikowski M.(2009).**The activity of class I, II, III, and IV Alcohol Dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) in esophageal cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(4):725–730.
- Jin S., Zhang Q.Y., Kang X.M., Wang J.X., Zhao W.H. (2010).**Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol*, 21:263-268.
- Johnston K., Sharp P., Clifford M., Morgan L.(2005).**Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, 579:1653–1657.
- Jouzier E.(2000).** Solanacées medicinales et philatelie Bull. *Soc Pharm Bordeaux*, pp : 144.
- Kadri A., Zarai Z., Békir A., Gharsallah N., Damak1M., Gdoura R.(2011).**Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(19):,3908-3914.
- Kampa M., Alexaki V.I., Notas G.,Nifli, A.P., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas, G., Boskou D.(2004).** Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*, 6: 63–74.
- Kanadaswami C., Lee L., Lee P.H., Hwang J., Ke F., Huang Y.(2005).** Antitumor activities of flavonoids, *In Vivo*, 19 (5): 895–909.
- Karou D., Savadogo A., Canini A., Yameogo S., Montesano C., Simpore J. , Colizzi V., Traore1 S.,(2005).** Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*.*African Journal of Biotechnology* , 4 (12):1452-1457.

- Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A.,(2007).**Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L.using a suitable extraction procedure. *Food Chem.*; 100: 584-589.
- Karunanayake E.H., Jeevathayaparan S., Tennekoon K.H., (1990).** Effect of *Momordica charantia* fruit juice on streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* ,30: 199-204.
- Kauffman J.G. et Grossman M., (1978).** Prostaglandin and cimetidine inhibit the formation of ulcers produced by parenteral salicylates. *Gastroenterol.*, 75 (6): 1099-1102.
- Khababae K. et Ree T.V. (2001).** Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18 : 641–649.
- Kelmanson J.E., Jager A.K., van Staden J. (2000).** Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 69: 241–246.
- Kerr J.F.R , Wyllie A.H and Currie A.R. (1972).**Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239–257.
- Khan A. et Gilani A.H. (2008).** Pharmacodynamic evaluation of *Terminalia bellerica* for its antihypertensive effect. *J. Food Drug Anal.*, 16: 6-14.
- Khan B.A., Abraham A., Leelamma S. (1995),** Hypoglycemic action of *Murraya Koenigii* (curry leaf) and *Brassica juncea* (mustard): Mechanism of action. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 32:106-108.
- Kirtikar K.R. et Basu B.D. (1984).** Indian medicinal plants. M/S Periodical Experts, *New Delhi*.pp: 1794.
- Kluger, M.J.(1991).** Fever. Role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.*,71:93-127.
- Kobayashi Y.,Suzuki M., Satsu H., Arai S., Hara Y., Suzuki K., Miyamoto Y., Shimizu M.(2000).** Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism, *J. Agric. Food Chem.*, 48:5618–5623.
- Koh T.J., Goldenring J.R., Ito S., Mashimo I., Kopin A.S., Varro A., Dockray G.J., and Wang T.C. (1997) .** Gastrin deficiency results in altered gastric differentiation and decreased colonic proliferation in mice. *Gastroenterology*, 113:1015–1025.
- Kok T.W., Yue P.Y., Mak N.K., et al (2005).** The anti-angiogenic effect of sinomenine. *Angiogenesis*, 8:3-12.
- Konrad A. et Kudlow J.E., (2000).** Modified method of islet isolation preserves the ability of pancreatic islets to increase protein O-glycosylation in response to glucose and streptozotocin. *Arch Biochem Biophys.*, 381(1):92-98.
- Kore K.J., Shete R.V., Desai N.V. (2011).** Anti-Arthritic activity of Hydroalcoholic extract of *Lawsonia Innermis*. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(4):217-224.
- Kumar G.P.S.,Arulselvan P.,Kumar D.S. and Subramanian S.P.(2006).**Antidiabetic activity of Fruits of *Terminalia chebula* on Streptozotocine induced diabetic rats. *Journal of health science*, 52 (3):283-291.
- Kumar R., Balaji S., Uma T.S., Sehgal P.K. (2009).**Fruit extracts of *Momordica charantia* potentiate glucose uptake and up-regulate Glut-4, PPAR gamma and PI3K. *J. Ethnopharmacol.*, 126:533–537.

- Kumar S. and Pandey A.K. (2013).** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: Overview. *The Scientific World Journal*, 2(16):2-16.
- Kurokawa M., Yamamura J., Li Z., Sato H., Hitomi N., Tatsumi Y., et al.(1998).** Antipyretic activity of ginyo-san, a traditional medicine, in influenza virus-infected mice. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 46(9):1444-14447.
- Lai H.Y. et Lim Y.Y., (2011).** Antioxidant Properties of Some Malaysian Ferns. *IACSIT Press, Singapore*, 20:3-12.
- Lal V.K., Gupta P.P. and Awanish P. (2012).** Hypoglycemic Effect of *Kyllinga Triceps* in STZ Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Metab.*, 3(6):2-3.
- Lamb G.M. (1981).** Manual of veterinary techniques in Kenya. *2nd edition. Vol 2 Kenya, Ciba-Geigy*, 100-104.
- Lamson D.W. et Brignall M.S.,(2000). Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative Medicine Review*,5(3):196–208.
- Lau C.B., Ho C.Y., Kim C.F., Leung K.N., Fung K.P., Tse T.F., Chan H.H., Chow M.S.(2004).**Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sci.*, 75 : 797–808.
- Ledoux S.P. et Wilson G.L.(1984).** Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 804:387–392.
- Ledoux S.P., Woodley S.E., Patton N.J., Wilson G.L. (1986).**Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes*, 35:866–872.
- Lee M.R. (2006).** Solanaceae III: henbane, hags and Hawley Harvey Crippen. *J R Coll Physicians Edinb*,36: 366–373.
- Lee S.B. et Park H., (2010).** Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 : 891-896.
- Leelavinothan P. et Saravanan G.(2006).** Effects of *Syzygium Cumini* bark on blood glucose, plasma insulin and C-peptide in streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*,4: 96-105.
- Lenzen S., (2008).** The mechanisms of Alloxan- and streptozotocin- induced diabetes. *Diabetologia*, 51:216-226.
- Lim J.H., Park J.W., Min D.S., Chang J.S., Lee Y.H., Park Y.B., Choi K.S., Kwon T.K.,(2006).** NAG-1 up-regulation mediated by EGR- 1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis*, 12:411-421.
- Lip nick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Goddard M., Segal L., Springer J.A., Myers R.C.,(1995).** Comparison of the up and down, Conventional LD50 and fixed dose Acute toxicity procedures. *Fd Chem. Toxicol.*, 33:223- 31.
- Liu H., Mou Y., Zhao J., Wang J., Zhou L., Wang W.D., Han J., Yu Z., Yang F. (2010) .** Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules*, 15(10):7933-7945.
- Lock O., Cabello I., Doroteo V.H., (2006).** Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 6-11.

- Loomis D. and Croteau R. (1980).** Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. *Stumpf and E. E. Conn (eds.)*. Academic Press, San Francisco, pp. 364-410.
- Lorenz W., Kusche J., Barth H., Mathias C.H. (1973).** Action of several flavonoids on enzyme of histidine metabolism *in vitro*. *Ed. Cz. Maslinski*, pp. 265-269.
- Loubaki C. B., Ouattara s. A., Ouattara T. A. C., Ouedraogoffraore R., Traore s. A., (1999).** Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum*[Cesalpiniaceae (Guill et Pertj)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au Burkina Faso. *Sciences et Médecine*, 1: 66-73.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Allemand J.C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes*, P 4-5.
- Madhu C., Hindu K., Sudeepthi C.D., Maneela P., Venkat R.K., Bhagya S.B.(2012).**Anti Ulcer Activity of Aqueous Extract of *Aegle marmelos* Leaves on Rats, *Asian J. Pharm. Res.* 2(4):132-135.
- Magdy M.D.M., Eman R.E., Azza A.M.(2013).** Cytotoxic flavonoids from *Diplotaxis harra* (Forssk) Boiss. growing in Sinai. *J. Med. Plants Res.* 7 (1):19-23;
- Mahmood U., Yogendra S., Raghunath S., Thakur R. (2001).** 2,3-dimethylnonacosane and tropane alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*; 24(7):1618-1619.
- Malairajan P., Gopalakrishnan G., Narasimhan S., Veni K.J.K., and Kavimani S. (2007).** Antiulcer activity of crude alcoholic extract of *Toona ciliata* Roemer (heartwood). *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 348-351.
- Manickam M., Ramanathan M., Farboodiny Jahromi M.A., Chansouria JPN, Ray AB. (1997).** Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of Natural Products.*; 60:609-610.
- Manjamalai A., Shukoor S.A., Haridas A., Berlin Grace V.M.(2011).** Evaluation of antifungal and anti-inflammatory effect on methanolic extract of *Wedelia chinensis* leaves, *Int J Pharm Biomed Res*, 2(1), 30-37.
- Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H. (2001).** Inhibitory effect of (+)-catechin on the growth of influenza A/PR/8 virus in MDCK cells. *Planta. Med.* ;67: 240-243.
- Marchand L.L.(2002).** Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 296-301.
- Marhuenda E., Martin M. J., and Alarcon C. De La Lastra (1993).** Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models, *Phytotherapy Research*, 7(1):13-16.
- Martin M.J., Motiva V., de la Lastra A.C.(1993).** Quercetin and naringenin ; Effect on the leaf aqueous extract on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Journal of Ethnopharmacology* (54) : 139-153.
- Math P., Mishra D.K., Prajapati P.K., Roshy J., Jha P.K.(2011).** Antipyretic activity of Madhukadi and Madhukadi Ghana-An Experimental study. *International Journal of Pharmaceutical & biological Archieve.* ; 2(1):572-6.
- Mavundza E.J., Tshikalange T.E., Lall N., Hussein A.A., Mudau F.N., Meyer J.J.M.(2010).** Antioxidant activity and cytotoxicity effect of flavonoids isolated from *Athrixia phylicoides*. *J Med Plant Res.*, 4:2584-2587.

- McCalley D.V. (2002).** Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. *Journal of Chromatography A*. 967:1–19.
- Middleton E Jr., Kandaswami C., Theoharides TC.,(2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. rev.*, 52:673-751.
- Miladi S. et Damak M., (2008)** *In vitro* antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*; 10: 101-109.
- Mishra A.K., Mishra A.,Kehri H.K., Sharma B., and Pandey A.K. (2009).** Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extract against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*,the pathogenic dematiaceous moulds.*Annals of clinical microbiology and Antimicrobials*, 8 (1): 16–25.
- Mishra A., Sharma A. K., Kumar S., Saxena A. K., and Pandey A. K. (2013).***Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *BioMed Research International*, Article ID 915436, 10 pages.
- Mohammed A., Tanko Y., Okasha M.A., Magaji R.A., Yaro A.H.,(2007).** Effects of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* on blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Afr J Biotechnol.*,6 (18):2087–2090.
- Moleiro F. C., Andreo M. A., Santos R. D. C. D. et al., (2009).** *Mouriri elliptica*: validation of gastroprotective, healing and anti- *Helicobacter pylori* effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3): 359–368.
- Moradi M., Ghosian M.H, Yaghout E.P. (2013).** Assessment of *Hyoscyamus niger* seeds alcoholic extract effects on acute and chronic pain in male NMRI rats. *Basic and Clinical Pathophysiology*, 1(1):29-36.
- Mori A., Nishino C., Enoki N., and Tawata S., (1987).**Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26 (8):2231–2234.
- Mosmann T., (1983).** “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63.
- Mounnissamy V.M., Kavimani S., Balu V., Drlin Q., (2008).** Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Canjara rehedi*. *Iranian J Pharmacol Therapeut*, 6:235–237.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., & Lema, J. M. (2000).** Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9):3890–3897.
- Mozhgan F.S., Seyed B.J., Bahareh H., (2011).** The *Cuscuta kotschyana* effects on breast cancer cells line MCF7. *J. Med. Plants Res.* 5(27):6344-6351.
- Murat U., Mustafa T., Serpil O., Yusuf M., Gulden K. (2011).** Apoptotic and necrotic effects of carboxylated quercetin/polyethylenimine complex on HeLa cells. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, 5:894-902.
- Murata M., Takahashi A., Saito I,Kawanishi S. (1999).**Site- Specific DNA methylation and apoptosis : induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* ,57:881-887.

- Nakahara K., Kawabata S., Ono H. et al., (1993).**Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: (4):968–973.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traore D., Akéassi L.,(2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* , 6 (1), 1-15.
- Ngameni B., Kuete V., Simo IK., Mbaveng AT., Awoussong PK., Patnam R., Roy R., Ngadjui B.T.,(2009).** Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African J Botany*, 75: 256-261.
- Nikaido H. et Vaara M.(1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 1: 1-32.
- Nichenametla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J.H.,(2006).** A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci.*, 46:161–183.
- Nirmal K.P., Subhasish G., Indrani C., (2013).** *Jussiaea repens L.* is a nontoxic antigonadal herb – a dose dependent study on male rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 4 (2):131–143.
- Njar V., Adesanwo J., Raji Y. (1995).** Methyl Angolenate: Antiulcer Agent from the Stem Bark of *Entandrophragma angolense*. *Planta Medica.*, 61: 91-91.
- Nwafor, P.A., Effrain, K.D., Jack, T.W. (1996).** Gastroprotective effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. *West African Journal of Pharmacology and Drug research*, 12:46-50.
- Ode O. J. et Asuzu, O. V.,(2011).**Investigation of *cassia singueana* leaf extract for antiulcer effects using ethanol-induced gastric ulcer model in rats. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1:1–7.
- Ohemeng K. A., Schwender C. F., Fu K. P., and Barrett J. F, (1993).**DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3(2):225–230.
- Oluwole F. S., J. A. Ayo, B. O. Omolaso, B. O. Emikpe, and J. K. Adesanwo, (2008).**Methanolic extract of *Tetracera potatoria*, an antiulcer agent increases gastric mucus secretion and endogenous antioxidants. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 23(2): 79–83.
- Ordonez A.A.L.,Gomez J.D.,Vattuone M.A.,Isla M.I.(2006).**Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jaq.),Swart extract. *Food chem.*,97: 452-458.
- Osborn A ., (1996).** Performed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plan cell*, 8: 1821-1831.
- Oto G., Ozdemir H., Yaren B., Yetkin Y., Tas A., Tanritanır P., Öztürk F.(2013).** Antinociceptive activity of methanol extract of *Hyoscyamus reticulatus L.* in mice. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(2):117-123.
- Oyedemi S.O., Adewusi E.A., Aiyegoro O.A., and Akinpelu D.A., (2011).** Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azelia africana* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 1(5): 353–358.
- Ozen E., Pons A., and Tur J. A., (2012).** Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 70(8):472–481.

- Paiva L., Rao V., Gramosa N., Silveira E. (1998).** Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 62: 73-78.
- Pal A. et Pawar RS.,(2011).** A Study on *Ajuga bracteosa* wall ex. Benth for analgesic activity. *Int J Cur Bio Med Sci.*; 1(2): 12 – 14.
- Palazón J, Navarro-Ocaña A., Hernandez-Vazquez L.and Mirjalili M.H. (2008).** Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine.*Molecules*.13: 1722-1742.
- Pandey A.K., Mishra A.K., Mishra A.,Kumar S. and Chandra A.,(2010).**Therapeutic potential of *C.zeylanicum* extracts: an antifungal and antioxidant perspective.*International journal of Biological and Medical research* ,1:228-233.
- Pantoja C.V., Chiang L.C., Norris B.C. and Concha J.B. (1991).** Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anaesthetized dogs. *Ethnopharmacology*; 31:325-31.
- Pari L. et Latha M. (2002).**Effect of *Cassia auriculata* flowers in blood sugar levels , serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats .*Singapore Med.J.*,43:617-621.
- Park C.E., Kim M.J., Lee J.H., Min, B.I., Bae H., Choe W., Kim S.S., Ha J.(2007).** Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp. Mol. Med.*, 39:222–229.
- Parmar N.S. et Parmar S.(1998).**Anti-ulcer potential of flavonoids. *Indian J Physiology and Pharmacology*, 42: 343-51.
- Pattabiraman K. et Muthukumaran P.(2011).** Antidiabetic and Antioxidant Activity of *Morinda tinctoria roxb* Fruits Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Asian J. Pharm. Tech.*; 1(2):34-39.
- Pawlak Z., Bylka W., Jazurek B., Matlawska I., Silkorska M., Manikowski H., Bylka G.B., (2010).**Antioxidant activity of flavonoids of different polarity, assayed by modified ABTS cation radical decolorization and EPR technique. *Acta biologica cracoviensla*, 57 (1): 97-104.
- Pieper A.A., Brat D.J., Krug D.K., Watkins C.C., Gupta A., Blackshaw S., Verma A.,Wang Z., and Snyder S.H.(1999).**Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabete . *Proc Natl Acad Sci USA.*; 96(6): 3059–3064.
- Pieroni A., Quave L.C., Santoro F.R. ,(2004).** Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* ; 95:373–384.
- Pozzili A., Signore A., Leslie R.D.G.(1997).**Infections immunity and diabetes in diabets mellitus. *2nd edition in internatuinal text book*, pp: 1231 1241 .
- Pratima H. et Methad P. (2011).**pharmacognosie evaluation and phytochemical analysis of *Cajanus cajan*. *Journal of advances in Developpement Research*, 2(2) : 181-185.
- Quetin-Leclercq J. (2002).** Le Voyage Insolite De La Plante Au Médicament . *Journal de Pharmacie de Belgique* ,57 :11-20.
- Quézel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionales. vol.2 *CNRS. Paris*. P: 824.
- Rabi T .et Bishayee A . (2009).** Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat*; 115: 223-23.

- Rahman S., Salehin F., Iqbal A.,(2011).** *In vitro* antioxidant and anticancer activity of young Zingiber officinale against human breast carcinoma cell lines.*BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(76):2-7.
- Rajalingam R., Srinivasan N., Govindarajulu P.(1993)** Effect of alloxan induced diabetes on lipid profiles in renal cortex and medulla of mature albino rats. *Indian J Exp Biol* , 31:577-579.
- Raju D ., Ilango K ., Chitra V ., Ashish K .,(2009).** Evaluation of Anti-ulcer activity of methanolic extract of Terminaliachebulu fruits in experimental rats. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 1(3): 101-107.
- Rao M. S. et Reddy J. K. (1978).** Malignant neoplasms in rats fed lasiocarpine. *Br. J. Cancer* 37:289–293.
- Ratty A.K. (1988).** Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metabol Biol* ,39:67-79.
- Reichert J.A., Daughters R.S., Rivard R., Simone D.A. (2001).** Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain*,89:221–227.
- Reuter S., Eifes S., Dicato M., Aggarwal B.B., Diederich M. (2008).** Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.*, 76:1340–1351.
- Rhemann U.A. et Khurshid Z.(1989).** Medicinal plants with hypoglycemic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 26: 1-55.
- Rhoads G.G., Gulbrandse C.L., Kagan A., (1976).**Serum lipoproteins and coronary artery disease in a population study of Hawaiian Japanese men. *New Engl J Med.*, 294:293–298.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* ,20: 933-956.
- Roesler W.J. et Khandarwal R.L.(1986).**Quantification of Glycogen synthase and phosphorylase protein mouse liver. Correlation between enzymatic protein and enzymatic activity *Arch.Biochem.Biophys.*,244:397-407.
- Roudsari M., Chang P., Pegg R., Robert T., (2009).** Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*, 114:717–726.
- Rufino M.M., Alves R.E., Brito E.S., Jiménez J.P., Calixto F.S., Filho J.M.,(2010).** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 10: 996–1002.
- Ruiyc (1991).** Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 86:79-85.
- Sacchetti J.C . et Poulter C.D. (1997).** Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277: 1788-1789.
- Sagdic O., Karahan A.G.,Ozcan M.,Ozcan G. (2003).**Effect of some spice extracts on bacterial inhibition.*Food Science and Technology International*,9 (5):353-356.
- Sairam K., Rao C.V., Goel R.K. (2001).** Effect of *Centella asiatica* linn on physical and chemical factors induced gastric ulceration and secretion. *Indian J Exp. Biol*, 39:137-142.
- Sajeli B., Sahai M., Suessmuth R., Asai T., Hara N., and Fujimoto Y.,(2006).** Hyosgerin, a New Optically Active Coumarinolignan, from the Seeds of *Hyoscyamus niger*. *Chem.Pharm.Bull*; 54(4): 538-541.

- Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C.,(1995).** Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals as chain breaking antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 2:339–346.
- Sannomiya M., Fonseca V. B., Da Silva M. A.(2005).** Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 97:1, 1–6.
- Santos A.R. et Calixto J.B. (1997).** Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, 31(4):381-9.
- Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Inuma M.,(1995).** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics *Phytother. Res.* 9 (7):509- 09.
- Savage M.W., Dhatariya K. K., Kilvert A., Rayman G., Rees J. A. E., Courtney C. H., Hilton L., Dyer H. P. and Hamersley M. S., (2011).**Diabetes UK Position Statements and Care Recommendations, *Diabet. Med.* 28: 508–515.
- Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. (1994).** STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43(11):1326–1333.
- Schofield P ., Mbugua D.M., Pell A.N.(2001).**Analyses of condensed tannins: a review *.Animal Food and Technology*,91:21-40.
- Scognamillo-Szabó M.V., Bechara G.H., Ferreira S.H., Cunha F.Q. (2004).** Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats, *Annal of New York Academy of Science*; 1026: 251–256.
- Seighmund E, Cadmus R and Lu G. (1957).** Proc Soc Exp Biol Med.; 95:729.
- Sengupta S., Velpandian T., Kabir S.R., Gupta S.K. (1998).**Analgesic efficacy and pharmacokinetics of topical nimesulide gel in healthy human volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac and placebo. *Eur J Clin Pharmacol.*; 54(7):541-547.
- Shah B.N. et Seth A.K.,(2010).** Medicinal plants as a source of Anti-pyretic Agents.A Review *Advances in Bioreserach* ,1:10-16.
- Shahidi F, Yang Z, Saleemi ZO. (1998).** Natural flavonoids as stabilizers. *J Food Lipids* 1998; 1: 69-75.
- Sheela C.G. et Augusti K.T. (1992).** Antidiabetic effects of S-allylcysteine sulfoxide isolated from garlic *Allium sativum* L. *Indian J. Exp. Biol.* 30:523-526.
- Shende V.S.,Sawant V.A.,Turuskar A.O.,Chatap V.K.,Vijaya C.,(2009).**Evaluation of hypoglycemic and antihyperglycemic effects of alcoholic extracts of *Chenomorpha* normal and Alloxan induced diabetic rats.*Pharmacognosy magazine*,5(19):36-41.
- Shibata M., Ohkubo T., Takahashi H., Inoki R. (1989).** Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38(3):347-52.
- Shinde U.A., Phadke A.S., Nair A.M., Mungantiwar A.A., Dikshit V.J., Sarsf M.N.(1989).** Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70:251–257.

- Siess M. H., Le Bon A. M., Canivenc-Lavier M. C. et al.,(1996).**Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (8): 2297–2301.
- Singh S., Majumdar D.K., and Rehan H.M.S. (1996) .** Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 54 (1):19– 26.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Skehan P. (1990).**New colorimetric cytotoxicity assay for anti cancer drug screening. *J.Natl. Cancer Inst.*; 82: 1107-1112.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., Mahon M.J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenny S., Boyd M.R. (2003).** New colorimetric cytotoxicity assay for anti cancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.*, 82: 1107-1112.
- Smith G.F. et Figueiredo E., (2011).** *Umbilicus rupestris*: an interesting member of the *Crassulaceae* in Portugal *Cactus and Succulent Journal*, 83(5):232-235.
- Sowemimoa A., Onakoyaa M. , Fageyinbob M.S., Fadojua T,(2013).** Studies on the anti-inflammatory and antinociceptive properties of *Blepharis maderaspatensis* leaves. *Rev Bras Farmacogn*, 23: 830-835.
- Stalikas C. D. (2007).** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30:3268-3295.
- Stanković M. S., Radojević I.D., Stefanović O.D., Topuzović M.D., Čomić L.R., Branković R.S.(2011).** Immortelle (*xeranthemum annuum* l.) as a natural source of biologically active substances. *journal of pharmacology*, 10:230-239.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., (2002).**High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups .*Review Journal of Chromatography A.* 967: 85–113.
- Sumana G. et Suryawashi S.A. (2001).**Effect of vinca rosea extracts in treatenent of alloxan diabetes in male albino rats.*Indian Journal of Experimental Biology*, 39:748–758.
- Swanston-Flatt S.K., Day C., Bailey C.J., Flatt P.R. (1990).** Traditional plant treatment for diabetes: studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*,33:462–464.
- Sylvester P.W.(2011).**Optimization of the tetrazolium dye (MTT).Colorimetric assay for cellular growth and viability.*Mol. Biol.*, 716 157–168.
- Terpinc P., Bezjak M., Abramovic H.,(2009).** A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 10:1016.
- Tipnis, H.P., Bajaj, A. (2003) .**Clinical pharmacy. *1st ed., Career Publication, Nashik*,pp: 80-81.
- Tiwari and Kakkar H.P.A.(1990).** Phytochemical examination of *Spilanthus acemella* (Murr.). *Journal of the Indian Chemical Society*, 67 (9):784–785.
- Tjälve H. (1983).** Streptozotocin: distribution, metabolism and mechanisms of action. *Uppsala J. Med. Sci.* , 39:145-147.

- Tjolsen A., Berge O. G., Hunskaar S., Rosland J.H., and Hole K. (1992).** The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1):5–17.
- Treas G. E et Evans W.C. (1983).** Pharmacognosy, 12 th Ed. Bailliers and Tindall. London, pp: 45-47.
- Tunon M. J., Garcia-Mediavilla M. V., Sanchez-Campos S., and Gonzalez-Gallego J., (2009).** Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism*, 10 (3): 256–271.
- Turner R. (1965).** Acute toxicity: The determination of LD₅₀. In: Screening Methods in Pharmacology. New York: Academic Press; p. 61-3.
- Tsuchiya H. et Inuma M. (2000).** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7:161–5.
- Urmila J.J., Amol S.G., Priscilla D.M., Ragini S., Sudha S., Girijesh G. (2011).** Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of Quercetin and its analogues. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 2(4):1756-1766.
- Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S (1998)** Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395:281–284.
- Uthurry C.A.,Hevia D., Gomez-Cordoves C.,(2011).**Role of honey polyphenols in health. *Journal of Api Product & Api Medical Science* ,3 (4):141-159.
- Valdes B., Talavera S. and Fernandez-Galiano E. (1987).**Flora Vascular de Andalucía Occidental, vol. 2 Ketrès éditoria. Barcelona.p.361.
- Versantvoort C.H., Schuurhuis G.J., Pinedo H.M., Bekman C.A., Kuiper C.M., et al.(1993)** Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-p-glycoprotein mediated multidrug resistant tumor cells. *Br J Cancer* , 68:939-46.
- Vidya P.R., Senthil M.R., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S., (2010).** The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition. *Eur. J. Pharm.*; 649(3): 84-91.
- Vincken JP ., Heng L ., de Groot A ., Gruppen H .,(2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom.*Phytochemistry*, 68(3):275–297.
- Vishnu C.N.; Mohan S.S.; Banerji A., Gopalakrishnapillai A. (2009).** Kaempferitrin inhibits GLUT4 translocation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380 (1):39–43.
- Wagner J.G. et Roth A.R.(2000).** Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacology Reviews Online*, 52: 349 –374.
- Wallace J.L. (1992).** Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection, *Gastroenterology Clinics of North America*, 21(3): 631–641.
- Walum E. (1998).** Acute oral toxicity. *Environ. Health Perspect*, 106:497- 503.
- Weissmann G., Smolen J.E., Korchak H.M. (1980).** Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *New England Journal of Medicine*, 303: 24 –27.

- Wilson G.L., Hartig P.C., Patton N.J., Ledoux S.P.,(1988).** Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and Cellular distribution . *Diabetes*, 37: 213-216.
- Winter C.A., Riseley E.A. and Nuss G.W.(1962).** Carrageenan-induced Oedema in the Hind Paw of the rats as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111:544- 547.
- Woodman O.L., Meeker W.F., Boujaoude M. (2005).** Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc.Pharmacol.*, 46 : 302-309.
- Xiao G., Fang H., Xing C., Xu W. (2009).** Structure, Function and Inhibition of Bcl-2 Family Proteins:A New Target for Anti-Tumor Agents. *Mini Rev Med Chem.*, 9:1596–1604.
- Yamamura S., Ozawa K., Ohtani K., et al. (1998).** Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*, 48 (1): 131-136.
- Yamamoto H., Uchigata Y., Okamoto H. (1981).** Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294:284–286.
- Yanez J., Vicente V., Alcaraz M., Castillo J., Benavente-Garcia O.,Canteras M., Teruel J.A.L., (2004).** Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr. Cancer*, 49:191-199.
- Yang J., Guo J., Yuan J., (2008).** *In vitro* antioxidant properties of rutin .*LWT*, 41:1060-1066.
- Yanishlieva N.V. et Marinova E.M., (1995).** Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, 54:337-382.
- Zhang Z.F.,Li Q., Liang J.,Dai X.Q., Ding Y., Wang J.B., LiY.(2010).** Epigallocatechin-3-Ogallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine*, 17:14–18.
- Zhi-yun Z., Ming L.A., D'Arcy W.G.(1994).** SOLANACEAE. *Flora of China* 17: 300–332.

Annexe

Les produits obtenus de HPLC sont analysés avec RMN à 350 MHz et ont donné les spectres suivants :

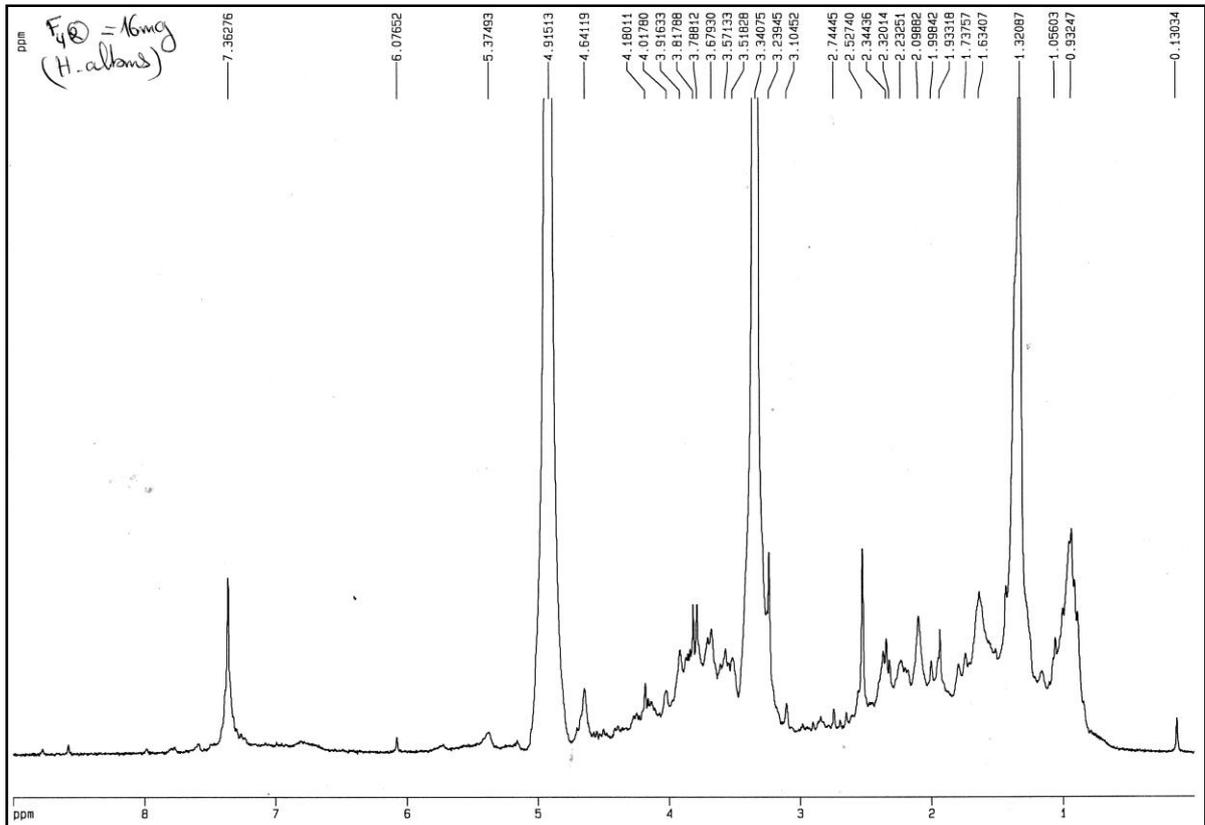


Figure 01. Spectre RMN ^1H (350 MHz) du produit F4-2 de *H. albus*.

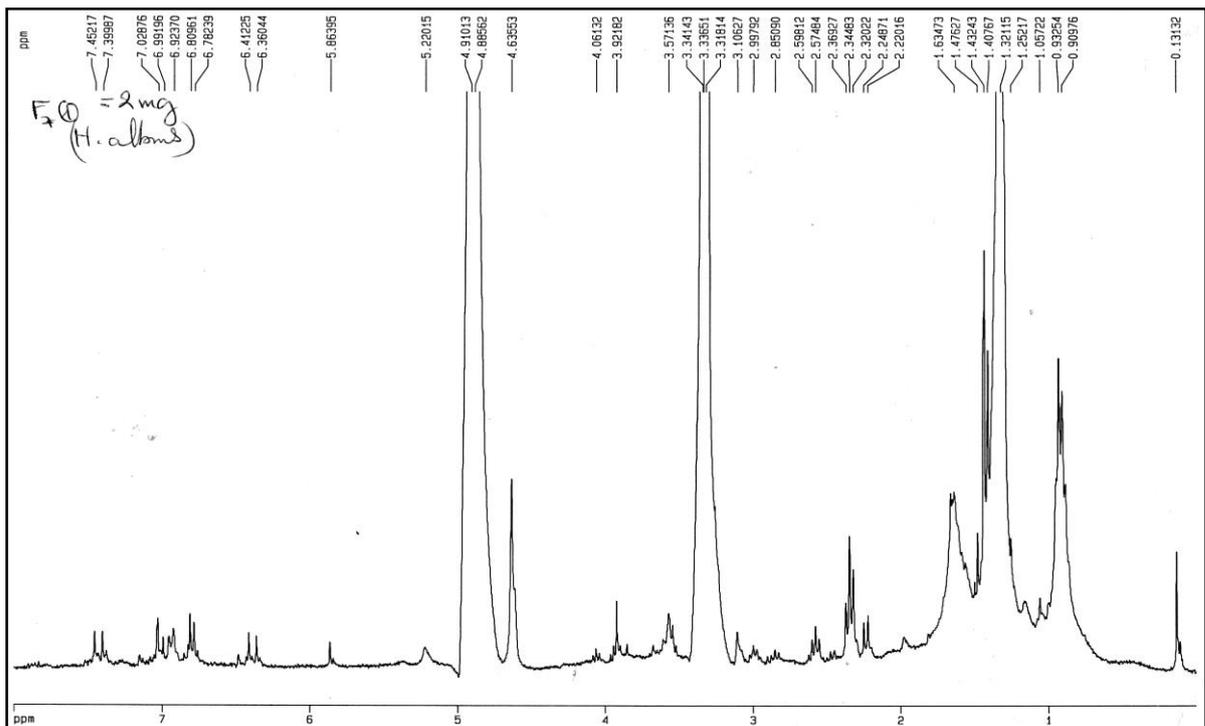


Figure 02. Spectre RMN ^1H (350 MHz) du produit F7-1 de *H. albus*.

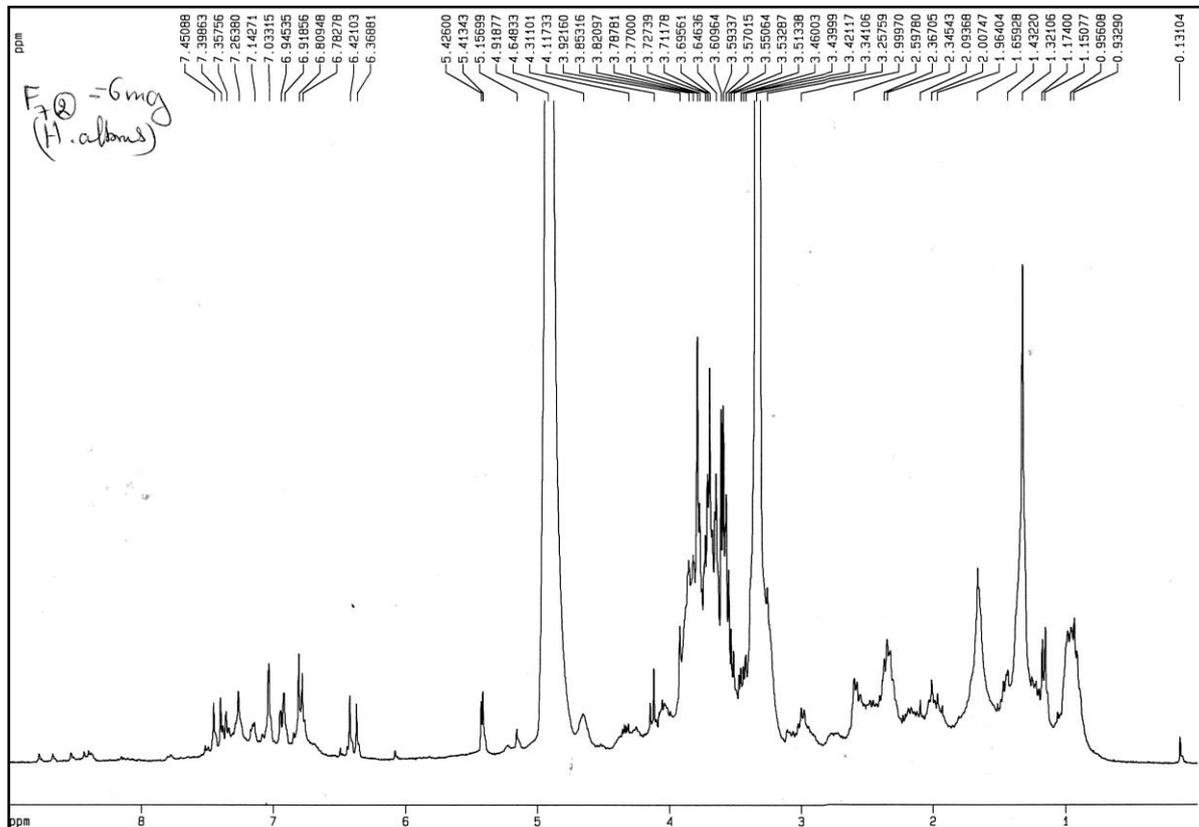


Figure 03. Spectre RMN ^1H (350 MHz) du produit F7-2 d'*H. albus*.

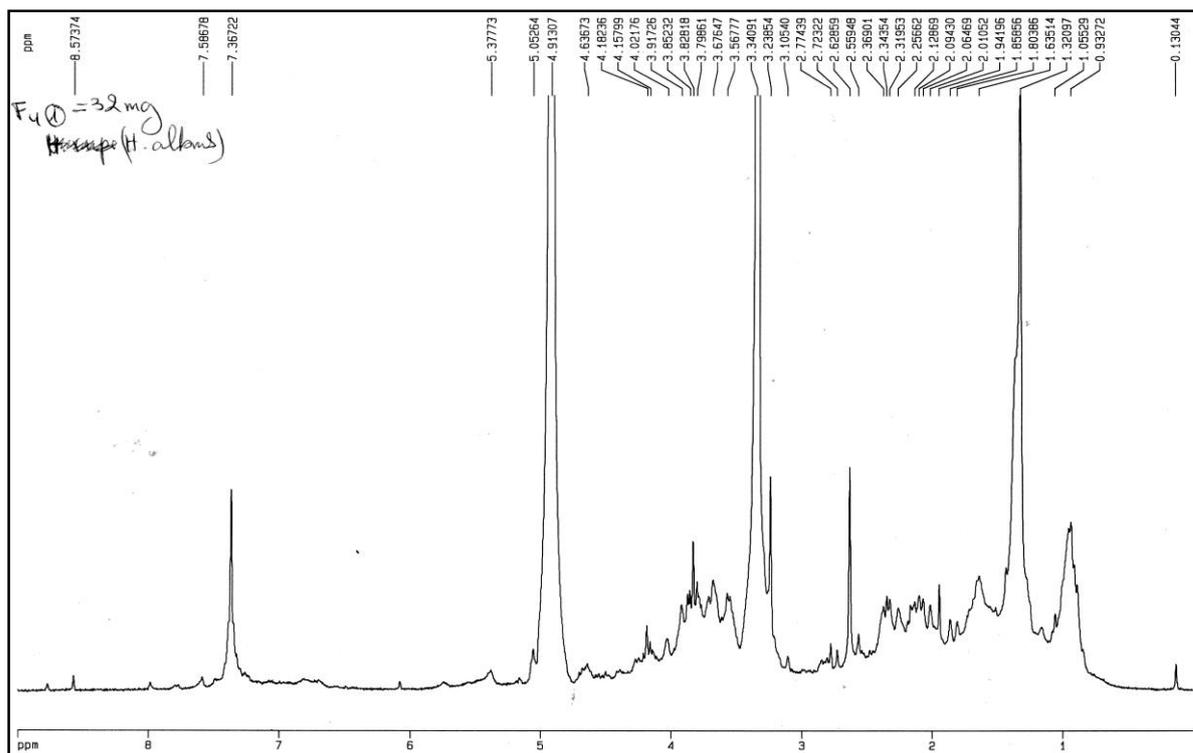


Figure 04. Spectre RMN ^1H (350 MHz) du produit F4-1 d'*H. albus*.

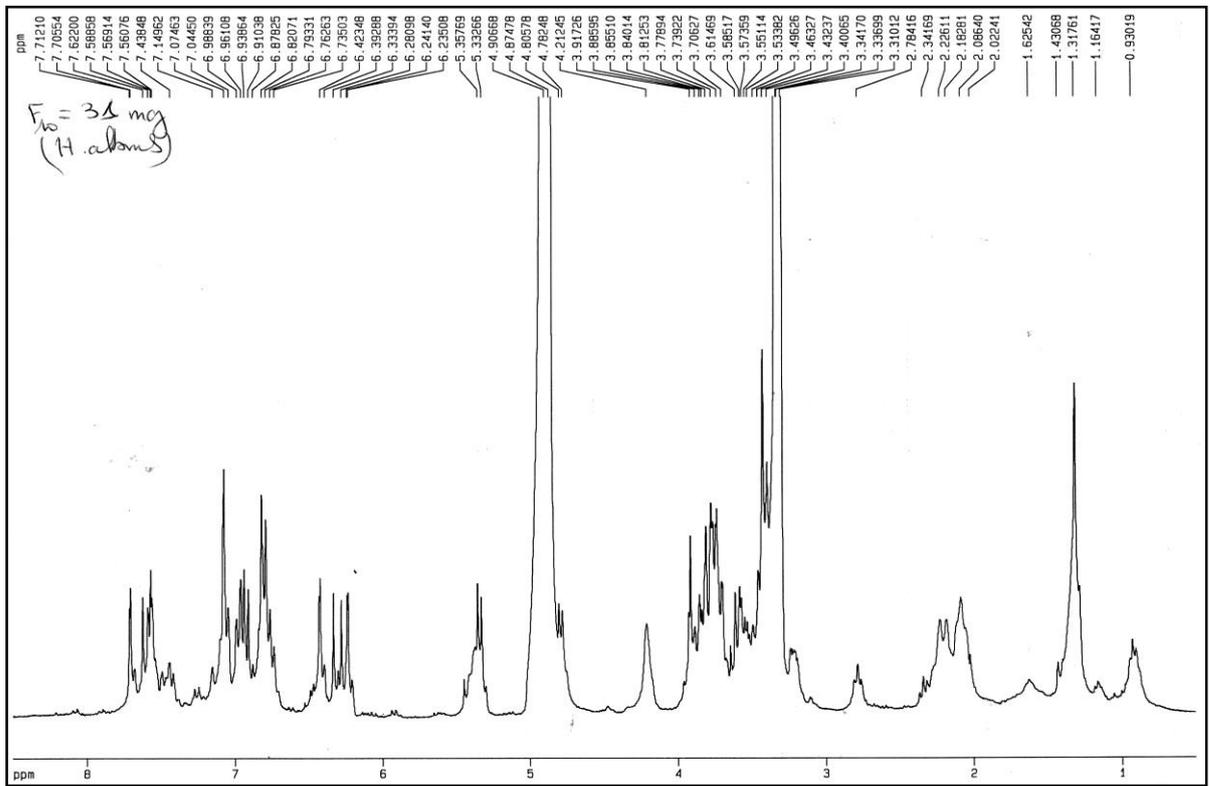


Figure 05. Spectre RMN ^1H (350 MHz) du produit F10 de *H. albus*.

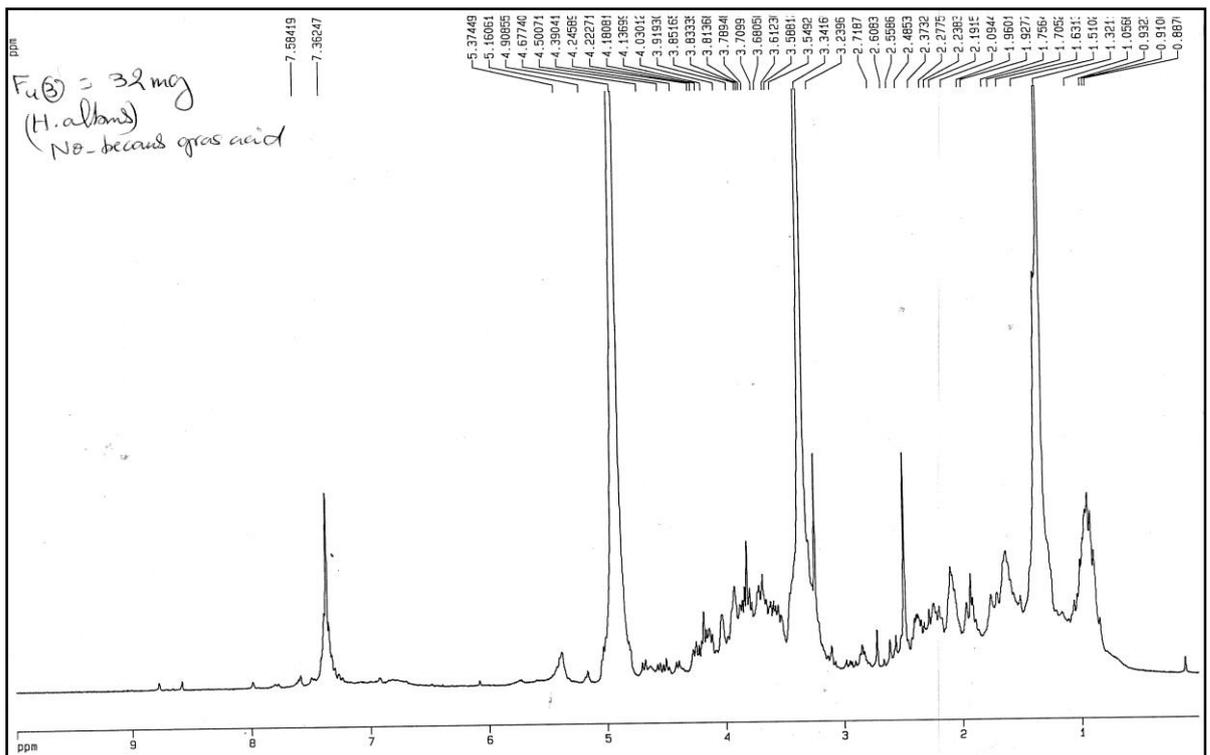


Figure 06. Spectre RMN ^1H (400 MHz) du produit F4-3 de *H. albus*.

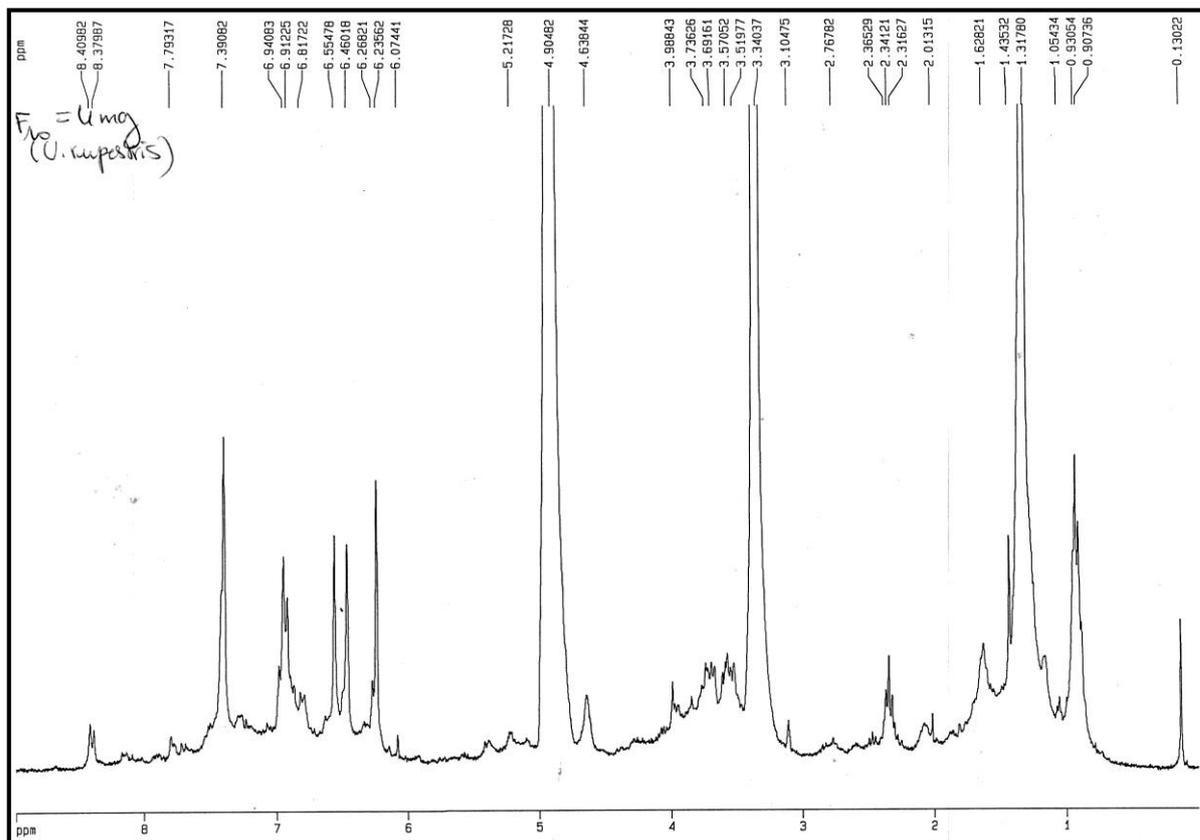


Figure 07. Spectre RMN ¹H (350 MHz) du produit F10 d'*U. rupestris*.

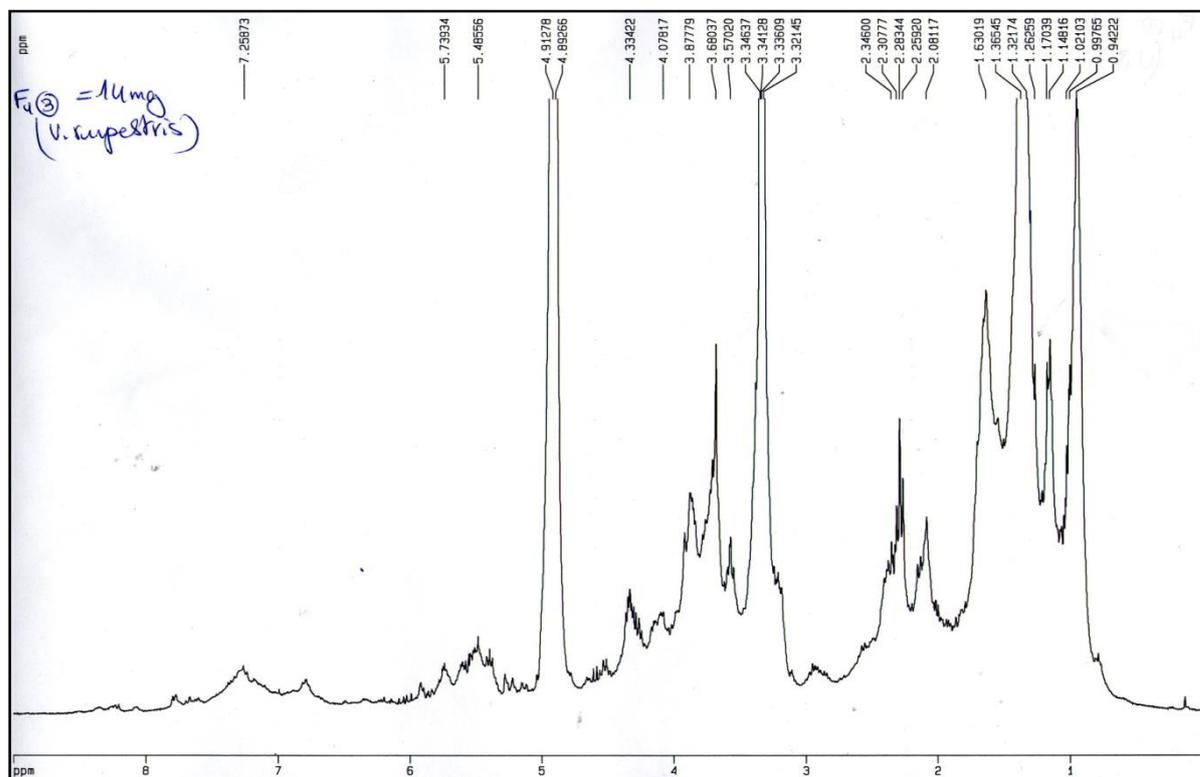


Figure 08. Spectre RMN ¹H (350 MHz) du produit F4-3 d'*U. rupestris*.

Study of pharmacobiological activities of the extracts of *Umbilicus rupestris* (Salisb Dandy) and *Hyoscyamus albus* L.

Abstract

The aim of this work is to evaluate some pharmacobiological activities: toxicity test, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, anti ulcer and anti-tumoral activities, also antioxydante and antimicrobial activities of the methanolic extracts of the leaves of *H.albus* and *U.rupestris* on animal model as well as the phytochemical study of these extracts.

The phytochemical screening revealed that HAMEOH and URMeOH are rich in alkaloids and terpenoides more than tannins and polyphenols. The quantitative analysis shows that, the methanolic extract of *H.albus* rich in polyphenols with a content of 111.1 ± 1.82 μg EAG/mg of extract followed by the methanolic extract of *U. rupestris* with the value of 105.7 ± 0.37 μg EAG/mg of extract. The content of flavonoids was determined spectrophotometrically and prove the presence of these compounds in methanolic extracts of *H.albus* and *U.rupestris* with respective values 24.31 ± 0.62 and 29.56 ± 1.88 μg EQ/mg. The phytochemical study after purification with colonne of Sephadex gel and TLC then separation of compounds with preparative HPLC, then identification by NMR-proton revealed that HAMEOH extract comprises alkaloids and glycosylated phenols, but URMeOH extract comprises lignans and glycosylated triterpens.

For acute toxicity, the administration of doses (100, 200, 500, 1500 and 2000 mg/Kg b.w.) of HAMEOH and URMeOH did not induce any death of experimental animals and thus LD50 was higher than 2000 mg/Kg b.w. In the test of subacute toxicity, the doses 100, 200 mg/Kg b.w were selected as therapeutic doses, and confirmed by biochemical, hematological and hispathological analysis.

The results of the analgesic activity show that the extract HAMEOH has a central analgesic activity by using the hot stimulus method, also has a peripheral antinoceptive activity by the test of acetic acid and formalin test. In the antipyretic activity, HAMEOH and URMeOH decrease the body temperature in significant way and dose-dependent manner the fever induced by Brewer's yeast.

Concerning the anti-inflammatory activity, the extracts of HAMEOH and URMeOH could inhibit inflammation induced by carrageenan, chemical mediators (histamine and serotonin) and inflammation induced by formalin solution in a significant way ($P \leq 0.05$) and dose-dependent compared to negative control. Also, the URMeOH has an effect of **erythrocyte membrane stabilization** and anti-peritonitis effect.

For the antiulcer activity against ulcer induced by ethanol, the results show that the control group present severe damage and hemorrhages while the groups treated with URMeOH (100 and 200 mg/Kg b.w.) and omeprazole decrease the surface area, also decrease significantly ($P \leq 0.05$) the volume of gastric juice and total acidity. The histopathological study prove that URMeOH reduce the gastric lesions and the disturbances of the epithelium.

The antidiabetic activity of extracts (HAMEOH and URMeOH) against the diabetes mellitus induced by Streptozotocine, followed by the oral administration of two doses 100 and 200 mg/Kg b.w of HAMEOH and URMeOH into diabetic rats during 30 days reduce in a significant way the level of glucose, lipidic parameters and Hb1Ac stimulate the secretion of insulin and the rise in the hepatic glycogen content.

In the cytotoxic activity of HAMEOH and URMeOH against cell lines MCF7, HeLa and PC-3, the concentrations tested of HAMEOH show $\text{IC}_{50} = 112.01$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, 129.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 142.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against PC-3, HeLa and MCF7 respectively. Mercapto shows $\text{IC}_{50} = 30.17$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, $\text{IC}_{50} = 40.21$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 46.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against PC-3, HeLa and MCF7 respectively. But the URMeOH extract reduce cellular viability but without reaching 50% of them.

The extracts (EEp, EChl and EMe) of the plants studied proved a significant antioxydant effect in the test of bleaching of β - carotene and DPPH test. Also, a strong antibacterial activity but without anticandidose effect.

Key words: *Hyoscyamus albus*, *Umbilicus rupestris*, Secondary metabolites, NMR protons, pharmacobiologic activities, methanolic extract.

دراسة النشاطات الفرمكوبولوجية لمستخلصات *Umbilicus rupestris* (Salish و *Hyoscyamus albus* L. و Dandy)

الملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم بعض الأنشطة الفرمكوبولوجية: اختبار السمية، النشاط المضاد للالتهاب، النشاط المسكن، النشاط خافض للحرارة، النشاط المضاد للقرحة المعدية، النشاط المضاد للسرطان، النشاط المضاد للاكسدة، النشاط المضاد للجراثيم للمستخلص الميثانولي لأوراق النبتتين *U. rupestris* و *H. albus* على نموذج حيواني وكذا الدراسة الكيميائية لهذين المستخلصين.

أظهر الفحص الكيميائي أن المستخلصان HAMEOH و URMeOH غنية بالكلويدات التربنويدات إضافة إلى التانينات والبوليفينولات. ويظهر التحليل الكمي أن المستخلص الميثانولي لـ *H. albus* غني بالبوليفينولات والتي تقدر بـ 111.1 ± 1.82 ميكروغرام مكافئ الغاليك/مغ مستخلص يليها المستخلص الميثانولي لـ *U. rupestris* بقيمة 105.7 ± 0.37 ميكروغرام مكافئ الغاليك/مغ مستخلص. أظهرت معايرة الفلافونيدات وجود هذه الجزيئات في مستخلصات النبتتين *H. albus* و *U. rupestris* وذلك بقيمة 24.31 ± 0.62 و 29.56 ± 1.88 على التوالي. أظهرت الدراسة الكيميائية بعد الفصل بتقنية الاستبعاد اللوني، الكروماتوغرافي و HPLC التحضيرية و بطريقة تحليل الطيف بروتون أظهرت أن مستخلص HAMEOH يحتوي سكرية فينولات و الألكلويدات ومستخلص URMeOH يحتوي على اللينيان وثلاثي التاربان السكري.

في اختبار السمية الحادة، فإن تناول الجرعة بعدة تراكيز (500, 100, 1500, 2000 مغ/كغ وزن الجسم) للمستخلصين HAMEOH و URMeOH لم تؤد إلى موت أي حيوان من حيوانات التجربة وبالتالي فإن LD50 اعتبر أكثر من 2000 مغ/كغ وزن الجسم. في اختبار السمية شبه الحادة، فإن التراكيز 100 و 200 مغ / كغ وزن الجسم اختيرت كتركيز علاجية والتي أكدت بالتحاليل البيوكيميائية الدموية و النسيجية.

نتائج النشاط المسكن بين أن المستخلص HAMEOH له نشاط مسكن مركزي من خلال Hot stimulus method ونشاط مسكن جانبي باختبار حمض الخل واختبار الفورمالين.

في النشاط خافض للحرارة، المستخلصين HAMEOH و URMeOH خفضا درجة حرارة الجسم بشكل معنوي ومرتبطة بتركيز الحمى التي سببتها خميرة الجعة.

في النشاط المضاد للالتهاب، المستخلصين HAMEOH و URMeOH تمكنا من تثبيط الالتهاب الناتج عن الكاراجينان و الالتهاب الناتج عن الوسائط الكيميائية (الهستامين والسيروتونين) و الالتهاب الناتج عن الفورمالين بشكل معنوي ($P \leq 0,05$) ومرتبطة بالتركيز مقارنة مع المجموعة الشاهدة. كذلك المستخلص URMeOH له تأثير على استقرار الغشاء وتأثير مضاد للالتهاب الصفاق.

في النشاط المضاد للقرحة المعدية المتسبب بالايثانول، أظهرت النتائج أن المجموعة الشاهدة بينت أضرار بالغة ونزيف في حين أن المجموعات المعالجة بـ URMeOH (100 و 200 مغ/كغ وزن الجسم) وأومبرازول لوحظ انخفاض مساحة القرحة و بشكل ملحوظ ($P \leq 0,05$) في كمية عصير المعدة والحموضة الكلية. الدراسة النسيجية برهنت أن المستخلص URMeOH قلل من الجروح المعدية واضطرابات النسيج الطلائي.

في النشاط المضاد للمرض السكري للمستخلصين (HAMEOH و URMeOH) الناتج بالستريبتوزوتوسين، أدى تناول فئران المصابة بالمرض عن طريق الفم لجرعتين من HAMEOH و URMeOH (100, 200 مغ/كغ وزن الجسم) خلال 30 يوم إلى انخفاض بشكل كبير في نسبة السكر في الدم والليبيدات والهيموغلوبين السكري، و قد حرص على إفراز الأنسولين وكذا على ارتفاع محتوى الغليكوجين الكبدي.

في النشاط السام للخلايا للمستخلصين HAMEOH و URMeOH ضد الخلايا السرطانية MCF7, HeLa, PC-3، التراكيز المعالجة بـ HAMEOH أعطت $IC_{50} = 112.01$ ميكروغرام / مل، 129.23 ميكروغرام / مل و 142.35 ميكروغرام / مل ضد HeLa, PC-3 و MCF7 على التوالي. Mercapto أعطى $IC_{50} = 30.17$ ميكروغرام / مل، 40.21 ميكروغرام / مل و 46.01 ميكروغرام / مل ضد HeLa, PC-3 و MCF7 على التوالي. لكن المستخلص URMeOH خفض نمو الخلايا السرطانية لكن دون الوصول إلى قتل 50% منهم.

كذلك أظهرت المستنتجيات (EMe, EChl, EEp) لهذه النبتتين نشاط مضاد للأكسدة جد عال في طريقة تفكح β كاروتين وطريقة الازاحية اتجاه جذر DPPH وكذلك نشاط قوي مضاد للبكتيريا ولكن دون تأثير على *Candida albicans*.

الكلمات المفتاحية: *Umbilicus rupestris*، *Hyoscyamus albus*، المركبات الثانوية، النشاط البيولوجي، RMN البروتوني، المستخلص الميثانولي.

Etude des activités pharmacobiologiques des extraits d'*Umbilicus rupestris* (Salisb Dandy) et d'*Hyoscyamus albus* L.

Résumé :

Le présent travail a pour but d'évaluer quelques activités pharmacobiologiques : la toxicité, l'activité anti-inflammatoire, l'activité analgésique, antipyrétique, antiulcéreuse, anticancéreuse, antioxydante et antimicrobienne des extraits méthanoliques des feuilles de deux plantes *H. albus* et *U. rupestris* sur un modèle animal ainsi que l'étude phytochimique de ces extraits. Le screening phytochimique a révélé que HAMEOH et URMeOH sont riches en alcaloïdes et terpénoides plus que les tanins et les polyphénols. L'analyse quantitative a montré que l'extrait méthanolique d'*H. albus* est riche en polyphénols totaux avec une teneur de 111.1 ± 1.82 µg EAG/mg d'extrait suivi par l'extrait méthanolique d'*U. rupestris* avec la valeur de 105.7 ± 0.37 µg EAG/mg d'extrait. Le dosage par spectrophotométrie des flavonoïdes a montré la présence de ces substances dans tous les extraits HAMEOH et URMeOH avec des valeurs 24.31 ± 0.62 et 29.56 ± 1.88 µg EQ/mg d'extrait respectivement. L'étude phytochimique après purification sur colonne de gel de Séphadex, CCM et séparation des composés par HPLC préparative et l'identification par le RMN à proton a révélé que l'extrait HAMEOH comporte des phénols glycosylés et des alcaloïdes et l'extrait URMeOH renferme des lignanes et des triterpènes glycosylés.

A l'issue du test de toxicité aiguë par l'administration des doses (100, 200, 500, 1500, 2000 mg/Kg p.c.) de HAMEOH et URMeOH, aucun cas de mortalité n'a été enregistré donc la LD50 est supérieur à 2000 mg/Kg p.c. Cependant, dans la toxicité subaiguë, les doses 100 et 200 mg/Kg p.c ont été choisies comme des doses thérapeutiques ce qui a été confirmé par les analyses biochimiques, hématologiques et hispathologiques.

Les résultats de l'activité analgésique montre que l'extrait HAMEOH a un effet analgésique centrale par la méthode de stimulus thermique et encore une activité antinoceptive périphérique avec le test de l'acide acétique et le test formalin. Dans l'activité antipyrétique, HAMEOH et URMeOH ont réduit la température corporelle d'une façon significative et d'une manière dose-dépendante la fièvre induite par la levure de bière.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, les extraits (HAMEOH et URMeOH) ont pu inhiber l'inflammation induite par la carragenane, les médiateurs chimiques (histamine et la sérotonine) et la solution formaline d'une façon significative ($P \leq 0.05$) et dose-dépendante. Seul l'extrait URMeOH a montré un effet de stabilisation de la membrane érythrocytaire et un effet anti-péritonite.

Cependant l'activité antiulcéreuse contre l'ulcère induit par l'éthanol montre que le groupe contrôle présent des dommages sévères et des hémorragies tandis que les groupes traités avec URMeOH (100 et 200 mg/Kg p.c) et l'oméprazole ont réduit la surface ulcéreuse suivi d'une réduction significative du suc gastrique et l'acidité totale ($P \leq 0.05$). L'étude histopathologique a révélé que l'extrait URMeOH a fait réduire les lésions gastriques et les perturbations de l'épithélium.

Tandis que l'activité antidiabétique de ces extraits, le diabète millitus induit par le Streptozotocine, suivi par l'administration orale des deux doses 100 et 200 mg/Kg p.c. de HAMEOH et URMeOH aux rats diabétiques durant 30 jours a réduit d'une manière significative le taux de glucose, le bilan lipidique ainsi que HbA1C ont favorisé la sécrétion de l'insuline et l'élévation du taux de glycogène hépatique.

A propos de l'activité cytotoxique de HAMEOH et URMeOH vis à vis aux lignées cellulaires MCF7, HeLa et PC-3, les concentrations testés de HAMEOH montrent une $IC_{50} = 112.01$ µg/ml, 129.23 µg/ml et 142.35 µg/ml contre PC-3, HeLa et MCF7 respectivement. Mercapto montre une $IC_{50} = 30.17$ µg/ml, $IC_{50} = 40.21$ µg/ml et 46.01 µg/ml pour PC-3, HeLa et MCF7 respectivement. Mais l'extrait URMeOH a montré une mortalité cellulaire avec un taux inférieur à 50% d'eux.

Les extraits (EEp, EChl et EMe) des plantes étudiées ont montré un effet antioxydant important par le test de blanchissement de β-carotène et le test au DPPH. Et avec une forte activité antibactérienne mais sans effet anticandidose.

Mots clés: *Hyoscyamus albus*, *Umbilicus rupestris*, métabolites secondaires, RMN à protons, activités pharmacobiologiques, extrait méthanolique.