



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MUSTAFA BEN BOULAIID

- BATNA 2 -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Organismes

THESE DE DOCTORAT TROISIEME CYCLE

Filière

Sciences Biologiques

Option

Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologies Cellulaires

Présentée par

Mr. Melakhessou Mohamed Akram

Thème

**Évaluation des activités biologiques des extraits
de la plante : *Atractylis flava Desf***

Soutenue le 13/12/2018

JURY

Hambaba Leila

Professeur Université de Batna 2

Présidente

Benkiki Naima

Maître de Conférences Université de Batna 2

Rapporteur

Laroui Salah

Professeur Université de Batna 2

Examineur

Yahia Abdel Wahab

Professeur centre universitaire Mila

Examineur

Ayachi Ammar

Professeur Université de Batna 1

Examineur

2017/2018

“I believe in intuition and inspiration. Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. It is, strictly speaking, a real factor in scientific research.”

Albert Einstein

Remerciements

Premièrement, je remercie **Allah**, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer ce travail.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Docteur **Benkiki Naima** qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier profondément Mr le Professeur **Yahia mouloud** qui m'a intégré au sein de son laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire. Université Batna-2, et qui m'a toujours soutenu. Je le remercie de m'avoir donné confiance à travers sa modestie scientifique et ses qualités humaines.

Je tiens à remercier Docteur **Joubert olivier** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de des Cibles Thérapeutiques Formulation et expertise préclinique du médicament, Faculté de Pharmacie, l'université lorraine. Je le remercie pour ses conseils et l'encadrement qu'il m'a offert. Je remercie toute l'équipe du laboratoire CITHEFOR de m'avoir bien accueillie, Sans oublier Dr **Ramia Safar** qui était toujours disponible.

Je remercie sincèrement mon frère **Marref Salah Eddine**, doctorant. Pour m'avoir accompagné durant la réalisation de mon travail.

Je tiens à remercier Madame le professeur **Hambaba Leila** Je n'oublierai jamais ta gentillesse et ton sourire qui ne quitte pas ton visage. Merci d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'exprime également mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Laroui Salah**, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur le Professeur **Yahia Abd El Wahab** et Monsieur le Professeur **Ayachi Ammar** d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Dédicaces

Jamais cette thèse n'aurait vu le jour, si dès ma plus tendre enfance *mes parents* ne m'avaient inculqué l'envie de savoir. Aussi, je ne cesserai jamais de rappeler toute la gratitude que je leur dois et tout l'amour et l'admiration que je leur porte.

Plus qu'un remerciement, je dédie cette thèse à *Ma chère grand-mère maternelle*, Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

Je dédie également ce travail à *mes frères* pour leur amour, leur confiance et leur Souci permanent de me fournir le meilleur d'eux même. N'oubliez pas que je serai moi aussi toujours là pour vous.

Je dédie également ce travail à mes oncles et tantes.

A toutes mes amis qui m'ont aidé à passer cette thèse.....

In memoriam

Araar Nadia

Pour ton âme, ma chère tante, Je n'oublierai jamais tes regards, tes sourires, tes mots et ton grand cœur.

Je tiens du fond du cœur à te dédier ce travail.

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ALAT : Alanine transaminase

AMP : Adénosine monophosphate

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Butyl Hydroxy Anisole

BHT : Butyl Hydroxy Toluene

BSA: Bovine Serum Albumin

BST: brine shrimp test

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

COX : cyclo-oxygénase

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

DEPC: Pyrocarbonate d'éthyle

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

DRw: Antigen D related workshop

EAEAF : Extrait acétate d'éthyle *d'Atractylis flava Desf*

EBAF : Extrait *n*-butanol *d'Atractylis flava Desf*

EDMAF : Extrait dichlorométhane *d'Atractylis flava Desf*

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

EEPAF : Extrait éther de pétrole *d'Atractylis flava Desf*

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

EUV : L'excrétion urinaire volumétrique

FADH : Flavine adénine dinucléotide

fL : femtolitre

FMNH: Flavine mononucleotide

HCT: Hématocrite

HGB: Hémoglobine

HLA : Human leucocyte antigen

LDH : lactate déshydrogénase

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MCH : Hémoglobine corpusculaire moyenne

MCHC : Concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire

MCV: Volume cellulaire moyen

MeOH: Méthanol

MPV : Volume moyen des plaquettes

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

pg: picograms

PKC: protéine kinase C

PLT : Plaquette

PPHG : hyperglycémie postprandiale

GR: Globules rouges

Rdt: Rendement

RDW: Red cell distribution width

RIN: RNA integrity number

Rpm: rotation par minute

RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction

SVF : sérum de veau fœtal

GB: Globules blancs

WST-1: water soluble tetrazolium

pNPG : p-nitrophényl- α -D-glocopyranoside

LISTE DES TABLEAUX		
N°	Titre	Page
Tableau 01.	Les amorces utilisées pour l'expression génique	44
Tableau 02.	Résultats du criblage phytochimique réalisé sur <i>Atractylis flava Desf</i>	55
Tableau 03.	Rendement des extraits d' <i>Atractylis flava Desf</i>	55
Tableau 04.	Teneur en polyphénols totaux	56
Tableau 05.	Teneur en flavonoïdes totaux	57
Tableau 06.	Activité antioxydante par le test de piégeage DPPH	58
Tableau 07.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le DPPH	59
Tableau 08.	Activité antioxydante par le test CUPRAC	59
Tableau 09.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le test CUPRAC	60
Tableau 10.	Activité antioxydante par le test β -carotène	60
Tableau 11.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le test β -carotène	61
Tableau 12.	Activité antioxydante par le test ABTS	62
Tableau 13.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le test ABTS	62
Tableau 14.	Activité antioxydante par le test Chélation des ions ferreux	63
Tableau 15.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le test Chélation des ions ferreux	64
Tableau 16.	Activité antioxydante par le test réduction de fer	64
Tableau 17.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le test réduction de fer	64
Tableau 18.	Activité antiinflammatoire des extraits d' <i>Atractylis flava Desf</i>	67
Tableau 19.	Résultats de l'activité cytotoxique des larves d'artémia.	70
Tableau 20.	Valeurs des paramètres hématologiques des rats témoins et des rats traités ; mesurés pendant l'étude de la toxicité aiguë	78
Tableau 21.	Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et des rats traités ; mesurés pendant l'étude de la toxicité aiguë	79
Tableau 22.	Effets de l'extrait butanolique sur le poids relatif de quelques organes (% du poids corporel)	80
Tableau 23.	Activité diurétique (concentration en électrolytes et Volume urinaire) de l'extrait butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> .	82
Tableau 24.	Effet de l'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> sur l'excrétion urinaire et l'activité diurétique	83
Tableau 25.	Effet antipyrétique de l'extrait butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> sur la fièvre induite par la levure de bière	84
Tableau 26.	Effet d'EBAF sur l'inflammation aiguë sur la patte du rat	86
Tableau 27.	Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extraits <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i>	89

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 01.	Images de l'espèce <i>Atractylis flava</i> Desf.	3
Figure 02.	Structure de base des flavonoïdes.	18
Figure 03.	Différentes classes de flavonoïdes.	19
Figure 04.	Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable.	20
Figure 05.	Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes.	21
Figure 06.	Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Men+).	22
Figure 07.	Exemples de quelques monoterpènes	26
Figure 08.	Squelette iridane.	26
Figure 09.	Exemples de quelques sesquiterpènes.	27
Figure 10.	Exemples de quelques diterpènes.	28
Figure 11.	Exemples de quelques triterpènes.	28
Figure 12.	Structure de noyau stérane.	29
Figure 13.	Exemples de quelques stéroïdes.	29
Figure 14.	Schéma d'extraction la plante <i>Atractylis flava</i> Desf.	34
Figure 15.	Cellule THP-1 au microscope à balayage (x 11 000) - 1B. Cellule THP-1 au microscope optique (x 9 500).	43
Figure 16.	Protocole schématisé du test WST-1.	44
Figure 17.	Schéma simplifié de l'isolement de la phase aqueuse contenant l'ARN	45
Figure 18.	Schéma simplifié du principe de l'obtention d'ADNc par RT-PCR et qPCR.	47
Figure 19.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	56
Figure 20.	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.	57
Figure 21.	Activité antioxydante (DPPH) des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	58
Figure 22.	Activité antioxydante (CUPRAC) des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	59
Figure 23.	Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène en fonction des concentrations des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	61
Figure 24.	Activité antioxydante (ABTS) des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	62
Figure 25.	Activité antioxydante (Chélation des ions ferreux.) des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	63
Figure 26.	Pouvoir réducteur des extraits d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	65
Figure 27.	Effet des extraits d' <i>Atractylis Flava</i> Desf sur la dénaturation de BSA.	68
Figure 28.	Inhibition de l' α -glucosidase par l'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	69
Figure 29.	Inhibition de l' α -amylase par L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava</i> Desf.	69
Figure 30.	Activité mitochondriale des THP-1 exposés à L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava</i> Desf. par test WST-1.	72
Figure 31.	Activité mitochondriale des THP-1 exposés à L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava</i> Desf par le test Alamar bleu	73
Figure 32.	Activité cellulaire des THP-1 exposées à L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava</i> Desf par test au bleu trypan.	73

Figure 33.	Etude de l'expression des gènes des THP-1 exposées à L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> (100,25 µg/ml).	75
Figure 34.	Mesure de l'activité de la protéine caspase-3 des THP-1 exposées à L'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> .	77
Figure 35	Coupe histologique du tissu hépatique des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X10).	80
Figure 36.	Coupe histologique du tissu hépatique des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X40).	81
Figure 37.	Coupe histologique du tissu rénal des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X10).	81
Figure 38.	Coupe histologique du tissu rénal des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X40).	81
Figure 39.	Pourcentage de l'effet antipyrétique d'EBAF dans le test de la fièvre induite par la levure de bière	85
Figure 40.	Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait <i>n</i> -butanolique d' <i>Atractylis flava Desf</i> , et soumis à un test de tolérance orale au glucose	88

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Etude botanique d'*Atractylis flava* Desf

I.1. Les Asteraceae.....	1
I.1.1. Description botanique.....	1
I.1.2. Position systématique de la famille Asteraceae.....	1
I.2. Présentation du genre <i>Atractylis</i>	2
I.2.1. Rappel botanique.....	3
I.2.2. Travaux antérieurs de chimie sur l'espèce <i>Atractylis</i>	3
I.2.3. Activités biologiques antérieurs sur l' <i>Atractylis flava</i>	11
I.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	12

Chapitre 2 : Phytothérapie et métabolites secondaires

I.1. La phytothérapie.....	14
I.2. Histoire et popularité des phytothérapies.....	14
I.3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle.....	15
I.4. Préparations et formes galéniques en phytothérapie.....	15
II. Présentations des composés phénoliques, des triterpénoïdes et des Saponosides.....	17
II.1. Généralités.....	17
II.2. Les flavonoïdes.....	17
II.2.1. Définition.....	17
II.2.2. Classification et caractéristiques des flavonoïdes.....	18
II.2.3 Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	20
III. Présentation des triterpènes et saponosides.....	24
III.1. Les saponosides.....	24
III.1.2. Classification des saponosides.....	24
III.1.3. Propriétés biologiques des saponosides.....	25
IV. Les terpénoïdes.....	25
IV.1. Classification des terpénoïdes.....	26
IV.2. Propriétés biologiques des triterpènes.....	29

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 1 : Extraction et criblage phytochimique

I. Matériel végétal.....	31
II. Criblage phytochimique	31
III. Macération et extraction.....	33
IV. Dosage phytochimique des extraits.....	35
IV.1. Dosages des polyphénols totaux.....	35
IV.1. Dosages des flavonoïdes totaux	35

Chapitre 2 : Activités biologiques des extraits d'*Atractylis flava* Desf in vitro

I. Evaluation de l'activité antioxydante.....	36
I.1. Activité antiradicalaire au DPPH.....	36
I.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	37
I.3. Activité de blanchissement du β -carotène.....	37
I.4. Activité du piégeage de l'ABTS.....	38
I.5. Chélation des ions ferreux.....	38
I.6. Réduction de fer.....	39
II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	39
III. Evaluation de l'activité antidiabétique in vitro.....	40
III. Effet d'EBAF sur l'inhibition de Alpha-amylase.....	40
III. Effet d'EBAF sur l'inhibition d'Alpha-glucosidase.....	41
IV. Test de Cytotoxicité contre l' <i>Artémia salina</i>	42
VI. Evaluation de l'activité anticancéreuse.....	42
VI.1. Culture cellulaire.....	42
VI.2. Test de cytotoxicité au WST-1.....	43
VI.3. Test de cytotoxicité au Alamar bleu.....	44
VI.4. Test de cytotoxicité au bleu trypan.....	44
VI.5. Exploration des gènes.....	45
VI.5.1. Extraction des ARN totaux.....	45
VI.5.2. Analyse par PCR quantitative (qPCR).....	46
VI.5.3. Analyse par PCR RT-PCR (<i>reverse transcriptase</i>).....	46
VI.6. Test d'apoptose caspase 3.....	49

Chapitre 3 : Activités biologiques de l'extrait n-butanolique d'*Atractylis flava* Desf in vivo

I. Matériel animal.....	50
II. Etude toxicologique.....	50
II. Toxicité aigüe de L'EBAF.....	50
II.1. Autopsie générale.....	50
II.1. Hématologie et biochimie clinique.....	51
III. Évaluation de l'activité diuétique.....	51
IV. Évaluation de l'activité antipyrétique.....	52
V. Évaluation de l'activité antiinflammatoire.....	53
VI. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	54
VI.1. Test de tolérance au glucose.....	54
VI. 2. Induction de diabète expérimental.....	54
VI.3. Effet aigüe de l'EBAF sur les rats diabétiques.....	54
V. Etude statistique.....	54

Troisième partie

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Extraction et criblage phytochimique

I. Criblage phytochimique.....	55
II. rendement d'extraction.....	55

III. Dosage phytochimique des extraits.....	56
III.1. Dosages des polyphénols totaux.....	56
III.1.1. Dosages des flavonoïdes totaux.....	57

Chapitre 2 : Activités biologiques des extraits d'Atractylis flava Desf in vitro

I. Evaluation de l'activité antioxydante.....	58
I.1. Activité antiradicalaire au DPPH.....	58
I.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	59
I.3. Activité de blanchissement du β -carotène.....	60
I.4. Activité du piégeage de l'ABTS.....	61
I.5. Chélation des ions ferreux.....	63
I.6. Réduction de fer.....	64
I.7. Discussion.....	65
II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	67
III. Evaluation de l'activité antidiabétique in vitro.....	68
III. Effet d'EBAF sur l'inhibition de Alpha-amylase et Alpha-glucosidase.....	68
IV. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia salina.....	70
V. Evaluation de l'activité anticancéreuse.....	71
V.1. Cytotoxicité sur THP-1.....	71
V.2. Test de cytotoxicité au WST-1.....	71
V.3. Test de cytotoxicité au Alamar bleu.....	72
V.4. Test de cytotoxicité au bleu trypan.....	73
V.5. Exploration des gènes.....	74
V.6. Détermination de l'activité de Caspase-3.....	76

Chapitre 3 : Activités biologiques de l'extrait n-butanolique d'Atractylis flava Desf in vivo

I. Etude toxicologique.....	78
I. Toxicité aiguë de L'EBAF.....	78
I.1. Effets de l'EBAF sur l'aspect général.....	78
I.2. Effets de l'EBAF sur les paramètres hématologiques.....	78
I.3. Effets de l'EBAF sur les paramètres biochimiques.....	79
I.4. Autopsie générale.....	79
I.5. Effets de l'EBAF sur le poids relatif des organes.....	80
I.6. Résultats de l'étude histopathologique.....	80
II. Évaluation de l'activité diurétique.....	82
III. Évaluation de l'activité antipyrétique.....	84
IV. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	86
V. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	88
V.1. Test de tolérance au glucose.....	88
V.2. Effet aiguë de l'EBAF sur les rats diabétiques.....	88

Conclusion générale et perspectives

Introduction générale

L'utilisation des plantes médicinales a évolué à travers les époques entre l'exploitation à l'état brut des plantes, l'extraction comme principes actifs, jusqu'à l'identification de leurs compositions et leurs effets biologiques.

La flore africaine en général, et algérienne en particulier, regorge d'une importante réserve de plante à caractère médicinale et aromatique. La flore algérienne compte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques (**Quezel et Santa., 1963**). Ce potentiel floristique, constitué de plantes médicinales toxiques et condimentaires, reste très peu exploré sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

A nos jours, l'usage des plantes médicinales a une grande importance chez les populations. D'après les données fournies par l'OMS, 80 % de la population mondiale traitent leurs problèmes de santé par des remèdes traditionnels, d'une part parce qu'elles n'ont souvent pas accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne et, d'autre part, parce que ces plantes ont souvent efficaces (**Novais et al., 2004**). La plupart des médicaments actuels, sont à base de plante ou fabriqués à partir de leurs modèles (synthèse ou hémisynthèse chimique des principes actifs). Le traitement par les plantes médicinales est donc devenu une grande science, dans laquelle on part de la plante vers le principe actif.

Le travail entrepris dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une plante de la famille des Asteraceae, une plante utilisée en Afrique du nord, dont l'Algérie, où *Atractylis flava Desf*, nommé localement "assenan aouragh", est connue pour ses propriétés diuétique (**Daniele et al, 2005**). Peu de recherches qu'ont été menées sur sa composition chimique, mais aucun travail n'a été réalisé pour bien cerner ces activités biologiques. En effet, les études chimiques réalisées sur cette plante ont mis en évidence la présence des flavonoïdes, des triterpènes, des stéroïdes et des saponines.

La sélection de cette espèce est basée essentiellement sur la richesse de cette plante en métabolites secondaire, l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation biologique.

L'objectif de cette étude est d'approfondir les connaissances pharmacologiques sur cette plante endémique.

Deux objectifs spécifiques sont fixés :

- Caractérisation qualitative et quantitative du contenu en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, saponoside.....) dont la plante entière.
- Etude du potentiel toxique (toxicité aigüe, cytotoxicités) et évaluation in vivo et/ou in vitro des activités biologiques de la plante.

Ce manuscrit est divisé en trois parties, **la première** est axée sur la plante, dont le premier chapitre, la présente de manière générale en détaillant brièvement leur morphologie, la description du genre *Atractylis* et de ses métabolites et présente les résultats obtenus sur l'étude phytochimique d'*Atractylis flava Desf* de ces extraits et métabolites isolés. Le deuxième chapitre est consacré aux métabolites secondaires et leurs propriétés biologiques.

- La **deuxième** partie comportera l'extraction, le criblage chimique, le dosage des polyphénols et flavonoïdes, l'évaluation toxicité aiguë d'*Atractylis flava Desf*. Et l'évaluation de certaines propriétés pharmacologiques in vitro (activité antioxydante, activité cytotoxique, anticancéreuse, antidiabétique et anti-inflammatoire) et in vivo (activité diurétique, activité antidiabétique, anti-inflammatoire et antipyrétique).
- La **troisième partie** concernera les résultats et discussion, conclusion et perspectives.

*Synthèse
bibliographique*

I.1. Les Asteraceae

La famille des Asteraceae est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1500 genres (**Bremer K.,1994**). Le sol algérien compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (**Quezel et Santa., 1963**). Les Asteraceae connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes (**Bremer K.,1994**).

I.1.1. Description botanique

Les plantes de la famille Asteraceae se caractérisent surtout par leur inflorescence, des fleurs regroupées en capitules, plus ou moins fréquemment convexe, sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des involucre (**Ozenda, P., 1991**). Les fleurs (fleurons), stériles, unisexuées ou hermaphrodites, sont caractérisées par leurs anthères soudées, les ovules ont une position basale dans l'ovaire (Figure I.1). On peut les diviser en trois groupes suivant l'aspect des capitules : les tubuliflores, les liguliflores et les radiées (**Judd et al.,1990**).

- ❖ Les premières ont une inflorescence uniquement composée de fleurs tubuleuses régulières, elles présentent des tubes terminés par des lèvres imperceptibles où s'ouvrent plus ou moins largement en cinq lobes (chardon, centaurée).
- ❖ Les secondes composées uniquement de fleurons ligulés. Elles présentent des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, reconnaissables seulement aux dents de la languette (chicorée, laitue).
- ❖ Les dernières ont des fleurs tubuleuses régulières au centre (c'est ce qu'on appelle le disque) et des fleurs tubuleuses irrégulières ou ligulées tout autour en forme de couronne (marguerite, aster).

I.1.2. Position systématique de la famille Asteraceae

Les plantes Asteraceae sont classées dans la famille des phanérogames regroupant le plus nombre d'espèces. Cette famille comprend plus de 1600 genres et environ 24000 espèces (**Funk et al.,2009**) C'est une famille largement répandue dans le monde entier sauf l'Antarctique, mais

ses plantes sont principalement localisées dans les régions tempérées. Elle se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme, sa grande variété écologique, son caractère cosmopolite. On y trouve surtout des plantes herbacées, vivaces et à feuilles alternes (**Raven et al.,2000**).

La classification des Astéracées est très complexe et diverge selon les auteurs. Les plantes appartenant à cette famille ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches pour élaborer une classification plus précise de cette grande famille. Elle est partagée en de nombreuses tribus qui sont regroupées en 3 sous-familles par certains auteurs (Bremer et Jansen) : Barnadesioideae, Asteroideae et Cichorioideae (**Bremer, K.,1994 ; Bremer et al.,1992 ; Bremer, K.,1987**).

Des chercheurs (**Baldwin et al.,2002 ; Panero et Funk**) ont récemment élaboré un nouveau système de classification basé sur des critères de la phylogénie moléculaire. Ils ont pris en compte tous les caractères héréditaires, depuis ce qui est visible (base des classifications traditionnelles) jusqu'aux séquences d'ADN, en passant par les protéines et les données de la paléontologie, divisant cette famille en 12 sous-familles et 43 tribus. Ces sous-familles sont : Barnadesioideae, Stifftioideae, Mutisioideae, Wunderlichioideae, Gochnatioideae, Hecastocleidoideae, Carduoideae, Pertyoideae, Gymnarrhenoideae, Cichorioideae, Corymbioideae et Asteroideae. Parmi ces tribus on peut citer : Barnadesieae, Stifftieae, Nassauvieae, Dicomeae, Tarchonanthaeae, Arctotideae, Astereae, Anthemideae, Heliantheae, Cichorieae et Cardueae.

I.2. Présentation du genre *Atractylis*

Le genre *Atractylis* (Asteraceae) comporte une trentaine d'espèces localisées sur le bord et les îles de la Méditerranée, au moins seize espèces sont présentes en Algérie. Les *Atractylis* sont des plantes herbacées très épineuses annuelles, bisannuelles ou vivaces, à aspect de petits chardons. Localement, elles sont appelées « Assenane awragh » (**Ozenda, P., 1991**).

Les capitules sont entourés par les feuilles supérieures (feuilles involuquées) et dont les bractées externes sont elles-mêmes épineuses ; akènes velus surmontés d'une aigrette blanche très fournie (**Ozenda, P., 1991**).

I.2. 1.Rappel botanique

Atractylis flava Desf. est une plante vivace, à tiges épaisses, dressés, à rameaux très feuillés et de taille 10 à 20 cm. Les feuilles sont très épineuses, involucales, deux fois plus longues que celles du milieu de la tige. Les capitules ne dépassant pas 2 cm de diamètre sont à fleurs jaunes (Figure 1) (Ozenda, P., 1991 ; Quezel et Santa., 1963).



Figure 1. Images de l'espèce *Atractylis flava* Desf. (Biskra, mai 2015).

Atractylis flava Desf est répandue dans le nord saharien, Elle est désignée sous le nom vernaculaires : « serr, chouik, takesma, shawk elgamal et assenane awragh » et possède un synonyme *Atractylis carduus* (Forsk.) Christ (Quezel et Santa., 1963). Cette espèce est classée comme suit :

Famille : *Asteraceae*

Sous famille : *Carduoideae*

Tribu : *Cardueae* Sous tribu : *Carlininae*

Genre : *Atractylis* L. Espèce : *Atractylis flava* Desf.

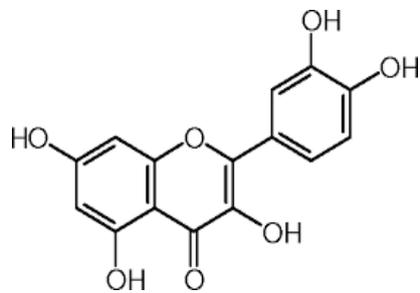
Synonyme : *Atractylis carduus* (Forsk.) Christ.

Noms vernaculaires : Chouik, takesma, assenane awragh (Algérie), serr (Tunisie) et shawk el-gamal (Egypt).

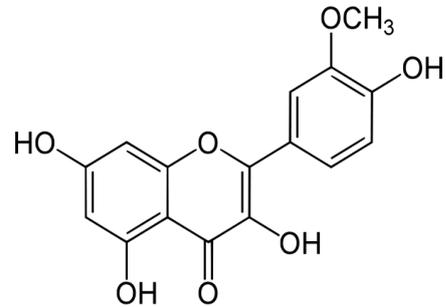
I.4.2. Travaux antérieurs de chimie sur l'espèce *Atractylis flava*

Le genre *Atractylis* est connu par sa richesse en métabolites secondaires. Les études chimiques réalisées sur l'espèce *A. carduus* (*A. flava*) poussant en Egypte en conduisant à l'isolement et la caractérisation de plusieurs métabolites connus de types flavonoïdiques et triterpéniques. (Melek et al.,1992 ; Melek et al.,1989).

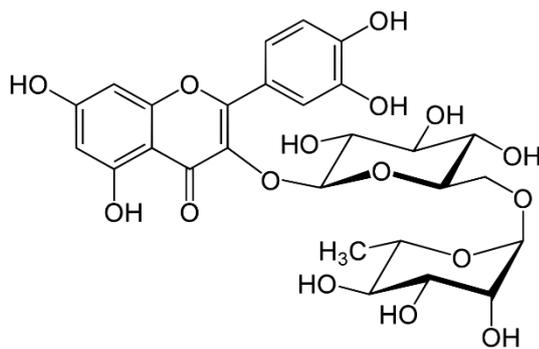
En effet, les travaux réalisés par F. Malek et al en 1992. Sur l'espèce *Atractylis carduus* ont permis d'isoler les flavonoïdes suivants :



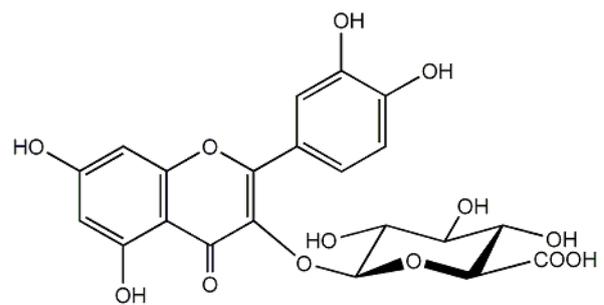
Quercétine



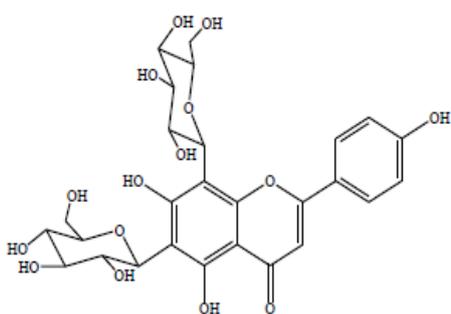
Isorhamnétine



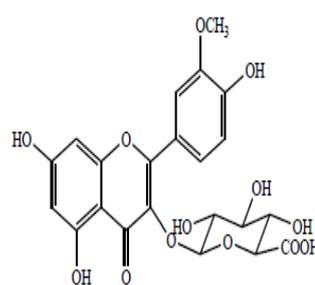
Rutine



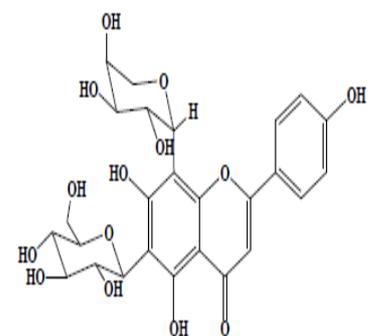
Isorhamnétine 3-O-glucuronide



Neoschaftoside

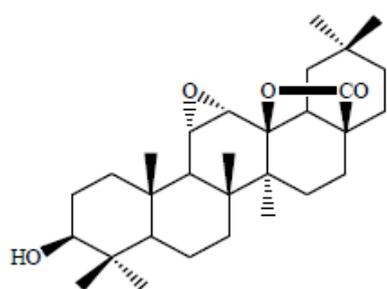


Vicenine 2

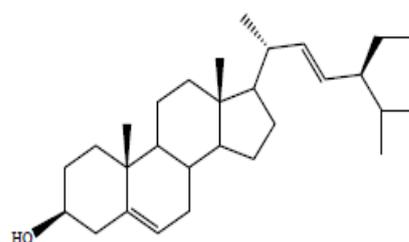


Schaftoside

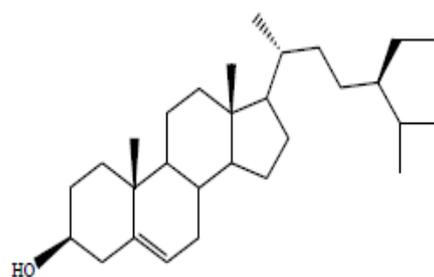
Une autre étude réalisée par F. Melek et al en 1989 sur les parties aériennes de la même plante a conduit à l'isolation des triterpènes suivants :



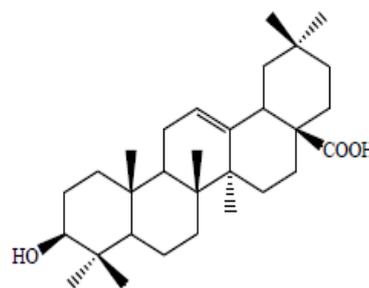
3β-hydroxy-11α,12αépoxyoléanan-28,13β-olide



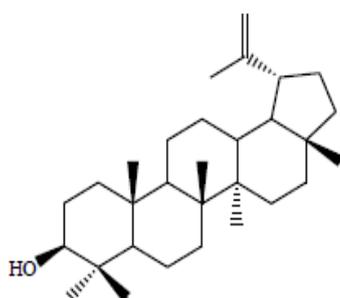
Stigmastérol



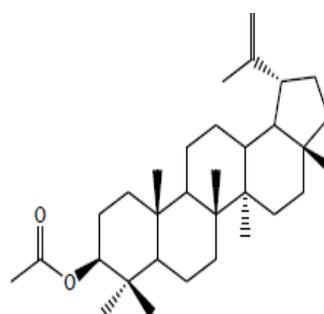
β-sitostérol



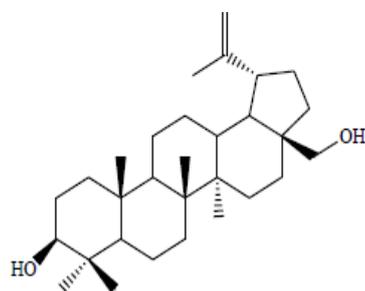
Acide oléanolique



Lupéol



Lupéol acétate

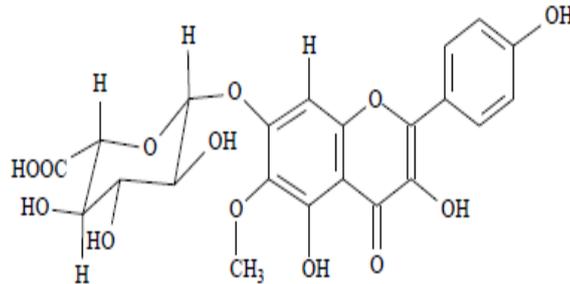


Bétuline

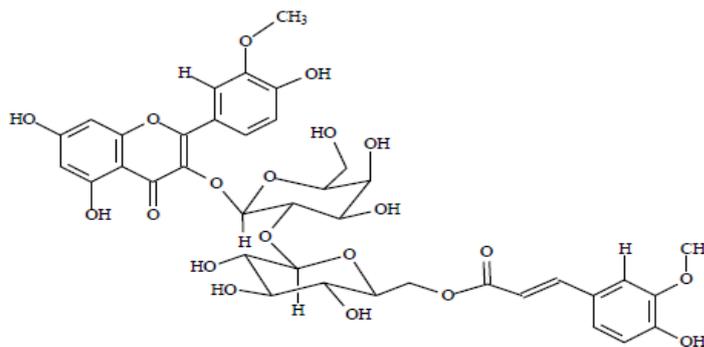
L'étude phytochimique de **Chaabani et al 2016** effectués sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanolique de la plante *Atractylis flava* Desf entière a mené à l'identification de 30 composés. Les composés caractérisés appartiennent à quatre classes de

métabolites secondaires : les flavonoïdes, les triterpènes, les stéroïdes et les saponines. Ils se répartissent comme suit :

➤ **Onze flavonoïdes dont deux sont nouveaux :**

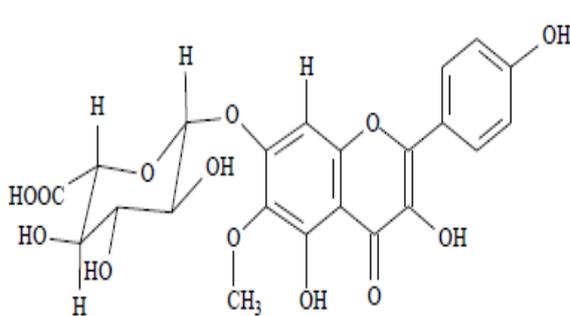


Atraflavoside A : 6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther 7-O-βglucopyranuronoside

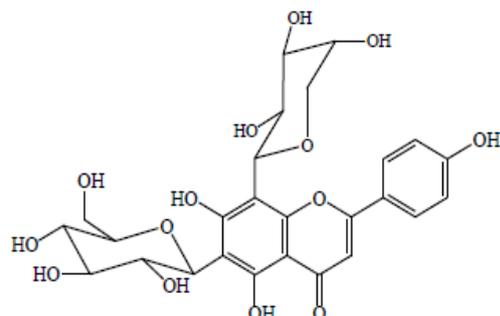


Atraflavoside B : isorhamnétine 3-O-[(6'''-O-E-feruloyl) -β-D-glucopyranosyl (1→2)] -β-D-galactopyranoside

▪ **Deux flavonoïdes C-glycosylés :**

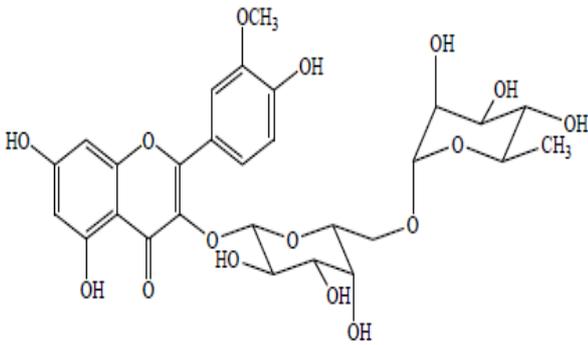


Vicenine 3

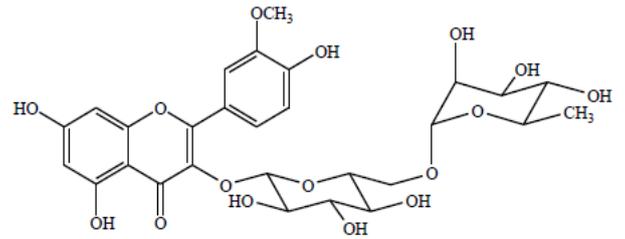


Schaftoside

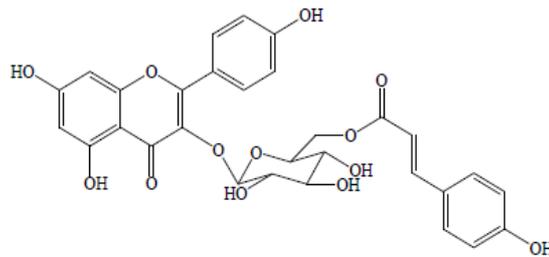
▪ Trois flavonoïdes O-glycosylés :



Isorhamnéatine 3-O-robinobioside

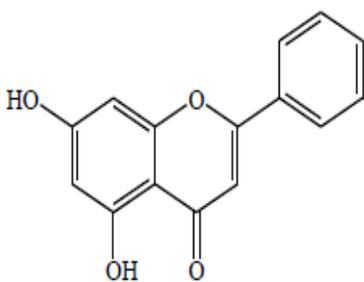


Narcissine

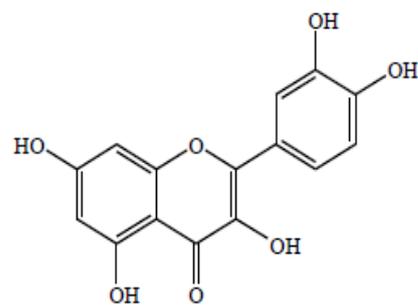


Tiliroside

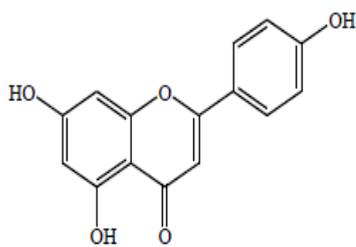
▪ Quatre flavonoïdes aglycones :



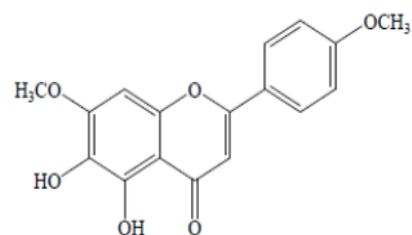
Chrysin



Quercétine

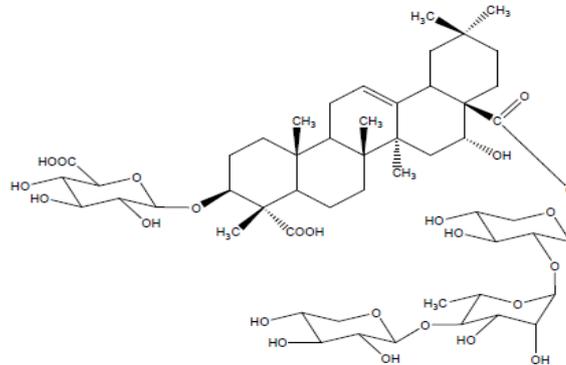


Apigénine

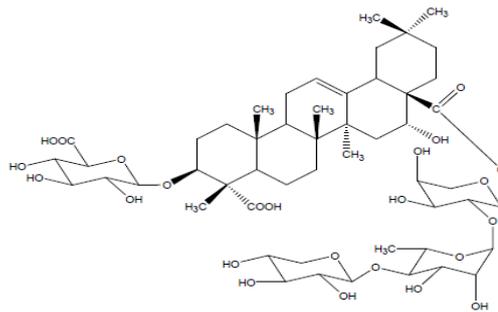


Iadaneine

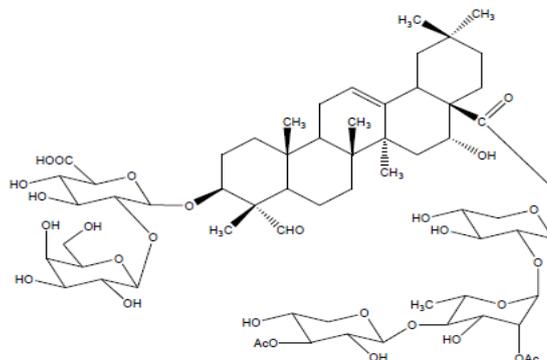
➤ **Trois saponines bidesmosidiques nouvelles :**



Acide 16 α -hydroxygypsogénique 3-O- β -D- glucuronopyranosyl-28-O- [β -Dxylopyranosyl-(1''' \rightarrow 4''') - α -L-rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')- β - D-xylopyranosyl]



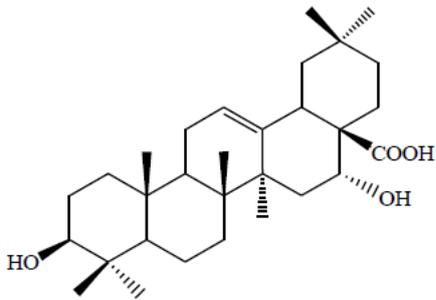
Acide 16 α -hydroxygypsogénique 3-O- β -D- glucuronopyranosyl-28-O-[β -Dxylopyranosyl-(1''' \rightarrow 4''')- α -L-rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')- α - L-arabinopyranosyl]



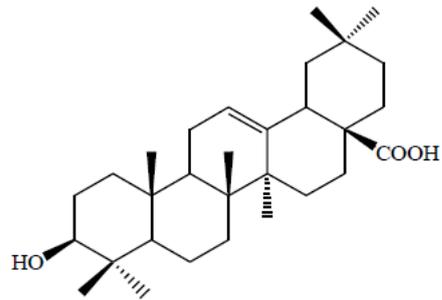
Acide quillaïque 3-O- [β -D-galactopyranosyl-(1'' \rightarrow 2') - β -D-glucuronopyranosyl] -28-O- [((3''''-O-acétyl) - β -D-xylopyranosyl) -(1'''' \rightarrow 4'') - ((2'''-O-acétyl) - α -L-rhamnopyranosyl) - (1''' \rightarrow 2'') - β -D-xylopyranosyl.

Douze triterpènes à squelette pentacyclique :

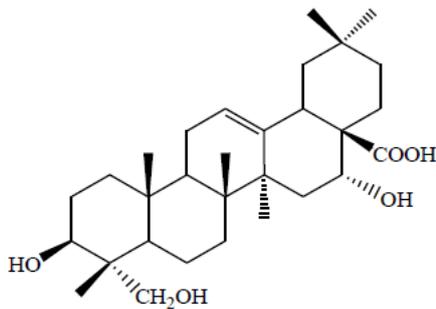
▪ Sept à squelette oléanane :



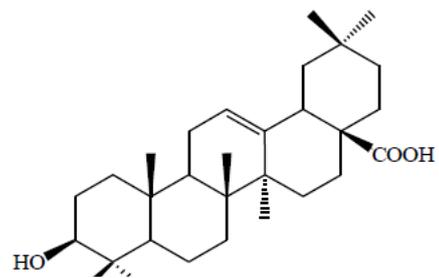
Acide echinocystique



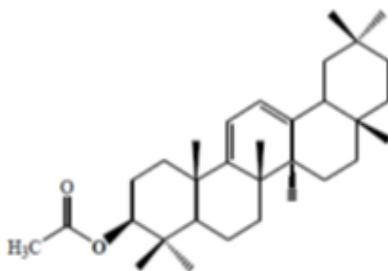
Acide oléanolique



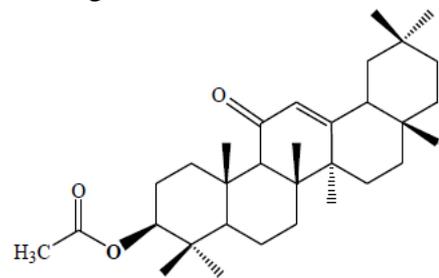
Caulophyllogénine



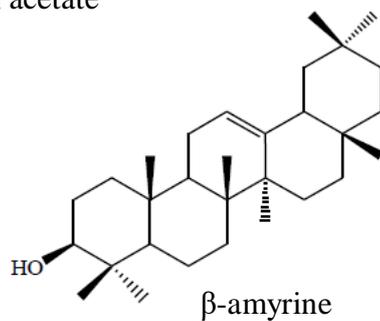
Hédéragénine



Oléana-9(11),12-diène-3-yl acétate

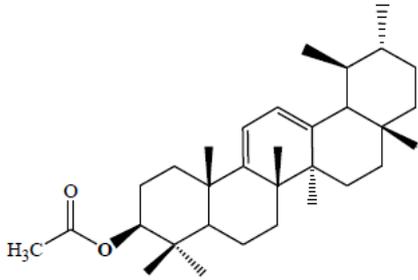


11-oxo- β -amyrine acétate

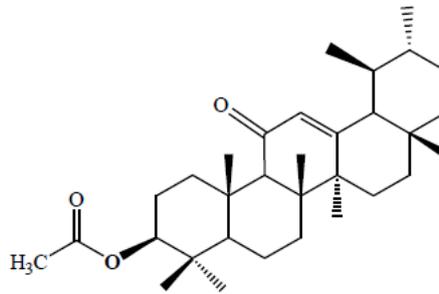


β -amyrine

▪ Deux à squelette ursane :

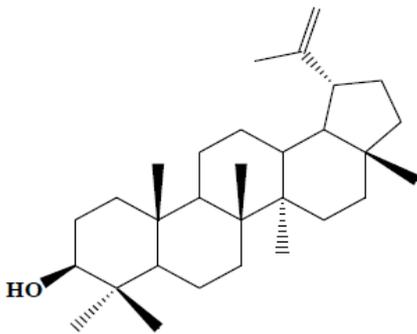


Ursa-9(11),12-diène-3-yl acétate

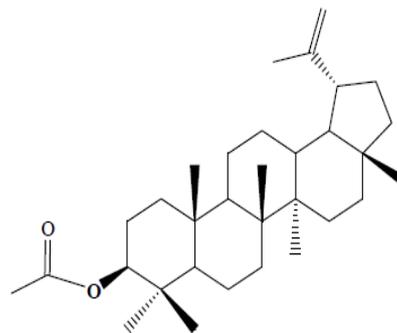


11-oxo- α -amyrine acétate

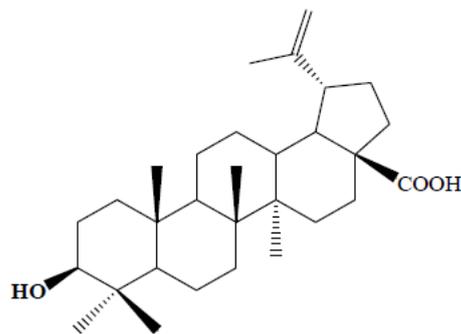
▪ Trois à squelette lupane :



Lupéol

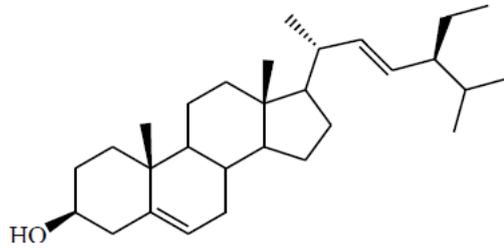


Lupéol acétate

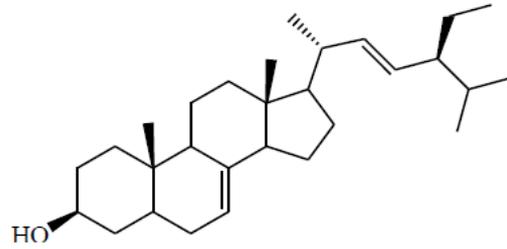


L'acide bétulinique.

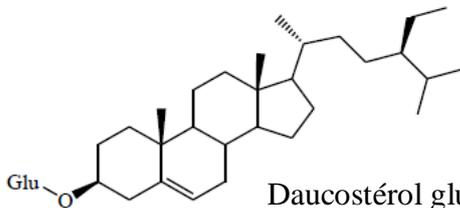
➤ Quatre phytostérols :



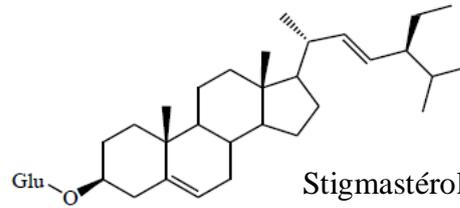
Stigmastérol



Spinastérol



Daucostérol glucosylé



Stigmastérol glucosylé

I.2.3. Activités biologiques antérieurs sur l'*Atractylis flava*

Une étude biologique effectuée sur la plante *Atractylis carduus* poussant en Egypt, a révélé que les extraits méthanolique et hexanique des parties aériennes de cette espèce présentent une activité antibactérienne remarquable. En effet, cette étude a montré que ces extraits possèdent un effet sur les bactéries Gram positif (*staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*) et Gram négatif (*klepsiella pneumonia*) (Abdel Rahman et al.,2011).

Une autre étude réalisée sur les extraits hexanique, acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux des parties aériennes de la plante *Atractylis serratuloides* poussant en Tunisie a montré que l'extrait acétate d'éthyle est actif vis-à-vis des bactéries *pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *salmonella enterica* (Bouaziz et al.,2009).

L'extrait méthanolique ainsi que les extraits *n*-hexane, CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH des racines de la plante *Atractylodes japonisa* ont subi une investigation biologique en vue d'évaluer leurs propriétés antimicrobiennes. Les résultats ont révélé que ces extraits sont très actifs contre la souche *staphylococcus aureus* (Bouaziz et al.,2009).

En effet, l'étude réalisée sur les extraits éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, n-butanol de la plante entière *Atractylis flava* poussant en Algérie a montré que ces extraits possèdent tous une activité antioxydante et une activité antibactérienne modérée sur la souche *Staphylococcus aureus* (Chabani et al.,2016).

1.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle est très répandue aussi bien dans les pays en développement que dans les pays développés. Plusieurs espèces de la sous-tribu Carlininae ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique : L'espèce *A. flava* est reconnue particulièrement pour ses effets diurétiques (El Rhaffari et Zaid.,2002).

Atractylis gummifera L. : connue sous le nom de chardon à glu (choûk el-eulk ou Addâd). Au Maroc en usage interne, la racine desséchée est utilisée pour arrêter les hémorragies et pour provoquer les vomissements (les émétiques). La plante, particulièrement sa racine, est utilisée comme narcotique. Elle est utile contre l'épilepsie et l'hystérie et guérit les œdèmes. Elle est aussi reconnue pour ses propriétés diurétiques et antipyrétiques, et pour le traitement des parasites intestinaux et les ulcères ainsi que des morsures de serpents. En fumigations, on l'emploie dans le traitement des rhumes, des vertiges, des céphalées et des paralysies. En usage externe, le chardon à glu est utilisé pour ses propriétés cicatrisantes en applications locales, en frictions ou en cataplasmes, dans le traitement de la gale, des taches de rousseur, des boutons d'acné, des chancres syphilitiques, des abcès et des furoncles (El Rhaffari et Zaid.,2002).

Atractylis gummifera L est très toxique du fait de la présence en quantité importante d'actractyloside et carboxyatractyloside ou gummiférine dans les racines de la plante. Ces molécules sont des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative de la mitochondrie (Daniel et al.,2005 ; Skalli et al 2002).

Le genre *Atractylodes* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle chinoise et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été démontrées par des études scientifiques. Les rhizomes de ces espèces sont prescrits comme médicaments gastriques ou diurétiques (Bohlmann et al.,1981).

L'espèce *Atractylodes macrocephala* est utilisée pour le traitement des maladies du cœur, la rate, les poumons et l'estomac (Su et al.,1987).

Les plantes appartenant au genre *Carlina* sont reconnues pour leurs effets diurétique et diaphorétique. Elles sont utilisées pour traiter les troubles de reins, l'inflammation de peau, et les perturbations gastro-intestinales ; à titre d'exemples :

Les racines de *Carlina acanthifolia* All. sont utilisées, en médecine traditionnelle italienne, comme diurétique et cholagogue. Des études ont montré que les racines de cette plante participent à la promotion de la transpiration et la sécrétion, par contre en Bulgarie elles ont des propriétés anti-inflammatoires et diurétiques (**Dordevic et al.,2007 ; Leporatti et al., 2003**).

La décoction de *Carlina utzka* Hacq. Et *Carlina acaulis* L. var. *sylvestris* est un remède pour la mauvaise haleine (**Leporatti et al.,1990**).

Carlina canariensis Pit. est utilisée comme laxatif et *Carlina salicifolia* (L. fil.) Cav. Est employée comme fourrage pour bétail (**Bohlmann, et al.,1990**).

I. La phytothérapie

La phytothérapie (En grec, Phytos = végétal et Therapeia = soigner) est l'art de soigner par les plantes. La phytothérapie permet à la fois de traiter le terrain du malade et les symptômes de sa maladie. Le malade est pris en charge dans sa globalité afin de comprendre l'origine de ses symptômes et d'en prévenir leur apparition. Seules les plantes médicinales ont un intérêt en phytothérapie. Les parties les plus concentrées en principes actifs seront choisies donc il peut s'agir de la plante entière, des feuilles, de la tige, des rameaux, des sommités fleuries, de l'écorce, des racines, des fruits ou des fleurs, utilisées fraîches ou sèches. Des modes de préparations seront privilégiés en fonction de la partie de la plante concernée, de la nature du principe actif qu'il soit hydrophile ou lipophile et du type de patient qui va la recevoir : On ne traitera pas un jeune enfant avec une teinture mère à degré alcoolique élevé (**Yves Vanopdenbosch, 2013**).

I.2.Histoire et popularité des phytothérapies

La phytothérapie existe depuis la préhistoire. Les hommes de Neandertal étaient inhumés avec des plantes dont on sait maintenant qu'elles ont des propriétés médicinales. Les premiers peuples ont probablement découvert ces propriétés de façon empirique au cours des siècles et, à chaque génération, ils ont ainsi accumulé des connaissances sur les plantes médicinales. Ces connaissances continuent de s'accroître aujourd'hui dans les régions du monde où les cultures indigènes ont échappé à l'influence destructrice de la société moderne. Dans d'autres pays, l'information sur les plantes a été mise par écrit et organisée sous forme de longs textes appelés pharmacopées, qui expliquaient le mode de préparation de chaque plante et son emploi pour un traitement donné. Le choix des plantes et leur mode d'utilisation dépendaient de l'idée que la société concernée se faisait de la maladie. Par exemple, les peuples méditerranéens employaient l'ail pour éloigner les mauvais esprits qui, croyaient-ils, provoquaient la diarrhée, alors que les Chinois se servaient de l'ail pour guérir des maladies qui, selon eux, étaient dues à un dérangement de la rate et des reins. À notre époque, les plantes médicinales suscitent un certain intérêt pour plusieurs raisons, notamment parce que nous croyons, comme nos ancêtres, qu'elles peuvent nous permettre de nous maintenir en meilleure santé (**Farnsworth et al., 1985**).

I.3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité (**GuribFakim., 2006**). L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie mettent en relation les savoirs ancestraux des médecins traditionnels et les connaissances scientifiques actuelles. Ce sont avant tout des domaines de recherche interdisciplinaire à l'interface des sciences de l'Homme, comme l'ethnologie, l'histoire, la linguistique, et des sciences de la nature, comme la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine.

I.4. Préparations et formes galéniques en phytothérapie

1. Préparations aqueuses

Les tisanes (infusions et les décoctions)

- L'infusion est destinée pour les parties les plus fragiles de la plante : les pétales, les feuilles très fines. Elle consiste à verser de l'eau chaude ou bouillante sur les plantes sèches. Le temps d'infusion est variable selon les plantes (de quelques minutes à 1 heure).
- La décoction convient aux parties ligneuses de la plante comme les tiges, les racines, l'écorce. Il s'agit de plonger les parties de plante sèche à froid dans de l'eau et de porter le tout à ébullition pendant 10 minutes à 1h en fonction des plantes.
- La macération s'opère à froid plutôt pour des plantes à gommages et à mucilages. Laisser tremper les plantes sèches ou fraîches dans l'eau. Le temps de macération peut aller jusqu'à 3 semaines. Grâce à ces techniques, les principes actifs hydrosolubles sont extraits. Une filtration sera nécessaire avant la consommation.

2. Préparations alcooliques

- Préparations liquides à partir de plantes fraîches : Les suspensions intégrales de plantes fraîches (SIPF) : les plantes fraîches sont nettoyées et broyées à froid puis mises en suspension dans l'alcool. Le totum c'est-à-dire l'ensemble des molécules actives de la plante, est conservé.
- Teintures, alcoolatures et teintures mères : La teinture officinale est une macération à froid de

plantes sèches dans de l'alcool suivie d'une filtration. L'alcoolature et la teinture mère sont des macérations alcooliques de plantes fraîches.

- Extraits fluides : Epuisement (extraction d'une grande partie des principes actifs) de la drogue végétale réduite en poudre par lixiviation soit le passage successif de l'alcool dans la poudre.
- Macérâts glycélinés = Gemmothérapie : Cette technique de préparation est une macération des tissus végétaux embryonnaires frais comme les bourgeons, les jeunes pousses ou racelles dans un mélange de glycérine et d'alcool. Le mélange est ensuite filtré et dilué au 1/10° dans un mélange eau alcool-glycérine qui sert à la fois de véhicule d'extraction et de conservateur. La gemmothérapie est une niche de la phytothérapie tout comme l'aromathérapie : on ne peut en aucun cas extrapoler les propriétés médicinales de l'organe adulte à celles des tissus embryonnaires. Ces derniers sont riches en hormones comme les gibbérellines (facteurs de croissance) ou les auxines (facteur de croissance des racines) ce qui n'est pas le cas des organes adultes.

3. Préparations glycélinées

Les extraits fluides de plantes fraîches standardisés (EPS) :

La plante fraîche est cryobroyée puis les principes actifs hydrosolubles isolés par extraction successive dans le mélange alcool – eau de degré croissant. L'alcool est évaporé sous vide puis le résidu sec est mis en suspension dans le glycérol.

4. Autres formes galéniques

- **Les extraits secs pulvérulents** : Leur préparation se fait en trois phases : La première est l'extraction des principes actifs par macération ou lixiviation dans l'eau ou l'alcool. Ensuite la filtration et la concentration et enfin l'élimination du solvant par séchage

- **La poudre de plante** : Obtenue par simple broyage de la plante sèche, elle conserve le totum de la plante. Des gélules peuvent être fabriquées avec cette poudre.

- **Les topiques** : D'autres formes galéniques existent comme les suppositoires, les ovules gynécologiques, les crèmes, les pommades, les emplâtres et les onguents.

Il est important de donner la forme galénique adaptée à l'effet recherché.

Il faut savoir si le principe actif est hydrophile ou alcool-soluble pour privilégier la tisane ou la teinture mère par exemple. La concentration des principes actifs est différente selon les

formes galéniques. Certaines formes seront donc plus faciles d'utilisation que d'autres en fonction de la dose de traitement nécessaire.

II. Présentations des composés phénoliques, des triterpénoïdes et des Saponosides

II.1. Généralités

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Cependant, ils ont tous la même origine, la voie de phénylpropanoïde précédée par la voie de shikimate (**Urquiaga et al.,2000**).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), soit lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al.,2005**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al.,2005**).

Parmi les nombreux composés phénoliques que sont les flavonoïdes, acide benzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, stilbènes, subérines et les lignanes, nous nous intéresserons aux flavonoïdes. D'une part parce qu'ils sont plus représentés dans notre étude et d'autre part parce qu'ils présentent quelque fois des activités biologiques importantes.

II.2. Les flavonoïdes

II.2.1. Définition

La notion « flavonoïde » provenant du latin "flavus", signifiant "jaune" est attribué aux composés possédant un squelette à 15 atomes de carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones

(structure en C6-C3-C6). Le pont C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (**Figure 02**).

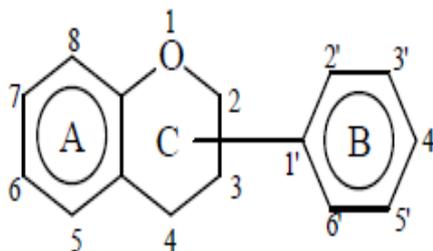


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux.

II.2.2. Classification et caractéristiques des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation, du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par les substitutions des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, existent : les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aurones, anthocyanes et isoflavones (**Bruneton, J.,1999 Harborne 1980.1988**) (**Figure 03**).

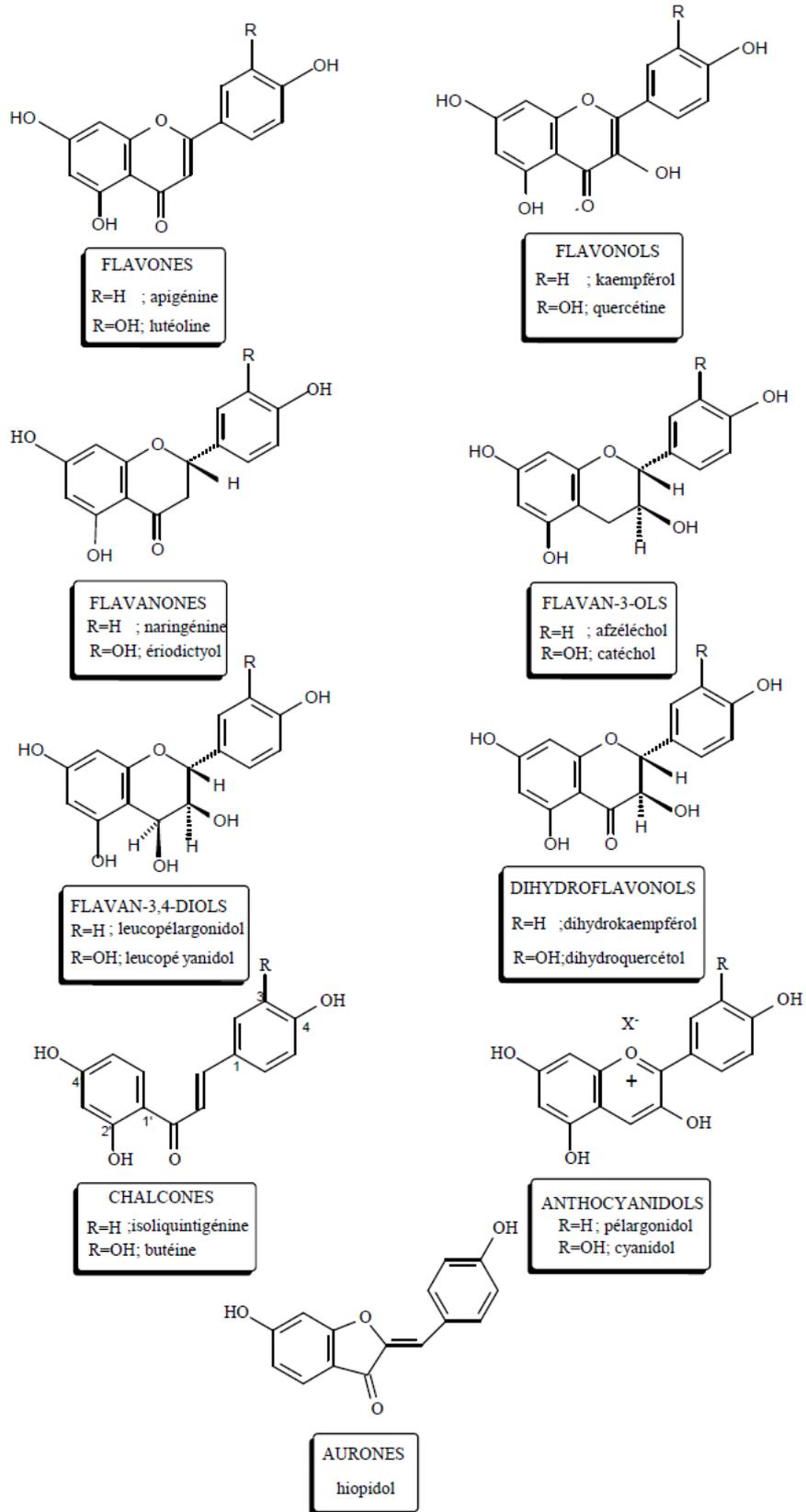


Figure 03 : différentes classes de flavonoïdes.

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apiose sont fréquents avec le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (**Ramiantsoa et al.,2009**).

II.2.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes

1. Propriétés anti-radicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (**Figure 04**). Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyyle (FLO•). Ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•. En outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

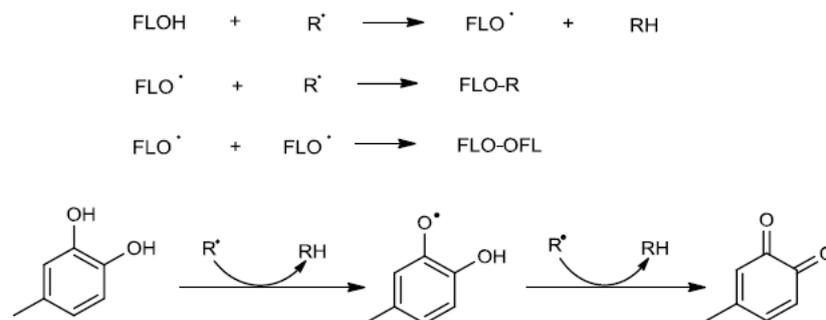


Figure 04 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable (**Tiqwari et al.,2001**).

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- la structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé ;
- la double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti-radicalaire ;
- les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (**Amić et al.,2003**).

A titre d'exemple (**Figure 05**) ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (**Middleton et al.,2000**).

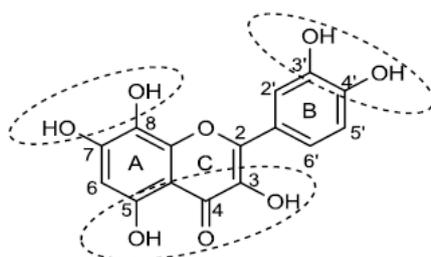


Figure 05 : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (**Amić et al.,2003**).

2. Propriétés chélatrices des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL=low-density lipoprotein) (**Tiqwari et al.,2001**).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (**Malešev et al.,2007**). La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (**Figure 06**) :

- site situé entre le groupe 3'-OH et le groupe 4'-OH du cycle B ;
- site situé entre le groupe 3-OH et 4-C=O de l'hétérocycle C ;
- site situé entre le groupe 5-OH du cycle A et le groupe 4-C=O de l'hétérocycle C.

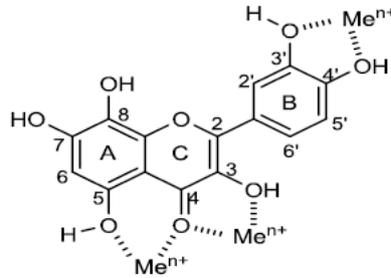


Figure 06 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques

(Tiqwari et al.,2001).

3. Propriétés antibactériennes

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan et al.,1999).

Une étude de Suksamrarn et al (2004) a montré que la flavanone 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone présente une activité antimycobactérienne contre les Mycobacterium tuberculosis avec une valeur de CMI de 175 μ M, tandis que la 4'-hydroxy-5,6,7-triméthoxyflavanone, l'acacétine et luteoline ont une activité faible avec les valeurs de CMI respectives de 606, 704 et 69 μ M.

4. Propriétés Anticancéreuses

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses. D'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. En effet certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate. Ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques i.e. FAS (Fatty Acid Synthase) (Suksamrarn et al.,2004).

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est aussi assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes : piégeage des radicaux libres, inhibition du métabolisme d'acide arachidonique, formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog et al.,1996**), prévention de l'activation des métabolites carcinogènes, inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, arrêt du cycle cellulaire.

5. Propriétés Anti-inflammatoires

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés antiinflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego et al.,2007**) et certains sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim et al.,2004**).

Les flavones et les flavanols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (**Tapas et al.,2008**).

6. Propriétés antivirales

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement à leurs effets sur les enzymes responsables de sa réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) (**Bylka et al.,2004**). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont, parmi les flavonoïdes, caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (**Tapas et al.,2008**).

7. Propriétés Antiallergiques

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺ dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine montre un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de

sodium utilisé comme médicament pour empêcher la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Marfak et al.,2003).

Oestrogénique (isoflavones), anti-hépatotoxique, antispasmodique, antidiarrhéique sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux (Eyog et al 1999).

III. Présentation des saponosides

III.1. Généralités sur les saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez Les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les Concombres de mer ou les étoiles de mer. Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique). Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille-Dubois et al.,2000). Les chaînes oligosaccharidiques greffées sur l'aglycone sont soit linéaires, soit branchées et peuvent renfermer jusqu'à 11 monosaccharides. La partie osidique est le plus souvent inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie. La partie sucre et l'aglycone sont normalement liées par une fonction éther ou ester.

III.1.2. Classification des saponosides

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit triterpéniques, soit stéroïdiques. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (liaison des sucres en C-3 ou en C-28 de l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques (liaison des sucres en C-3 et en C-28. Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dix dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques

(quatre chaînes) (**Kaipnazarov et al.,2004**). La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des génies peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

III.1.3. Propriétés biologiques des saponosides

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique (**Carée, P.,1953**). En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que : activités expectorante, anti-inflammatoire, anti-tumorale, chimiopréventive, antidiabétique, analgésique ainsi que des effets hépatoprotecteurs, neuroprotecteurs, antituberculeux (**Svoboda and Hampson.,1999**) ou encore inhibiteurs de l'aggrégation plaquettaire (**Bedi et al.,2003**).

IV. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent une vaste famille de substances naturelles. Leur squelette carboné résulte de la condensation d'unités à 5 atomes de carbone l'isoprène (1-méthyl-buta-1,3diène) (**Bruneton, J.,1999 ; Dey and Harborne.,1991 ; Manitto and Sammes.,1981**). La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre : les hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40), et les polyterpènes. Certains groupes de molécules n'obéissent pas à cette règle et, parmi ceux-ci, les stéroïdes qui ne comptent que 27 carbones.

De nombreux isoprénoïdes comme le pinène, le thymol, le menthol ou le limonène sont des substances odoriférantes, souvent rencontrées dans les huiles essentielles. D'autres jouent un rôle physiologique important, comme les caroténoïdes, la vitamine E et le cholestérol.

Le nombre de répétitions de ce motif isoprénique, mais aussi, les réactions de cyclisation, les réarrangements et les diverses oxydations et réductions que peuvent subir le squelette carboné sont à l'origine de la grande diversité structurale de ces molécules.

IV.1. Classification des terpénoïdes

1. Monoterpènes

Les monoterpènes (**Figure 07**) sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) (**Bakkali et al.,2007**). Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage « tête-queue » (**De Padua et al.,1999**).

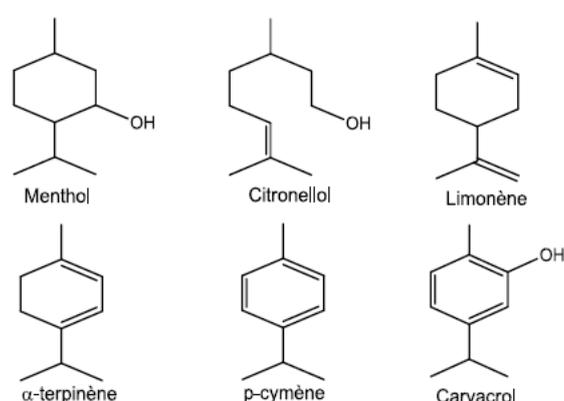


Figure 07. Exemples de quelques monoterpènes.

L'arrangement de leur squelette peut être : acyclique, mono, bi, et tricyclique (**Bruneton, J., 1993**).

Les iridoïdes et les pyréthrinines forment deux classes de composés tout à fait particulières des monoterpènes. Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette « cyclopenta[c] pyrane » ou « iridane » (**Figure 08**).

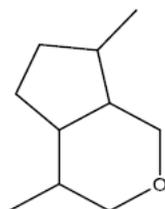


Figure 08. Squelette iridane.

Les monoterpènes sont largement distribués chez les végétaux de la famille Asteraceae (Bruneton, J.,1993). à laquelle appartient *C. odorata*.

2.Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes (Figure 09) forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones (Figure 09). Ces métabolites secondaires sont issus de l'oxydation d'un groupe méthyle du groupement isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique (Herz et al.,1977) Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes, notamment chez les espèces des familles Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae et Rutaceae (Baranska et al.,1977).

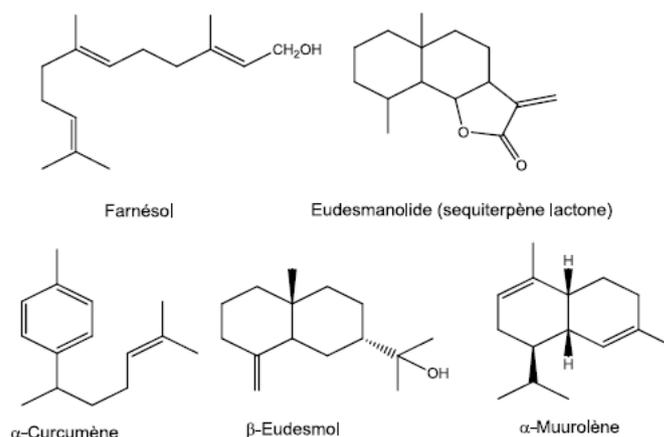


Figure 09. Exemples de quelques sesquiterpènes

3.Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2E, 6E, 10E-géranylgéranylpyrophosphate. Très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins (Bruneton, J.,1993). On peut les trouver encore dans les résines, les exsudats et les gommés naturelles. Il est rare de rencontrer les diterpènes comme constituants des huiles essentielles, à cause de leurs points d'ébullition élevés (Langenheim.,1990) Ils peuvent être acycliques ou cycliques. Deux alcools importants sont connus (Figure 10), le phytol, rencontré sous forme d'ester dans les végétaux à chlorophylle et la vitamine A essentielle à la croissance normale des mammifères et indispensable pour la reproduction et la vue (Mark and Ghyselinck.,2009).

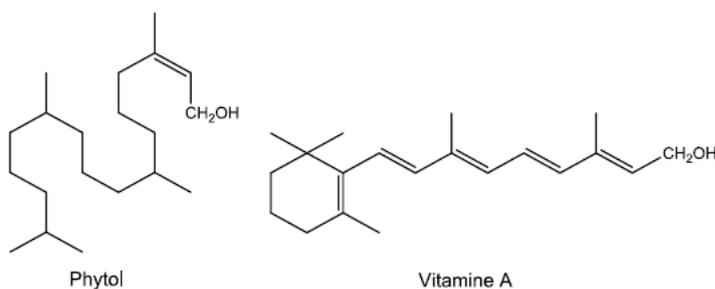


Figure 10. Exemples de quelques diterpènes.

4. Triterpènes et stéroïdes

Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxyqualène, ou plus rarement du squalène lui-même (Bruneton, J.,1999 ; Dey and Harborne.,1991 ; Manitto and Sammes.,1981). Ils sont presque toujours hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les triterpènes (Figure 11) présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimiques ayant trait à la conformation adoptée par l'époxyqualène avant la cyclisation initiale. Le cation formé lors de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles conduisant aux différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles (Bruneton, J.,1999 ; Dey and Harborne.,1991 ; Manitto and Sammes.,1981).

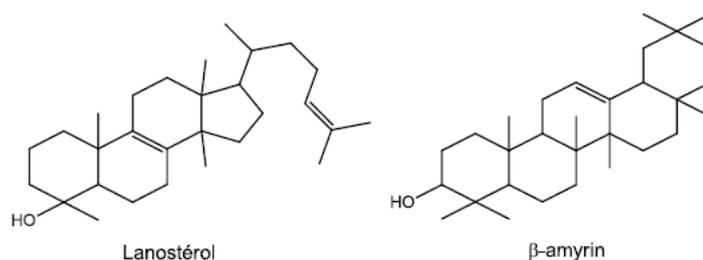


Figure 11. Exemples de quelques triterpènes.

La famille des triterpènes tétracycliques présente une importance particulière par son homogénéité et surtout par ses rapports étroits avec les stéroïdes (Ourisson and Grabbé.,1961). Leur structure de base commune est le noyau stérane (Figure 12).

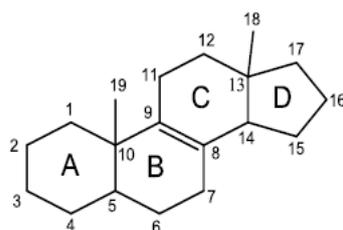


Figure 12. Structure de noyau stérane

Les stéroïdes (**Figure 13**) sont des composés qui contiennent le noyau perhydrocyclopenténophénanthrène. Ils comprennent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent les stérols proprement dits, les acides biliaires, les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines et quelques alcaloïdes.

Pratiquement, la position 3 est occupée par l'oxygène dans tous les stéroïdes naturels. Les stérols proprement dits n'ont aucun autre substituant oxygéné. Les substituants situés du même côté du squelette polycyclique que le groupe méthyle C-19 (en C-10) sont dits β , et les autres α (**Ourisson and Grabbé., 1961**).

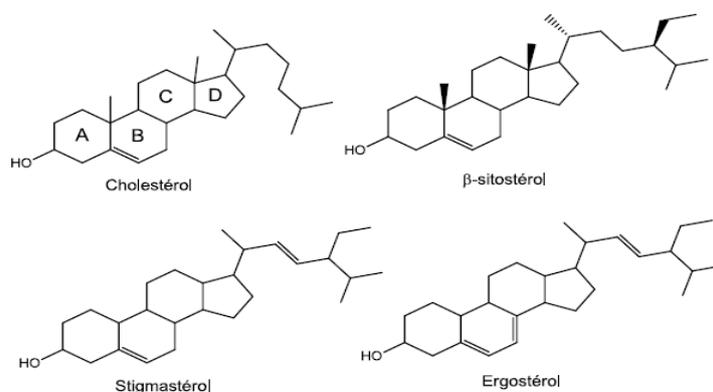


Figure 13. Exemples de quelques stéroïdes

IV.2. Propriétés biologiques des triterpènes

L'importance thérapeutique des triterpènes et stéroïdes représentent un enjeu capital dans le domaine de la recherche des substances naturelles. (**Bruneton, J 1999 ; Dey and Harborne 1991 ; Manitto and Sammes1981**). Les diverses propriétés pharmacologiques attribuées à ces composés ont permis leur classement en tant qu'un groupe de métabolites secondaires de grande importance. Ces composés manifestent entre autres :

- ❖ Des potentialités thérapeutiques dans différents domaines : cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, molluscicides, etc...
- ❖ Un intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique particulièrement la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés : contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoire, etc.
- ❖ Un intérêt thérapeutique concernant l'extraction des molécules bioactives, pour l'obtention des formes galéniques simples ou pour celle de préparation en phytothérapie.
- ❖ Une importance économique du fait de leur utilisation dans les industries agroalimentaires.

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

La plante *Atractylis flava Desf*, a été collectée de la région de Biskra, au mois de Mai 2015. La plante a été séchée à l'ombre à température ambiante. Après son séchage, elle a été broyée et stockée dans des flacons opaques à l'abri de la lumière.

L'identification du matériel a été réalisée par un botaniste Professeur. Bachir Oudjehih. (Institut d'agronomie, université de Batna 01), *Atractylis flava Desf* a été déposée dans l'herbier de l'institut d'agronomie, sous le spécimen suivant : (N° 660/LCCE)

II. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est un ensemble des techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante (Sofowora.,1982).

Le criblage phytochimique a été réalisé selon les techniques analytiques qualitatives décrites dans la littérature (Dahou et al. 2003, Békro et al.,2007, Bruneton., 2009). Ces méthodes sont basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques.

II.1. Détection des polyphénols

Les polyphénols sont caractérisés par la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3). A 2ml d'infusé à 5 % de poudre végétale on ajoute 2 gouttes de solution alcoolique de FeCl_3 à 2%. L'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (Bruneton., 2009).

II.2. Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'infusé à 5 % de poudre végétale avec 1ml d'HCl concentré et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Bruneton, 2009).

II.3. Détection des alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes a été effectuée à partir des réactifs de Buchard (réactif iodo-ioduré) et de Dragendorff (réactif de l'iodo-bismuthate de potassium). 0.1 ml de l'infusé à 5 % de poudre végétale d'extra est repris dans 6 ml d'éthanol à 60%, puis reparti dans 2 tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indique un test positif. Dans le deuxième tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Burchard. L'apparition d'un précipité de coloration brun – rougeâtre indique une réaction positive (Sofowora, 1982).

II.4. Détection des terpènes

Les stérols et les polyterpènes ont été mis en évidence par la réaction de Liebermann. 1 g de poudre est mis à macérer dans 20 ml d'éther diéthylique pendant 24 heures, le mélange est ensuite filtré et complété à 20 ml. 10 ml de filtrat est évaporé à, le résidu sec est dissous dans un mélange de 1 ml d'anhydride acétique et 1ml de chloroforme et ensuite partagé entre deux tubes. L'un servant de témoin et le second contenant préalablement 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette à la couche surnageante révèlent la présence des stérols et des polyterpènes (Bruneton, 2009).

II.5. Détection des saponosides

La présence des saponines a été mis en évidence par la mesure de la hauteur de mousse (Dahou et al., 2003). Dans un bécher, on ajoute 100 ml d'eau distillée à une quantité de 2 g de poudre végétal, puis la solution est portée à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement, on filtre le mélange et on ajuste le filtrat à 100 ml avec l'eau distillée. Dans une série de dix tubes à essai, sont introduits successivement 1, 2,10 ml du décocté aqueux à 2% puis le volume est ajusté dans tous les tubes à 10 ml avec l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur. Après un repos de 15 min, la hauteur de la mousse est mesurée, si cette dernière est égale à 1 cm, la dilution de la substance dans ce tube correspond à l'indice de mousse recherché, il est égal à 1000/ n° tube. Un indice supérieur à 100 est considéré comme une réaction positive témoignant d'une richesse de la plante en saponosides.

II.6. Composés réducteurs

On ajoute 1 ml de l'extrait à 2 ml de solution Fehling, puis les tubes sont incubés au bain marie pendant 20 minutes. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique.

III. Macération et extraction

III. Préparation de l'extrait brut

Dans cette partie, nous avons tenté d'extraire le maximum de composés à partir de la plante entière *Atractylis flava* Desf. 1000 g de la poudre de la plante est macéré dans un mélange hydroalcoolique (MeOH-H₂O : 80 :20).

La macération est effectuée 2 fois avec renouvellement de solvants toutes les 24h. La filtration et l'évaporation du solvant ont permis d'obtenir 500 ml d'extrait aqueux. Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums solide : liquide, les plus souvent trouvés dans la littérature, sont généralement situés entre 1/10 et 1/50 (mg/ml) (Michel, 2011). On a choisi le ratio 1/10 (mg/ml) dans la présente étude.

III. Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction Liquide – Liquide

Pour séparer l'extrait brut méthanolique en fractions de polarités différentes, nous avons opté pour une extraction liquide-liquide qui permette de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques entre deux phases liquides non miscibles. Cette méthode, résumée dans la (figure 14), comprend deux grandes étapes : la première étape d'extraction se fait avec un mélange hydroalcoolique (MeOH-H₂O : 80 :20) pour solubiliser les composés phénoliques et la deuxième étape consiste en un fractionnement liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante, à savoir : l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Le rendement d'extraction (**Rdt**) a été calculé par rapport au poids de matière végétale sèche selon la formule :

$$rdt = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenue}}{\text{Masse de poudre initiale}} \times 100$$

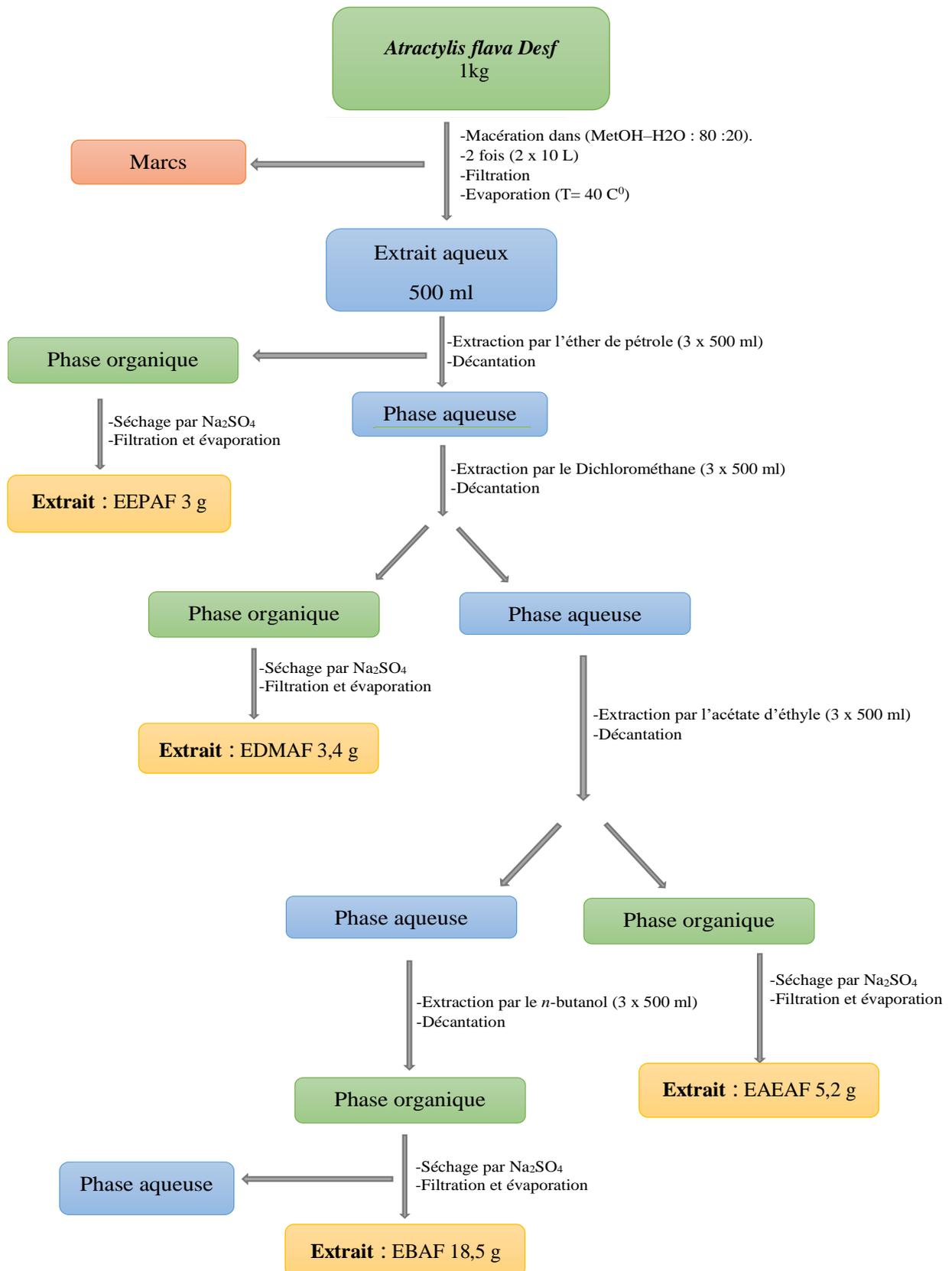


Figure 14. Schéma d'extraction de la plante *Atractylis flava* Desf.

IV. Dosage phytochimique des extraits

IV.1. Dosages des polyphénols totaux

La teneur phénolique total est déterminée par la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (FCR) (Djeridane et al., 2006 ; Singleton et al., 1999). La courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par un milligramme d'extrait ($\mu\text{g AGE/mg}$). Ces tests ayant comme principe le phénomène d'oxydoréduction ne sont pas spécifiques à une classe de polyphénols et souffrent d'interférences avec les amino-acides de type tyrosine et d'autres composés non phénoliques tels que l'acide ascorbique (Dykes et Rooney., 2006).

IV.1. Dosages des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium (Türkoğlu et al. 2007). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$).

I. Evaluation de l'activité antioxydante

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement ces dernières années. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires. Les méthodes d'évaluations du potentiel antioxydant d'une substance sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H•.

La mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro de nos extraits d'*Atractylis flava* Desf a été réalisée par sept méthodes à savoir : piégeage du radical libre DPPH, Piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, Chélation des ions métalliques, DMSO, pouvoir réducteur, blanchissement du β-carotène.

I.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Blois et al (1958)**.

▪ *Mode opératoire*

Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2diphenyl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH préparée dans le méthanol et 160 µl de cette solution ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT a été utilisé comme standard antioxydant, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100$$

I.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu²⁺) [Nc₂-Cu²⁺]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

▪ Mode opératoire

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak *et al* (2004). Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50 µl Cu (II) (10 mM), 50 µl neocuprine (7,5 mM), et 60 µl de solution tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7,0). Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial afin de rendre le volume final de 200 µl. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de BHA et du BHT. Les résultats ont été calculés à titre de A0.5 (µg / ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

I.3. Activité de blanchissement du β-carotène

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009). L'activité de blanchissement du β-carotène de nos extraits a été évaluée en utilisant le système de modèle de l'acide β-carotène-linoléique (Miller, 1971).

▪ Mode opératoire

Une masse de 0,5 mg de β-carotène dissoute dans 1 ml de chloroforme puis ajouté à un volume de 25µl d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène, ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du β-carotène doit être comprise entre 0.8 et 0.9 nm. Un volume de 160µl de cette solution préparée, a été ajouté à un volume de 40µl d'extrait pour les différentes concentrations. L'absorbance a été mesurée à 470 nm en utilisant un lecteur de microplaque. Le BHA A été utilisés comme standard.

I.4. Activité du piégeage de l'ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS^{•+}, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline -6-sulfonique), qui présente un spectre d'absorption dans le visible avec trois maximas à 645, 734 et 815 nm (**Belkheiri, 2010**). En réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), l'ABTS forme le radical ABTS^{•+}, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été déterminée selon le procédé de (**Re et al.,1999**).

▪ Mode opératoire

Un stock d'une solution mère d'ABTS^{•+} stable est préparé en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium. Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 h avant utilisation. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Cette solution est par la suite diluée avec l'éthanol afin d'avoir une absorbance de 0.708 (± 0.025) à 734 nm. Ensuite, 160µl de la solution de L'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 40µl de la solution d'extrait dissout dans l'éthanol à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage des L'ABTS^{•+} a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100$$

I.5.Chélation des ions ferreux

La chélation des ions ferreux est déterminée suivant une méthode basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-Ferrozine, chromophore de couleur violette intense ayant un maximum d'absorption à 562 nm (**Zhao et al., 2006**). En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de l'intensité de couleur qui sera suivie spectrophotométriquement. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait test é est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

▪ **Mode opératoire**

La chélation des ions ferreux est déterminée selon la méthode décrite par (Decker, et Welch, 1990). Les extraits de différentes concentrations et de volume de 40 µl ont été ajoutés à une solution de 40µl FeCl₂ (0.2 mM) et 40 µl d'éthanol. La réaction a été amorcée par l'addition de 80 µl de ferène (0.5 mM). Le mélange a été agité vigoureusement et laissé au repos à une température ambiante pendant 10 min. Après que le mélange a atteint l'équilibre, l'absorbance a été déterminée à 562 nm, les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100$$

I.6. Réduction de fer

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (Yildirim et al., 2001).

▪ **Mode opératoire**

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986). Les différentes concentrations des extraits (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃, 6 H₂O (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La concentration IC₅₀ qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro

L'activité Anti-inflammatoire des extraits d'*Atractylis flava* Desf in-vitro a été déterminée par la méthode de (sangita et priyanka., 2012). Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par les extraits.

▪ **Mode opératoire**

La solution d'essai (Ts) (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 5 % et 0,05 ml des extraits de la plante avec les concentrations 125, 250,500 et 1000µg/ml. La solution contrôle test (Tc) (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillée. La solution contrôle produit (pc) (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml des extraits de la plante avec les concentrations 125, 250,500 et 1000µg/ml. La solution standard test (ss) (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec les concentrations 125, 250,500 et 1000µg/ml. Toutes les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N), les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder l'échantillons à 57°C pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline « tampon » (pH 6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV –visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{ATS - Apc}{ATc} \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparé avec le diclofénac sodium.

ATS : absorbance de la solution d'essai, **Apc** : absorbance La solution contrôle produit, **ATC** : absorbance de La solution control test.

III. Evaluation de l'activité antidiabetique in vitro

III. Effet d'EBAF sur l'inhibition de Alpha-amylase

L' α -amylase est responsable de la dégradation des hydrates de carbone au niveau de l'intestin grêle. Cette dégradation permet l'absorption du glucose et fait augmenter la glycémie. De ce fait, l'inhibition de cette enzyme permette une limitation de l'augmentation de la glycémie postprandiale. (Goetz. P, 2007). L'inhibition de Alpha-amylase des extraits de la plante *atractylis flava* Desf est réalisée par la méthode décrite par (Kunyanaga Mccue et Shetty.,2002).

▪ **Mode opératoire**

Un volume de 100 µl de solution tampon du phosphate de sodium à une concentration de 0.02 mol / l (pH = 6.9) et mélangé avec 100 µl d'extraits *n*-butanol de la plante (différentes

concentrations). Puis ajouté à 100 µl d'enzyme α-amylase (1 ml libère 1.9 µg de maltose). Le mélange résultant est ajouté à 100 µl de l'amidon (1 g/100 ml d'eau distillée) avant d'incubé à 25 °C pendant 30 min. la réaction précédente est arrêtée par 1 ml de l'acide dinitrosalicylique. Le mélange est incubé dans un bain marie d'eau pendant 5 min et on laisse reposer et refroidir à température ambiante avant l'addition de 5.4 ml d'eau. L'absorbance est mesurée à 540 nm et comparée avec le témoin (solution tampon sans extrait). Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'extrait est calculée en utilisant l'équation suivante.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

III. Effet d'EBAF sur l'inhibition d'Alpha-glucosidase

L'alpha-glucosidase agit sur le maltose et le maltotriose pour former un monosaccharide (glucose) qui pénètre dans les vaisseaux sanguins. Dans le cas des diabétiques de type 2, la digestion des glucides après les repas conduit à une condition appelée hyperglycémie postprandiale (PPHG) (Bhat et al., 2008 ; Sudha et al., 2010 ; Sudha et al., 2011). Donc, l'inhibition de cette enzyme peut retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, et retarder l'absorption du glucose ainsi que réduire les taux de glucose dans le plasma, aboutissant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale (Lebovitz, 1997)

▪ Mode opératoire

L'inhibition α-glucosidase est effectuée selon la méthode de kim et al. En utilisant ρ-nitrophényl-α-D-glocopyranoside (ρNPG) comme abstraite, qui est hydrolysé par α-Glucosidase pour libérer ρ-nitrophényl (un agent coloré qui peut être surveillée à 405 nm). Un volume de 200 µl de l'extrait *n*-butanol est ajouté à 700 µl de solution de α-glucosidase (1 unité / ml) préparée dans 0.1 mol / l de phosphate tampon (pH = 6.8). Le mélange résultant agité au vortex et incubé à 37 °C pendant 6 minutes, suivi par l'addition de 1 ml de ρNPG (4 mmol / l). L'absorbance est calculée à 405 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. Même mélange sans extrait des feuilles utilisé comme témoin. Le pourcentage de la capacité d'inhibition de α-glucosidase des extraits des est calculé à partir de l'équation suivante (Kim et al.,2012).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

IV. Test de Cytotoxicité contre l'*Artémia salina*

Un certain nombre d'études ont adopté l'utilisation du test de la cytotoxicité des extraits de plantes contre l'artémia comme un test de l'activité pesticide, anticancéreuse, larvicide, antiparasitaire et cytotoxique (Quignard et al., 2003).

▪ Préparation des *Artemia*

2 g des cystes de l'artémia a été déposé dans 500 ml de l'eau de mer, a PH 8,3 ajusté avec de l'NaOH. Le mélange est incubé sous lumière dans une étuve réfrigéré à 26°C durant 48h. Et afin d'assuré les besoins de l'artémia en oxygène une pompe est relié au récipient contenant les œufs.

▪ Protocole

Après l'éclosion des œufs, les larves sont mises en contact avec différentes concentrations des extraits (4 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml). 100 µl de chaque concentration préparée dans le DMSO est déposée dans un tube contenant 4,9 ml de l'eau de mer avec 10 larves de l'artémia. Les tubes sont par la suite incubés pendant 24 h à 26°C. Un tube control est préparé en remplaçant l'extrait par 100 µl du DMSO. Les résultats sont obtenus par comptage des larves survivantes. Pour chaque concentration la dose létal 50 est calculée (dose nécessaire pour tuer 50% des larves). Les pourcentages de mortalité sont calculés selon l'équation donnée par Meyer et al 1982.

$$\% \text{ de mortalité} = [(A-B) / B] * 100$$

Où :

A : nombre de larves mortes dans l'extrait.

B : nombre de larves mortes dans le control.

V. Evaluation de l'activité anticancereuse

V.1. Culture cellulaire

Les cellules THP-1 sont une lignée de monocytes humains, provenant de patients atteints de leucémie. Ces cellules tumorales se multipliant très rapidement, leur utilisation est très répandue lorsqu'il s'agit d'effectuer des tests cellulaires in vitro, nécessitant un modèle cellulaire humain. Elles expriment les antigènes HLA A2, A9, B5, DRw1 et DRw2, ainsi que le récepteur C3 du complément. Elles produisent également des lysozymes (Tsuchiya et al.,1980).

Les cellules sont cultivées dans un milieu complet qui contient du 2-mercaptoethanol de concentration 0,05 mM, ainsi que 10% de SVF. Le renouvellement du milieu de culture est nécessaire au maintien en vie des lignées cellulaires, tous les 2 à 3 jours. Les conditions de

culture doivent respecter une atmosphère contenant 5% de CO₂, le tout à une température de 37,0 °C. La cryoconservation s'effectue en ajoutant 5% de DMSO. Dans le cadre de nos expériences, afin d'avoir N=4, nous utiliserons des cellules THP-1 issues de 4 réplicas différents.

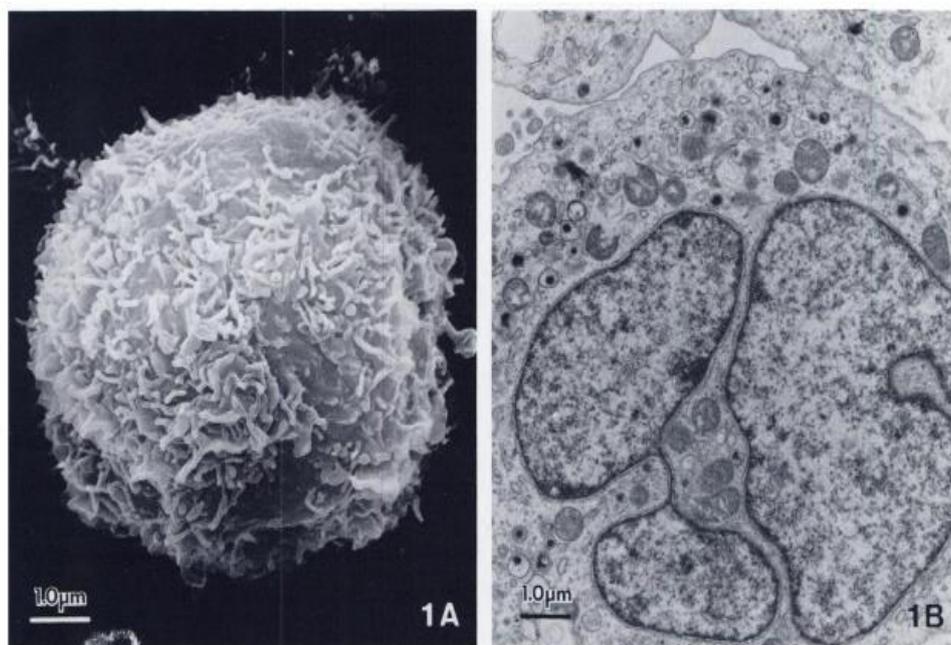


Figure 15. Cellule THP-1 au microscope à balayage (x 11 000) - 1A. Cellule THP-1 au microscope électronique à transmission (x 9 500) (Tsuchiya et al., 1982).

V.2. Test de cytotoxicité au WST-1

Le test WST-1 permet de mesurer l'activité mitochondriale des cellules. Le principe repose sur le clivage du sel de tétrazolium en formazan, via une enzyme qui est le succinate déshydrogénase. Cette enzyme joue un rôle dans la respiration mitochondriale ; elle n'est donc active que dans les cellules vivantes. Ainsi la présence de formazan, mesurée par une technique de fluorimétrie, est synonyme de viabilité cellulaire (Pujalté et al., 2011 ; L'Azou et al., 2008).

Le test consiste à mettre en contact le réactif WST-1 avec les puits contenant les cellules que l'on veut tester. Après avoir respecté un temps d'incubation de 2 heures, un lecteur de microplaques permet de mesurer l'absorbance des puits à 415 nm.

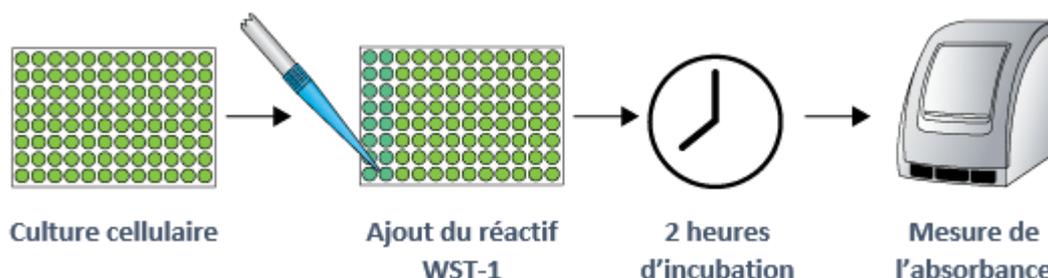


Figure 16. Protocole schématisé du test WST-1.

V.3. Test de cytotoxicité au Alamar bleu

Alamar blue est un test de viabilité cellulaire très fréquemment utilisé par les industriels et les chercheurs afin d'apprécier l'activité mitochondriale de cellules humaines, animales, bactériennes, ou fongiques. Le principe de ce test colorimétrique repose sur la résazurine, qui est le substrat actif. Cette molécule est hydrosoluble, stable en milieu de culture, non toxique pour les cellules, et traverse aisément la membrane cellulaire. La résazurine est un indicateur de couleur bleue ; il s'agit de la forme oxydée de la molécule. Quant à la forme réduite, il s'agit de la résorufine qui est de couleur rose fluo. La conversion de la résazurine en résorufine est permise grâce à des enzymes produites par les cellules vivantes, notamment le NADPH, FADH, FMNH, NADH, mais également par des cytochromes. La coloration n'étant pas visible à l'œil nu, une technique de fluorimétrie est indispensable pour mesurer l'absorbance entre 540 et 630 nm (Rampersad SN., 2012). Dans notre contexte, nous utilisons le test Alamar blue dans le but d'étudier la viabilité cellulaire, et pouvoir ainsi démontrer la cytotoxicité des échantillons que nous testons.

V.4. Test de cytotoxicité au bleu trypan

Le test au bleu trypan est un test d'exclusion, qui permet de déterminer le nombre de cellules vivantes dans une suspension cellulaire. Les cellules vivantes, de par leur intégrité membranaire, ne permettent pas la diffusion de colorants tel que le bleu trypan, le propidium, ou l'éosine. En revanche, les cellules mortes laissent aisément pénétrer ces colorants. Ainsi, le test consiste à mélanger la suspension cellulaire avec le bleu trypan, puis observer au

microscope les cellules : une cellule vivante présentera alors un cytoplasme transparent tandis qu'une cellule morte sera caractérisée par un cytoplasme bleu (Strober W et al.,2001).

V.5. Exploration des gènes

V.5.1. Extraction des ARN totaux

Les acides nucléiques sont extraits à partir des culots cellulaires grâce au TRIzol (*TRI Reagent*). Le TRIzol est une solution monophasique de phénol et de guanidinium isothiocyanate qui permet de dénaturer les protéines après s'être solubilisé avec le matériel cellulaire. L'addition de chloroforme va mettre en évidence trois phases distinctes : une phase organique qui contient les phénols, une interphase qui contient les protéines, et une phase aqueuse qui contient l'ARN. (Rio DC et al.,2008). La phase aqueuse est celle qui nous intéresse ; il faut donc réussir à l'isoler sans la contaminer par les autres phases. Après ajout d'isopropanol et centrifugation, nous obtenons un culot d'ARN qu'il faut ensuite laver à l'éthanol 80%, les ARN totaux sont élués de la matrice avec de l'eau et dosés grâce à un spectrophotomètre (nanodrop) BioSpec-nano® à 260 nm.

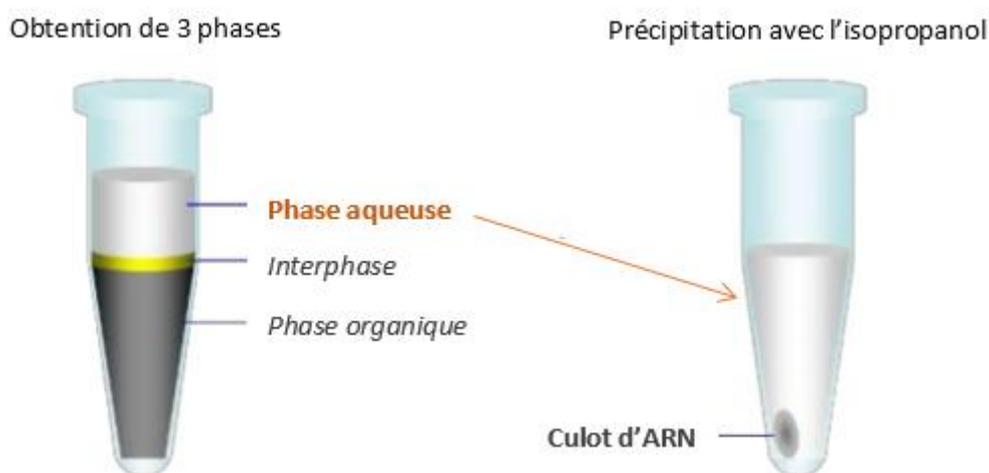


Figure 17. Schéma simplifié de l'isolement de la phase aqueuse contenant l'ARN.

Il existe deux ratios permettant de vérifier la qualité de l'ARN :

- 260/280 : ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2,2. S'il est inférieur, cela pourrait indiquer une contamination par des protéines.
- 260/230 : ce rapport doit également être compris entre 1,8 et 2,2. Si la valeur obtenue est inférieure à ce ratio, cela traduit une contamination.

V.5.2. Analyse par PCR quantitative (qPCR)

La qPCR est une technique utilisée pour détecter et quantifier un segment d'ADN, en permettant l'amplification d'une séquence spécifique de nucléotides, au milieu de l'immensité du génome. Une ADN polymérase thermostable permet cette amplification à un taux exponentiel ; il s'agit généralement de la Taq polymérase.

Une réaction de qPCR nécessite d'utiliser l'échantillon d'ADNc à amplifier, des amorces (qui sont des oligonucléotides), la Taq polymérase et les 4 désoxyribonucléotides constituant de l'ADN à savoir l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine (A, T, C, G) (Poitras E et al., 2002).

Le processus d'amplification est mesuré grâce à un fluorochrome qui, dans nos manipulations, est le SYBR Green, provenant du kit iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad). Cet agent se fixe sur l'ADN double brin pour ensuite émettre une fluorescence lors des phases d'élongation. Le profil type d'un cycle de PCR se caractérise par une ligne de base, une phase exponentielle, puis un plateau final.

Un cycle comporte 3 étapes :

- La dénaturation à 95°C pendant 15 secondes : l'ADN initialement double brin est scindé en deux simples brins
- L'hybridation des amorces sur l'ADN à 60°C pendant 40 secondes : les amorces s'apparient sur les bases complémentaires de l'ADN
- L'élongation à 72°C pendant 40 secondes : la Taq polymérase permet de synthétiser l'ADN complémentaire de chaque brin, de l'extrémité 5' vers 3'

V.5.3. Analyse par PCR RT-PCR (reverse transcriptase)

La RT-PCR nécessite d'avoir préalablement extrait l'ARN que l'on veut étudier afin d'en obtenir l'ADN complémentaire ou ADNc synthétisé par des transcriptases inverses (*reverse transcriptase RT*). Ces enzymes utilisent une amorce dont les extrémités sont 3'-OH, qui leur permet de débiter la synthèse du brin d'ADNc. Une réaction de qPCR permettra ensuite une amplification de cet ADNc (Figure 28).

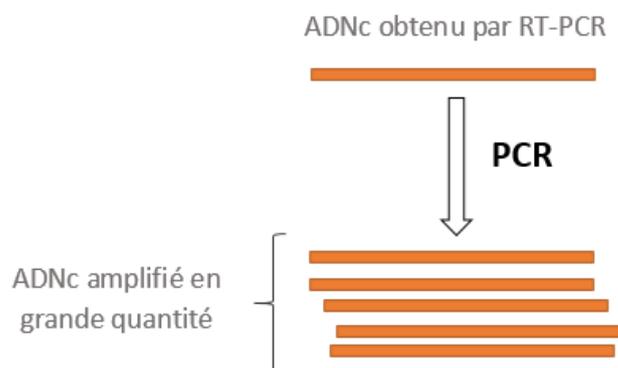


Figure 18. Schéma simplifié du principe de l'obtention d'ADNc par RT-PCR et qPCR.

▪ *Gènes d'intérêts*

Nous décidons d'étudier 8 gènes qui vont nous permettre d'explorer la mort cellulaire ; OPA1, NCF1, PDCD4, TNF- α , CASP 3, CASP 8, SDHA, et BCL-2. (**Tableau 01**).

Tableau 01. Les amorces utilisées pour l'expression génique.

Classe fonctionnelle	Gène	Séquence
	ACTB (contrôle)	F :5'-TTGGCAATGAGCGGTTCC-3' R :5'-GTACTTGCCTCAGGAGGAG-3'
Apoptose	PDCD4	F : 5'-AGACCAAATGAAAAGAGGTTATGAG-3' R : 5'-GCCCCTTGAAGGACAAAGAT-3'
	BCL2	F : 5'-GAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3' R : 5'-GCATCCCAGCCTCCGTTAT-3'
	CASP8	F : 5'-GAAAGGGTGGAGCGGATTAT-3' R : 5'-GCTTCCTTTGCGGAATGTAG-3'
Stress oxydatif	NCF1	F :5'AGAGTACCGCGACAGACATC-3' R : 5'-TAGTTGGGCTCAGGGTCTTC-3'
	OPA1	F : 5'-CTTCCATGAGGGTCCATTTG-3' R : 5'-CCGTTAGCCCTGAGACCATA-3'
	SDHA	F : 5'-GCCAGGACCTAGAGTTTGTTC-3' R : 5'-GCCTTGACTGTTAATGAGAATGC-3'
Inflammation	TNF α	F : 5'-TAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' R : 5'-GATGGCAGAGAGGAGGTTGA-3'

OPA1 :

La protéine OPA1 a pour principal rôle de permettre la régulation de la morphologie des mitochondries en jouant un rôle déterminant dans le processus de fusion. En effet, les mitochondries subissent constamment des changements morphologiques par des processus de fissions et de fusions. Le gène OPA1 joue également un rôle dans le maintien de l'ADN mitochondrial, et dans les processus d'apoptose (**Landes et al.,2010**).

NCF1 :

Le gène NCF1 fournit les instructions nécessaires à la fabrication d'une protéine appelée le facteur cytosolique des neutrophiles 1 (en anglais, *Neutrophil Cytosolic Factor 1*), dont le rôle est de participer à la formation du complexe enzymatique NADPH oxydase. Présente dans les phagocytes, la NADPH oxydase joue un rôle essentiel dans le système immunitaire. En convertissant l'oxygène en superoxyde puis en d'autres EROs, l'enzyme participe à la destruction des corps étrangers (**Babior et al.,2002**).

PDCD4 :

PDCD4 est un gène suppresseur de tumeur dont l'acronyme signifie *Programmed Cell Death 4*. Sa localisation est nucléaire et cytoplasmique. Il code pour une protéine se liant au facteur initiateur de la traduction (4A1) et bloque sa fonction, ce qui conduit à une inhibition de l'ARNm (**Vikhreva et al.,2010**).

TNF- α :

Le facteur de nécrose tumoral ou *Tumor Necrosis Factor*, est un gène qui code pour une cytokine pro-inflammatoire sécrétée principalement par les macrophages. Cette cytokine est impliquée dans différents processus biologiques dont la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme lipidique et la coagulation. Nous retrouvons également le TNF- α dans les maladies auto-immunes et le cancer (**Idriss et al.,2000**).

CASP 3 et CASP 8 :

Les caspases sont une famille de protéase à cystéine (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) dont le rôle est essentiel dans les processus d'apoptose. Le gène CASP 3 code pour la caspase 3, et le gène CASP 8 code pour la caspase 8.

L'activation séquentielle des caspases joue un rôle central dans la phase d'exécution de l'apoptose cellulaire. Les caspases existent sous forme de proenzymes inactives, puis subissent un traitement protéolytique sur des résidus aspartiques pour former deux sous-unités qui se dimérisent afin de constituer l'enzyme active. Caspase 3 clive et active les caspases 6, 7 et 9, tandis qu'elle-même est activée par les caspases 8, 9 et 10. **(Bhattacharyya et al.,2010).**

SDHA :

Le gène SDHA code pour une des quatre sous-unités de l'enzyme nommée succinate déshydrogénase (SDH). Cette enzyme joue un rôle essentiel dans les mitochondries, où elle intervient dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydante. La protéine SDHA est responsable de la conversion du succinate en fumarate ; ce processus, en libérant des électrons va fournir de l'énergie pour produire de l'ATP (adénosine triphosphate), qui est la principale source d'énergie de la cellule **(Santi et al.,2017).**

BCL-2 :

BCL-2 ou *B cell lymphoma 2* code pour une protéine membranaire mitochondriale qui inhibe la mort cellulaire. Cette protéine anti-apoptotique bloque la dimérisation d'autres protéines semblables (Bax et Bak) qui entraîne normalement une perforation de la membrane mitochondriale externe et une perturbation de la chaîne respiratoire **(Westphal et al.,2011).**

V.6. Test d'apoptose caspase 3

La caspase 3 est une protéase à cystéine dont l'expression joue un rôle dans les processus apoptotiques. Le kit EnzChek® Caspase-3 Assay permet d'apprécier les phénomènes apoptotiques en mesurant principalement l'activité de la protéine caspase 3. Le test utilise un substrat qui est un dérivé de la 7-amino-4-méthylcoumarine ; celui-ci donne une fluorescence bleu brillant lors du clivage protéolytique de l'enzyme, mesurée grâce à un fluorimètre. **(Gevrenova et al.,2017).**

I. Matériel animal

L'étude in vivo a été réalisée sur des rats de l'espèce Wistar (mâles et femelles) obtenus de l'Institut Pasteur d'Alger, pesant entre 130 g et 210 g. Ces rats sont logés dans des cages en polypropylène à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Après 7 jours d'adaptation les rats sont pesés, marqués et reparties en groupes.

II. Etude toxicologique

II. Toxicité aigüe de L'EBAF

L'essai de toxicité a été mené suivant la méthode de « l'ajustement des doses » de la ligne 423 de l'OCDE qui consiste à tester l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf à la dose 2000 mg/kg. L'essai a été réalisé sur 10 rats femelles. Après 24 h de jeûne, elles ont été réparties de la façon suivante : **lot témoin** constitué de 5 femelles recevant de l'eau physiologique (NaCl 0,9%), à raison de 10 ml/kg ; **lot expérimental** constitué de 5 femelles recevant l'extrait, à raison de 2000 mg/kg. Une observation comportementale a été réalisée 3 h après administration des substances. Ensuite Leur comportement a été observé ainsi que le nombre de décès sur une période de 14 jours.

II.1. Autopsie générale

Tous les animaux d'essai ont été euthanasiés et soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique et microscopique à la fin du traitement. L'attention était portée sur les reins et le foie. Ces derniers ont été rincés avec une solution salée à 0,9%, puis pesés. Le poids relatif de chaque organe a été calculé suivant la formule :

$$Pr = \frac{Po}{Pa} \times 100$$

Pr : poids relatif de l'organe (g/100 g)

Po : poids de l'organe (g)

Pa : poids corporel du rat (g).

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau de laboratoire d'anatomie-pathologique de **C.H.U de Batna**.

II.1. Hématologie et biochimie clinique

Les animaux ont été mis à jeun durant la nuit qui a précédé la prise de sang. A la fin de la période d'essai, des échantillons de sang artérioveineux ont été prélevés au cours du sacrifice des animaux, une partie dans des tubes EDTA, et l'autre partie dans des tubes à héparine de 5 ml. Le sang contenu dans ces derniers a été centrifugé pour obtenir le sérum. Avec le sang contenu dans les tubes EDTA, les examens hématologiques de Numération Formule Sanguine (NFS) ont été effectués par un analyseur (*ADVIA® 2120i System*). Le sérum obtenu a été utilisé pour des dosages biochimiques en utilisant un automate de biochimie (*COBAS INTEGRA® 400 plus*).

III. Évaluation de l'activité diurétique

Les diurétiques augmentent l'élimination urinaire d'électrolytes, notamment de sodium. Tous ont un effet antihypertenseur par diminution des résistances vasculaires périphériques attribuée à une déplétion sodée, consécutive à leur effet diurétique. Certains d'entre eux peuvent, en outre, réduire directement la concentration de sodium intracellulaire des muscles lisses vasculaires en modifiant les échanges ioniques au niveau des membranes plasmiques. La diminution du sodium intracellulaire tend à réduire la concentration de calcium intracellulaire car l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fait alors entrer du sodium dans la cellule, ce qui entraîne la sortie de calcium. La diminution de la pression artérielle n'est donc pas habituellement la conséquence d'une diminution de la masse sanguine circulante ou hypovolémie, secondaire à une diurèse aqueuse abondante (**Dorosz, 2004**).

- **Protocole opératoire**

30 rats mâles ont été divisés en cinq groupes de six rats dans chacun. Le groupe témoin négatif reçoit (l'eau physiologique (10 ml/Kg, p.o), le groupe II a reçu du furosémide (10 mg/Kg, p.o) dans le véhicule (Na Cl 0.9%) ; les autres groupes III, IV, V ont été traités avec les doses 100,250,500 mg/kg de l'extrait *n*-butanolique immédiatement après le traitement, tous les rats ont été hydratés avec une solution saline (25 ml/kg) et placés dans des cages métaboliques (6/cage), spécialement conçues pour séparer l'urine et les fèces. Les urines collectées pendant 5 heures ont été recueillies dans une éprouvette graduée et le volume a été noté, la composition électrolytique (Na^+ , K^+ et Cl^-) de l'urine collectée pour les différents groupes a été analysée par un analyseur (*Medica EasyLyte® plus*). Pendant cette période, aucune nourriture et eau n'ont été mises à la disposition des animaux.

L'excrétion urinaire volumétrique (EUV) est donnée par la formule suivante :

$$EUV = \frac{\text{Volume excrété}}{\text{Volume administré}} \times 10$$

Estimation de l'activité diurétique selon **Kau et al 1994** :

Valeur EUV < 80%	Activité antidiurétique.
Valeur EUV comprise entre 80- 110%.....	Pas d'activité diurétique.
Valeur EUV comprise entre 110- 130%.....	Faible activité diurétique.
Valeur EUV comprise entre 130- 150%.....	Modeste activité diurétique.
Valeur EUV > 150%.....	Importante activité.

IV. Évaluation de l'activité antipyrétique

La fièvre est une réaction non-spécifique de défense de l'organisme développée en réponse à l'action de différents agents déclencheurs appelés des pyrogènes exogènes. Le rôle de la fièvre est celui de signal d'alarme (**Axelrod et al., 2008**). L'induction de la fièvre chez l'animal par injection de substances pyrogènes est le principe fondamental de l'évaluation préclinique de l'action antipyrétique des médicaments. L'injection de la levure de bière à 20% provoque une élévation de la température chez les rats (**Srinivas et al.,2011**).

- **Protocole opératoire**

Pour cette étude 25 rats males dont les Températures de base sont connues ont été sélectionnées. Les animaux ont été mis à jeun pendant 17 h. La fièvre a été provoquée par injection dorsolatérale d'une solution aqueuse de levure de bière à 20 % à la dose de 10 ml/Kg de poids corporel de l'animal. Après l'administration de la levure de bière, la température rectale de chaque animal a été prise avec un thermomètre.

Tous les animaux qui ont présenté une température $\geq 38\text{ C}^0$ ont été sélectionnés et répartis-en 5 lots de 5 rats.

- **Le lot I (témoin)** : a reçu de l'eau distillée par voie orale à raison de 10 ml/Kg de poids corporel de l'animal.
- **Le lot II** : a reçu le paracétamol de la dose de (150 mg/Kg).
- **Le lot III** : a été traité par l'extrait *n*-butanolique (100 mg/Kg).
- **Le lot IV** : a été traité par l'extrait *n*-butanolique (250 mg/Kg).

- **Le lot V** : a été traité par l'extrait *n*-butanolique (500 mg/Kg).

La température rectale de chaque rat a été mesurée à 1h, 2h, 3h,4h,5h après le traitement.

V. Évaluation de l'activité Anti-inflammatoire

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf, l'œdème de la patte est induit par l'ovalbumine selon la méthode de (Anosike et al.,2012). Cinq lots de Cinq rats sont utilisés dans ce test. L'œdème est provoqué par injection de l'ovalbumine 100 µl à 100 % au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du rat. L'épaisseur de l'œdème est mesurée par un pied à coulisse digital ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire. Ces rats ont été mis à jeun, 17 heures avant l'essai.

- **Lot témoin** : Les rats de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) par voie orale, 30 minutes avant l'injection de l'ovalbumine dans la voûte plantaire de la patte droite.
- **Lot référence** : Les rats de ce lot ont été traités par voie orale avec un anti-inflammatoire de référence (diclofénac), 30 mn avant l'injection de l'ovalbumine. L'administration de l'anti-inflammatoire se fait à raison de 30mg/kg.
- **Lots essai** : L'extrait à tester est administré aux rats par voie orale à raison de 100,250,500/kg ; 30 mn avant l'injection de l'ovalbumine.

Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait par mesure de la patte et ceci à 1, 2, 3, 4, 5 h après injection de l'ovalbumine. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait testé et son évolution a été estimée par la détermination des pourcentages moyens d'inhibition de l'œdème, calculés suivant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(tC_n - tC_0) \pm (tT_n - tT_0)}{(tC_n - tC_0)} \times 100$$

- **tC0** représente le volume de la patte à t=0 (avant injection de l'ovalbumine) pour le lot témoin.
- **tCn** représente le volume de la patte à un temps t quelconque pour le lot témoin.
- **tT0** représente le volume de la patte à t=0 (avant injection de l'ovalbumine) pour le lot traité.
- **tTn** représente le volume de la patte à un temps t quelconque pour le lot traité.

VI. Evaluation de l'activité antidiabétique

VI.1. Test de tolérance au glucose

10 rats normaux à jeun ont été répartis en trois groupes (n=5) pour l'évaluation de l'effet hypoglycémiant de l'extrait *n*-butanolique de la plante *Atractylis flava* Desf selon le protocole suivant : les rats ont été traités par voie orale par l'extrait *n*-butanolique à 250 et 500 mg/kg p.c., 60 min avant le gavage d'une solution de glucose (4g/kg p.c.). La glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage de l'extrait aqueux), à 60 min (le gavage du glucose), à 90,120 min. 5 rats ont servi de témoins et ont été gavés par une solution de NaCl (0.9%,10 ml/kg p.c.).

VI. 2. Induction de diabète expérimental

Des rats à jeun (16 heures) ont été traités par une dose intrapéritonéale unique d'alloxane à 125mg/kg p.c., préparée juste avant l'injection dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%) (Diatewa et al., 2004), Après une semaine de l'injection d'alloxane, les rats qui ont une glycémie supérieure ou égale à 2g /l, sont considérés comme diabétiques et sont utilisés dans les expériences.

VI.3. Effet aiguë de l'EBAF sur les rats diabétiques

L'activité antidiabétique de l'extrait *n*-butanolique a été testée sur 5 groupes de 5 rats sont : le groupe 1, contrôle diabétique recevant 1 ml d'une solution physiologique (Na Cl 0.9%) par voie orale ; les groupes 2, 3 et 4 reçoivent respectivement l'extrait *n*-butanolique par voie orale en une seule dose de 100, 250 mg/kg et 500 mg/kg dans une solution physiologique ; le groupe 5, contrôle standard, reçoit la Glibenclamide à la dose de 2,5mg/kg, p.o. La glycémie des animaux est mesurée avant gavage et à 30, 60, 90 et 120 min après le traitement.

V. Étude statistique

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

Résultats et discussion

I. Criblage phytochimique

Les tests de caractérisation effectués sur la poudre issue de la plante entière *Atractylis flava Desf* sont regroupés dans le **tableau 02**.

Tableau 02. Résultats du criblage phytochimique réalisé sur *Atractylis flava Desf*.

Tests	Résultats
Flavonoïdes	+
Polyphénols	+
Alcaloïdes	-
Stéroïdes et Terpènes	+
Composés réducteurs	+
Saponosides	+

+ : présence, - : Absence

L'étude du criblage phytochimique de la plante *Atractylis flava Desf*. Met en évidence la présence de plusieurs composés phytochimiques qui possèdent des activités biologiques très intéressantes. Il ressort des tests effectués la présence des polyphénols, des flavonoïdes, composés réducteurs, saponosides, Stéroïdes et Terpènes et l'absence des alcaloïdes.

Tous les composés phytochimiques identifiés ont des propriétés pharmacologiques intéressantes et leur utilisation est précitées dans le traitement de plusieurs pathologies. En effet, l'action thérapeutique des plantes résulte de ces éléments phytochimiques ou métabolites secondaires (Lagnika et al., 2016).

II. Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction ont été calculé par rapport au poids total de la poudre végétal utilisée. Les rendements sont regroupés dans le **tableau 03**

Tableau 03. Rendement des extraits d'*Atractylis flava Desf*.

	Solvant	Rendement (%)
<i>Atractylis flava Desf</i>	Ether de pétrole (EPAF)	0,30%
	Dichlorométhane (EDMAF)	0,34%
	Acétate d'éthyle (EAFAF)	0,52%
	<i>n</i> -butanol (EBAF)	1,85%

Le calcul des rendements a montré que l'EBAF représente le rendement le plus élevé, suivi par l'EAEAF, l'EDMAF, en fin le rendement de l'EEPAF est le plus faible. Les rendements d'extraction observés dépendent du solvant d'extraction, le rendement obtenu avec le n-butanol est le plus élevé (1.85%) par rapport aux autres solvants. Cela peut s'expliquer par le simple fait que le n-butanol est un solvant polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante.

IV. Dosage phytochimique des extraits

IV.1. Dosages des polyphénols totaux

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes à partir d'une courbe d'étalonnage (figures 19) exprimé en μg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (μg GAE/mg).

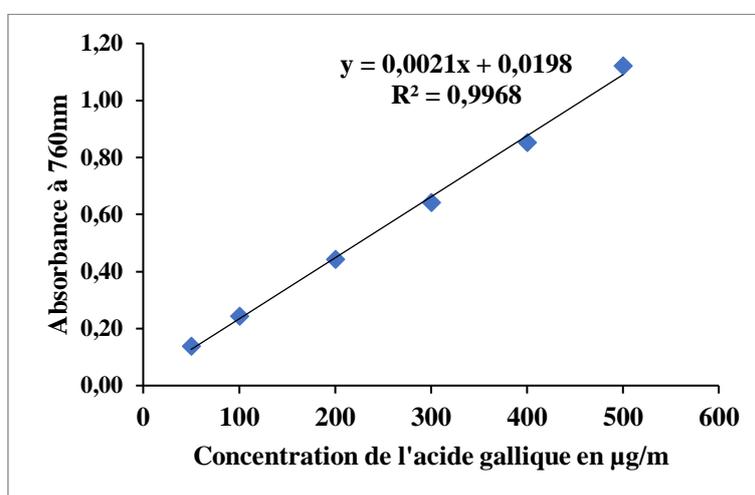


Figure 19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les concentrations des polyphénols (**Tableau 04**) sont relativement importants dans nos extraits, les teneurs en polyphénols sont de 122,74 μg EAG /mg dans l'extrait EBAF suivie de celles de L'extraits EAEAF et EDMAF avec 118,76 et 96,76 μg EAG /mg d'extrait respectivement et enfin celle d'extrait EEPAF avec 31,89 μg EAG /mg d'extrait.

Tableau 04. Teneur en polyphénols totaux.

Extraits	Total phenolic compounds content (μg EAG/ml)
Ether de pétrole (EEPAF)	31,89 \pm 0,56
Dichlorométhane (EDMAF)	46,18 \pm 0,33
Acétate d'éthyle (EAEAF)	118,76 \pm 0,27
n-butanol (EBAF)	122,74 \pm 0,78

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm écart-type (n=3).

Les composés phénoliques totaux ont été exprimés en μg d'équivalent acide gallique/ml (μg EAG/ml)

IV.1. Dosages des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercétine (**figure 20**).

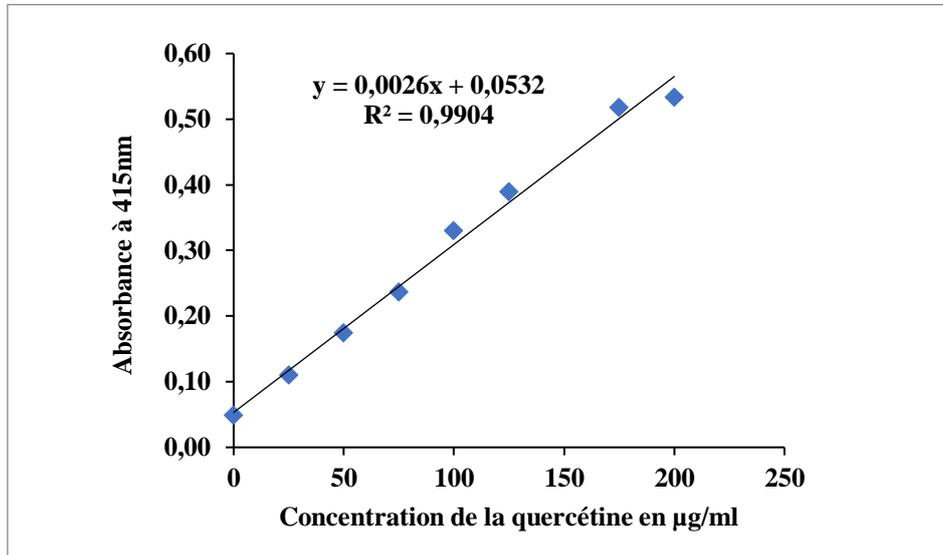


Figure 20. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait). Les teneurs en flavonoïdes (**Tableau 05**) des extraits EBAF et EAEF sont supérieures comparés aux extraits EDMAF et EEPAF 66,75 µg EQ/mg et 63,32 µg EQ/mg contre 18,22 µg EQ/mg et 13,10 µg EQ/mg d'extrait respectivement.

A notre connaissance, Aucun résultat sur le dosage des flavonoïdes et des polyphénols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur *Atractylis flava Desf* pour pouvoir comparer nos résultats.

Tableau 05. Teneur en flavonoïdes totaux.

Extraits	Flavonoïdes content (µg EQ/ml)
Ether de pétrole	13,10±1,13
Dichloromethane	18,22±3,37
Acétate d'éthyle	63,32±3,60
n-Butanol	66,75±6,12

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

La teneur en flavonoïdes a été exprimée en µg d'équivalent quercétine /ml (µg EQ/ml).

I. Evaluation de l'activité antioxydante

I.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Le test DPPH (tableau 06, figure 21) révèlent que tous les extraits testés possèdent une activité antiradicalaire dose-dépendante. La fraction acétate d'éthyle a montré une inhibition puissante du radical DPPH• très proche de celle du standard ; 89,37% à 800 µg/ml suivie par l'extrait *n*-butanolique 73,30 %. Par ailleurs, une modeste activité antiradicalaire a été exprimée par l'extrait éther de pétrole qui atteint 45,61 % a à 800 µg/ml.

Tableau 06. Activité antioxydante par le test de piégeage DPPH.

Extraits	% Inhibition						
	12,25 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Ether de pétrole	8,82±0,76	7,27±0,43	10,01±1,48	13,45±0,39	22,57±1,86	27,43±0,94	45,61±2,87
Dichloromethane	6,59±1,78	11,08±1,10	11,54±2,38	18,28±0,99	24,56±1,79	37,37±2,18	59,70±3,93
Acétate d'éthyle	14,21±1,72	17,54±1,33	28,07±0,46	37,91±2,05	58,60±2,15	82,05±1,41	89,37±0,84
<i>n</i>-butanolique	8,95±1,09	11,72±1,44	14,64±1,78	19,60±0,58	29,97±0,26	48,28±0,86	73,30±4,97
BHA	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

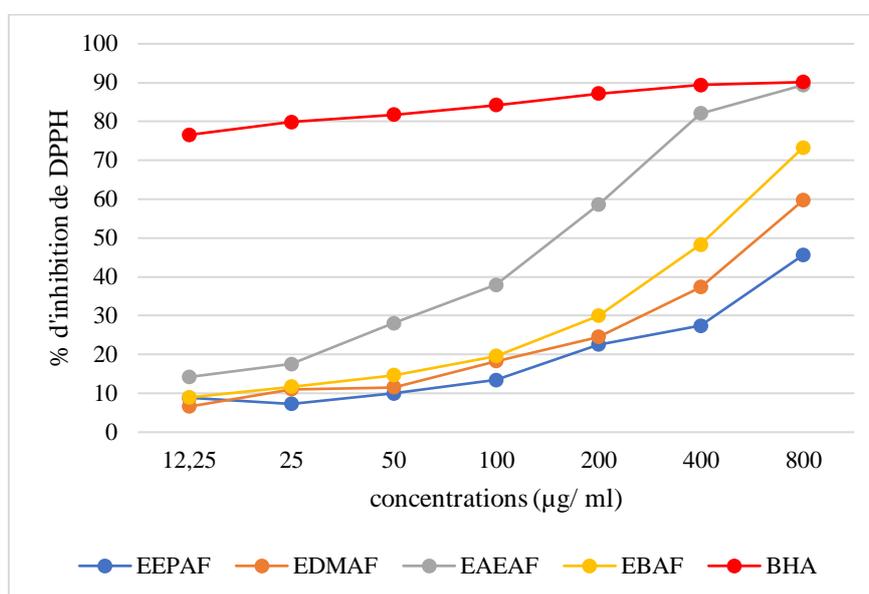


Figure 21. Activité antioxydante (DPPH) des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

Les valeurs IC₅₀ (Tableau 07) des extraits testés et du BHA ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés est représentée par la concentration.

Tableau 07. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le DPPH.

Extraits	IC ₅₀ µg/mL
Ether de pétrole	>800
Dichloromethane	625,26±5,25
Acétate d'éthyle	158,41±3,24
<i>n</i> -butanolique	427,53±4,69
BHA	6,14± 0,41

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

I.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de l'activité antioxydante totale par le test CUPRAC regroupés dans le **tableau 08** et la **figure 22** indiquent que le pouvoir réducteur de l'extrait acétate d'éthyle et de l'extrait *n*-butanolique s'élèvent de 4.29, 2.90 à la concentration 800 µg/ ml respectivement. Nous avons constaté que l'extrait acétate d'éthyle (4.29) présente une forte activité réductrice de cuivre qui dépasse celle du BHA (3.92) et celle du BHT (3.38).

Tableau 08. Activité antioxydante par le test CUPRAC.

Extraits	Absorbances a 450 nm						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Ether de pétrole	0,12±0,01	0,17±0,01	0,23±0,00	0,34±0,00	0,56±0,00	0,96±0,01	1,46±0,05
Dichloromethane	0,15±0,00	0,21±0,00	0,33±0,00	0,57±0,00	0,97±0,00	1,65±0,02	2,76±0,07
Acétate d'éthyle	0,27±0,00	0,45±0,01	0,77±0,01	1,33±0,01	2,25±0,09	3,56±0,07	4,29±0,08
<i>n</i> -Butanolique	0,19±0,00	0,27±0,00	0,43±0,01	0,71±0,01	1,18±0,01	1,94±0,08	2,90±0,09
BHA	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13
BHT	1,41±0,03	2,22±0,05	2,42±0,02	2,50±0,01	2,56±0,05	2,86±0,07	3,38±0,13

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

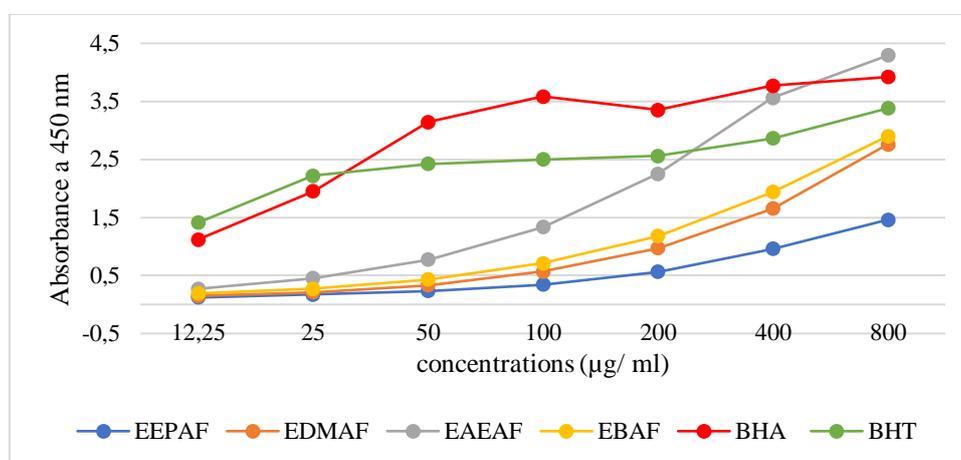


Figure 22. Activité antioxydante (CUPRAC) des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

Nous avons déterminé la concentration IC₅₀ pour comparer l'activité réductrice des extraits, les résultats sont résumés dans le **tableau 09**.

L'efficacité de réduction de cuivre est inversement proportionnelle à la valeur IC₅₀, La concentrations IC₅₀ la plus faible est signalée dans l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanolique à raison de 28,58 et 62,17 µg/ ml respectivement. Pour les autres extraits, les valeurs de IC₅₀ sont de 86,59 µg/ µl pour l'extrait dichlorométhane et de 171, 39 µg/ ml pour l'extrait éther de pétrole.

Ces résultats nous ont permet de conclure que l'extrait acétate d'éthyle présente une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits.

Tableau 09. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test CUPRAC.

Extraits	A _{0.50} (µg/mL)
Ether de pétrole	171, 39±1,44
Dichloromethane	86,59±0,55
Acétate d'éthyle	28,58±0,65
<i>n</i> -butanolique	62,17±0,27
BHA	5,35±0,71
BHT	8.97±3.94

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

I.3. Activité de blanchissement du β-carotène

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le teste β-carotène/ acide linoléique est dose-dépendante. A 800 µg/ ml, tous les extraits testés révèlent une puissante activité blanchissement du β-carotène de l'ordre de 98,99 % pour l'extrait dichlorométhane suivi par l'extrait éther de pétrole et acétate d'éthyle avec des pourcentages d'inhibition de 98 % et 96,94 % respectivement. Pour l'extrait *n*-butanolique, le pourcentage est de 93,33 % (**Tableau 10**, **figure 22**).

Tableau 10. Activité antioxydante par le test β-carotène.

Extraits	% Inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Ether de pétrole	13,92±1,21	38,51±1,98	71,60±1,71	87,37±1,90	91,13±0,35	95,90±0,20	98,00±1,74
Dichloromethane	19,94±2,68	43,06±3,72	70,33±1,31	83,98±3,32	95,76±4,60	98,60±0,81	98,99±0,21
Acétate d'éthyle	38,60±2,84	66,01±2,84	82,54±2,09	91,62±0,09	93,60±0,91	94,93±1,22	96,94±1,59
<i>n</i> -butanolique	15,07±2,23	37,68±3,52	65,92±1,35	80,62±2,95	90,17±1,39	93,92±0,67	93,33±3,80
BHA	86,78± 1,76	91,35± 0,47	94,29± 0,95	95,87± 0,29	97,02± 0,35	97,40± 0,03	98,79± 0,23

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

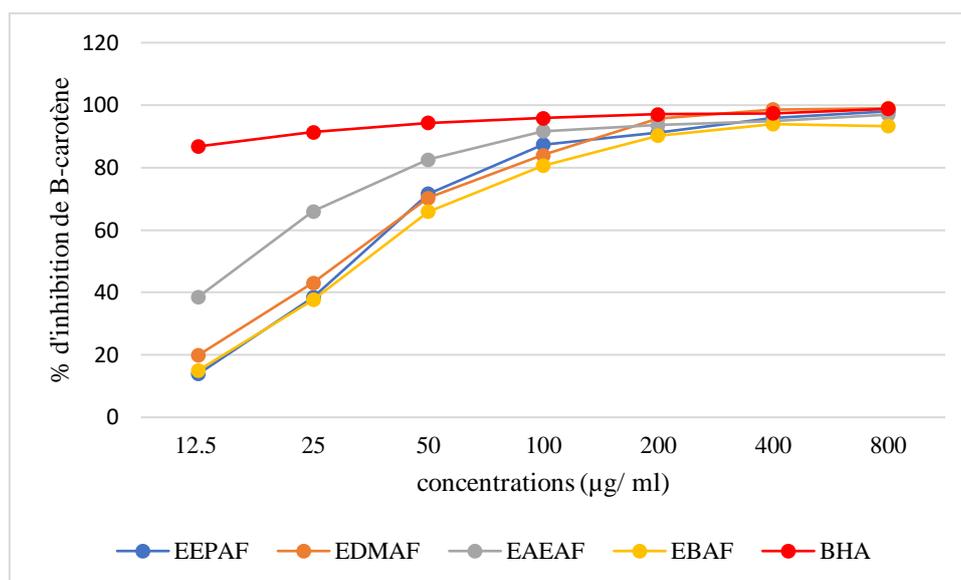


Figure 23. Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène en fonction des concentrations des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

Les valeurs IC_{50} calculées nous a permis d'évaluer l'efficacité de nos extraits (**Tableau 11**). Plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée. L'extrait acétate d'éthyle constitue un bon piégeur des radicaux libres en comparant avec les autres extraits.

Tableau 11. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC_{50} par le test β -carotène.

Extraits	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
Ether de pétrole	39,12 \pm 2,93
Dichloromethane	37,52 \pm 0,92
Acétate d'éthyle	16,52 \pm 1,87
<i>n</i> -butanolique	35,98 \pm 3,04
BHA	0,90 \pm 0,02

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm écart-type (n=3).

I.4. Activité du piégeage de l'ABTS

La cinétique de la réduction du piégeage de l'ABTS par les extraits d'*Atractylis flava* Desf sont exprimés dans le **la figure 24** et le **tableau 12**.

Le dosage de l'activité antioxydante par le piégeage de l'ABTS, au niveau des différents extraits montre que c'est les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique qui présentent la meilleure activité notamment à la concentration 800 $\mu\text{g/ml}$ où l'activité est équivalente à celle des témoins positifs utilisé.

Tableau 12. Activité antioxydante par le test ABTS.

Extracts	% Inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Ether de pétrole	2,83±4,84	6,13±2,10	10,62±4,90	17,02±4,49	35,70±1,47	59,11±0,68	64,56±5,84
Dichloromethane	16,18±4,27	27,62±1,80	39,53±2,78	58,93±1,73	77,13±1,98	88,63±0,27	82,88±3,02
Acétate d'éthyle	46,60 ±1,04	59,23±4,41	77,91±3,53	89,52±0,52	92,34±0,27	92,52±0,27	92,52±0,10
<i>n</i> -butanolique	25,94±1,35	43,90±6,53	54,62±13,99	66,59±6,22	90,48±1,26	92,40±0,27	92,76±0,10
BHA	27,10±1,10	59,56±2,50	93,04±0,50	94,48±0,16	94,48±0,29	94,57±0,00	94,53±0,08

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

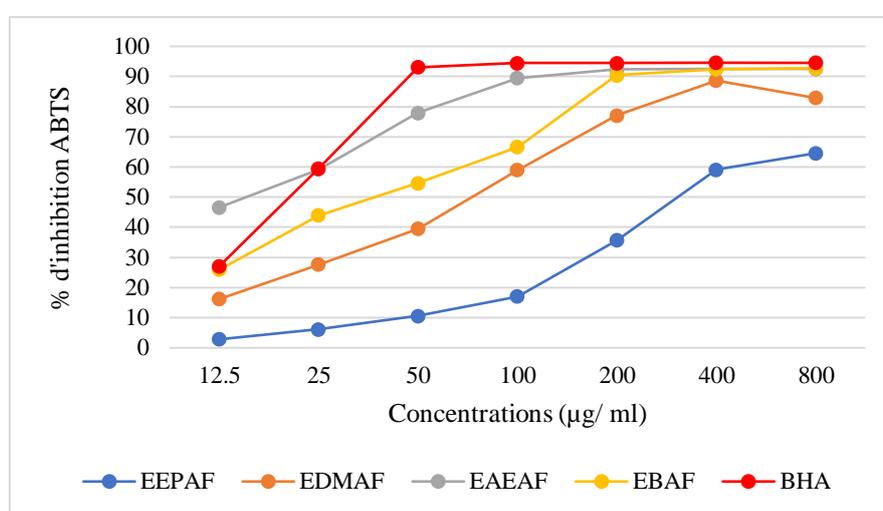


Figure 24. Activité antioxydante (ABTS) des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

Les résultats du **tableau 13** indiquent que L'extrait acétate d'éthyle présente l'effet antioxydant le plus élevé, avec une IC₅₀ inférieure à celle du BHA (15,57 µg/ml). En effet, l'extrait butanolique, dichlorométhane et éther de pétrole présentent les valeurs suivante (34,28 µg/ml, 77,62 µg/ml, 326,41 µg/ml respectivement).

Tableau 13. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test ABTS.

Extrait	IC ₅₀ µg/mL
Ether de pétrole	326,41±2,82
Dichloromethane	77,62±4,39
Acétate d'éthyle	15,57±2,93
<i>n</i> -butanolique	34,28±1,12
BHA	16,91±0,1

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

I.5. Chélation des ions ferreux

Les résultats de l'activité de Chélation des ions ferreux des extraits d'*Atractylis flava* Desf sont représentés dans le **tableau 14** et la **figure 25**. Nous constatons que la capacité Chélatrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration. Selon ce tableau, l'extrait Acétate d'éthyle et butanolique chélate les ions ferreux plus efficacement que les autres extraits. A une concentration de 800 µg/ml, révèlent une activité intéressante, comparable à celle du standard utilisé (EDTA), avec une inhibition de plus de 90 % suivi par l'extrait dichlorométhane et éther de pétrole qui présentent les valeurs suivante (80,79µg/ml, 50,60 µg/ml respectivement).

Tableau 14. Activité antioxydante par le test Chélation des ions ferreux.

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

Extraits	% d'inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Ether de pétrole	3,94±3,78	5,10±1,97	10,10±2,84	15,59±4,37	34,50±0,48	47,06±0,74	50,60±0,18
Dichloromethane	14,62±4,35	26,27±1,83	37,91±0,38	45,66±1,28	49,56±0,59	76,58±0,97	80,79±1,10
Acétate d'éthyle	36,76±1,40	45,54±6,92	47,18±47,18	49,99±1,22	73,90±0,28	76,89±2,74	91,77±1,11
<i>n</i> -butanolique	24,56±1,37	33,71±3,98	39,13±1,84	44,87±0,59	51,09±1,04	66,33±0,73	91,83±0,83
EDTA	9,69±1,32	20,59±0,50	51,15±0,31	95,80±0,06	95,87±0,06	95,84±0,22	95,76±0,06

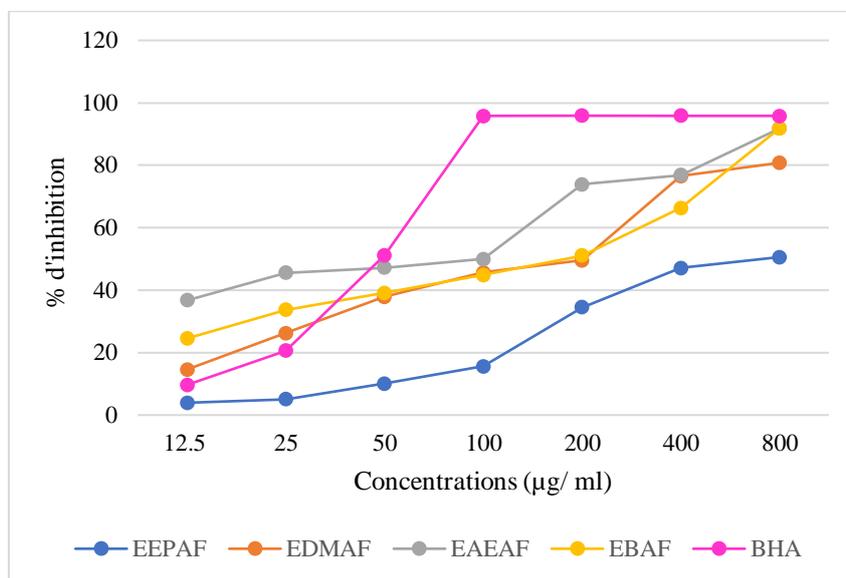


Figure 25. Activité antioxydante (Chélation des ions ferreux.) des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

Tableau 15. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test Chélation des ions ferreux.

Extraits	IC ₅₀ µg/mL
Ether de pétrole	711,70±13,57
Dichloromethane	165,61±3,14
Acétate d'éthyle	78,11±4,18
<i>n</i> -butanolique	176,52±8,54
EDTA	48,11±0,32

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

Les valeurs des IC₅₀ sont représentées dans le **tableau 15**. L'extrait Acétate d'éthyle a présenté la meilleure capacité chélatrice, avec une IC₅₀ égale à 078,11 µg/ml.

I.6. Réduction de fer

L'activité antioxydante des différentes extraits, obtenue avec le test de réduction de fer est présenté dans le **tableau 16** et la **figure 26**. Nos résultats montrent que l'extrait acétate a présenté le plus d'activité pour réduire le fer suivi par l'extrait *n*-butanolique.

Tableau 16. Activité antioxydante par le test réduction de fer.

Extraits	Absorbance a 700 nm						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg
Ether de pétrole	0,05±0,00	0,15±0,01	0,30±0,01	0,36±0,01	0,42±0,01	0,48±0,00	0,51±0,01
Dichloromethane	0,06±0,00	0,09±0,02	0,08±0,02	0,29±0,01	0,36±0,01	0,46±0,01	0,50±0,00
Acétate d'éthyle	0,31±0,01	0,47±0,06	0,70±0,01	1,47±0,06	2,26±0,05	3,72±0,17	3,46±0,31
<i>n</i> -butanolique	0,21±0,06	0,28±0,06	0,40±0,06	0,58±0,01	0,97±0,01	1,77±0,08	2,82±0,06
BHA	0,37±0,01	0,64±0,01	1,09±0,01	1,90±0,08	3,21±0,04	3,84±0,03	4,01±0,09
Quercetin	0,58±0,04	0,93±0,04	1,50±0,03	2,26±0,04	3,20±0,27	3,84±0,09	3,84±0,33

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

Tableau 17. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test réduction de fer.

Extrait	A _{0.50} (µg/mL)
Ether de pétrole	165,28±5,42
Dichloromethane	197,06±1,34
Acétate d'éthyle	7,49±0,54
<i>n</i> -butanolique	19,24±2,27
BHA	9,29±0,22
Quercetine	4,31±0,64

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

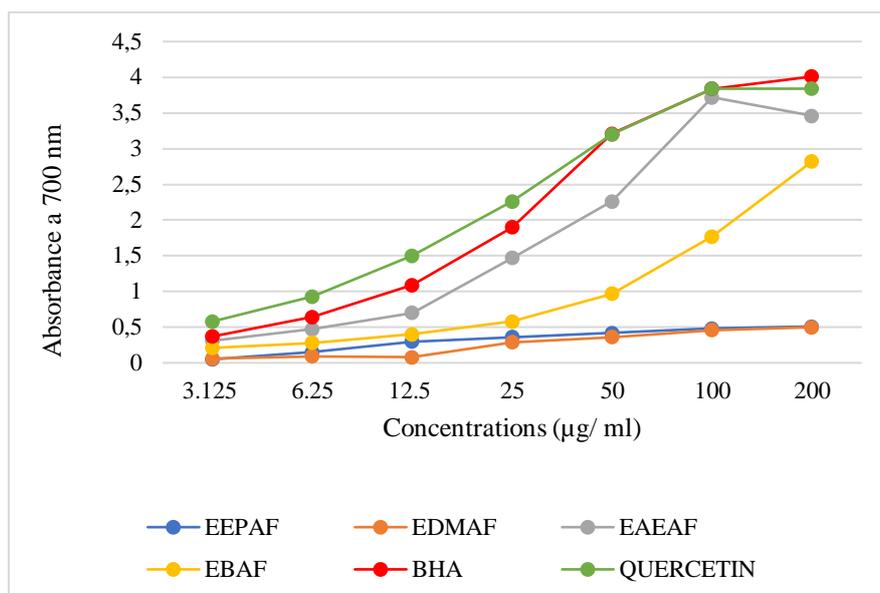


Figure 26. Pouvoir réducteur des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur IC_{50} (tableau 15), les résultats obtenus, montrent que l'extrait acétate d'éthyle possèdent une activité antioxydante relativement intéressante. Nous pouvons classer la réduction de nos extraits comme suit : acétate d'éthyle (7,49 µg/ml), *n*-butanolique (19,24 µg/ml), éther de pétrole (165,28), dichlorométhane (197,06).

I.7. Discussion

L'utilisation des anti-oxydants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. Dans ce travail, le pouvoir anti-oxydant des extraits d'*Atractylis flava* Desf a été évaluée in vitro. Les résultats obtenus montrent que les extraits testés ayant une importante capacité à scavenger les radicaux libres DPPH, ABTS et une forte activité à inhiber l'oxydation du β -carotène.

Vu la richesse des extraits d'*Atractylis flava* Desf en polyphénols et flavonoïdes, Cependant, la présence des flavonoïdes pourrait efficacement capter le radical libre DPPH, ABTS et piéger les radicaux de l'acide linoléique donc prévenir le blanchissement du β -carotène (Naidu et al., 2011). Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes sont connus par leurs capacité de piéger les radicaux libres et, par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Montoro et al., 2005 ; Teixeira et al., 2005 ; Barreca et al., 2011 ; Wang et al., 2013). Il a été signalé que

ces composés servent de bons donneurs d'électrons et d'hydrogènes qui sont dérivées principalement de leur cycle B (Le et al., 2007).

De plus, l'activité antioxydante a été évaluée par les techniques : CUPRAC, réduction de fer, chélation des ion ferreux, qui représentent des indicateurs significatifs du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que nos extraits contiennent des composés qui peuvent réduire le cuivre et le fer ferrique et qui entrent en compétition avec la ferrozine pour chélater le fer ferreux (Fe^{+2}). La mesure du pouvoir réducteur des composés purs ou sous forme d'extrait brut peut se faire par détection spectrophotométrique.

Les résultats de ce travail montrent que nos extraits possèdent un effet réducteur, qui pourrait être dû à sa richesse en composé polyphénoliques. En effet, la capacité de chélation est très importante car elle réduit la concentration des catalyseurs de peroxydation des métaux. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxy et alcoxy qui, à leur tour, peuvent maintenir la réaction en chaîne (Miguel 2009).

Globalement, les résultats de l'activité antioxydante des extraits évalués par ces différents tests indiquent que ces extraits possèdent des propriétés antioxydantes importantes. Cette activité semble être attribuée aux composés phénoliques. La plante *Atractylis flava* Desf est caractérisée par l'existence de Vicenine 3, Schaftoside, Isorhamnétine 3-O-robinobioside, Ladaneine, Stigmastérol, quercétine Chrysin, Apigénine et l'acide oléanolique. (Chaabani et al., 2013) qui possèdent de fortes activités antioxydante et du piégeage des radicaux (DPPH, ABTS+) et une puissance de réduction (Jihed Boubaker et al., 2012 ; Audrius Pukalskas et al., 2012 ; Sultana et al., 2008 ; Fabiana et al., 2008 ; Nahid et Firouzeh 2008). Ces composés semblent donc être les principaux contributeurs à la capacité antioxydante de nos extraits.

Il semble important de souligner que, l'extrait acétate d'éthyle est le plus actif en comparant avec l'extrait butanolique qui est l'extrait le plus riche en polyphénols et flavonoïdes. Les travaux de chaabani et al (2016) ont montré que la fraction acétate d'éthyle de cette plante détient une bonne capacité à piéger le radical DPPH, chez *Atractylis flava* Desf, la quercétine, le stigmastérol, Chrysin, Apigénine et l'acide oléanolique sont les principaux composés isolés dans l'extrait acétate d'éthyle de cette plante (Chaabani et al., 2016). Ces constituants sont dotés d'avoir une forte activité antioxydante. En effet, le comportement antioxydant est simplement celui attendu du contenu des composants les plus efficaces. Par ailleurs, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et de la nature des

antioxydants (Falleh et al., 2008). On peut dire donc que la performance globale en tant qu'antioxydant est le résultat de l'interaction d'un seul composant ou un complexe entre les composants, on peut s'attendre à un comportement synergique ou antagoniste.

II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro

Le test d'inhibition de la dénaturation des protéines est un test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro, La dénaturation d'une protéine provoque l'induction de la réaction inflammatoire par la production des auto-antigènes, facteurs importants pour développer une inflammation chronique. Ce test a pour but de mesurer le pouvoir inhibiteur de la dénaturation de protéine par les extraits d'*Atractylis flava* en utilisant l'albumine bovin (BSA). Les résultats sont résumés dans la figure 27 et le tableau 18 suivant :

Tableau 18. Activité antiinflammatoire des extraits d'*Atractylis flava* Desf.

EXTRAIT	% Inhibition			
	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg
Ether de pétrole	9,35±0,30	13,06±0,61	18,99±0,99	30,84±0,98
Dichloromethane	9,42±0,49	17,92±1,05	34,92±0,55	38,85±0,64
Acétate d'éthyle	32,15±0,65	41,07±0,36	60,03±0,17	72,85±0,99
<i>n</i> -butanolique	33,50±0,95	44,77±0,37	58,35±0,47	66,90±0,13
Diclofénac	41,73±0,36	68,19±0,73	86,35±0,40	92,45±0,79

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

Tous les extraits d'*Atractylis flava* Desf présentent une dénaturation de BSA. L'effet le plus important est observé pour l'extrait *n*-butanolique et l'extrait acétate d'éthyle avec un pourcentage d'inhibition EAEAF = 72,85 % et EBAF = 66,99% à 1000 µg. Concernant les autres extraits, dichlorométhane et l'éther de pétrole le pourcentage d'inhibition est de 38,85 %, 30,84 % respectivement. L'effet de Diclofénac de sodium contre la dénaturation est avec un pourcentage de 92,45% à une concentration de 1000 µg/ml.

La dénaturation des protéines est une cause bien déterminée de l'inflammation. Dans le cadre de la recherche des mécanismes de l'activité anti-inflammatoire, le pouvoir des extraits à inhiber la dénaturation des protéines a été étudiée. La dénaturation protéique est un phénomène durant lequel la protéine perd sa structure tridimensionnelle, suite à son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique (acide ou base forte) (Lanneau, 2010), induisant l'exposition de certains sites qui vont devenir des auto-antigènes (Jacquier-arlin et Polla, 1994).

La dénaturation protéique, in vivo, peut être la cause de l'apparition d'auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques. Les agents possédant des propriétés protectives contre la dénaturation protéique, seraient de bons candidats pour le développement de nouvelles molécules anti-inflammatoires (Chandra et al., 2012).

Les extraits testés présentent une efficacité inhibitrice de la dénaturation thermique. L'activité anti dénaturante des protéines par les extraits d'*Atractylis flava Desf* pourrait être due à l'interaction de certains polyphénols avec deux sites (présents au niveau de certaines protéines exp : albumine) de liaisons riches en Tyrosine, Thréonine et Lysine (Williams et al., 2002 in Duganath et al., 2010). En effet selon l'étude effectuée par Dufour et Dangles (2004) sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine, cette dernière possède une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

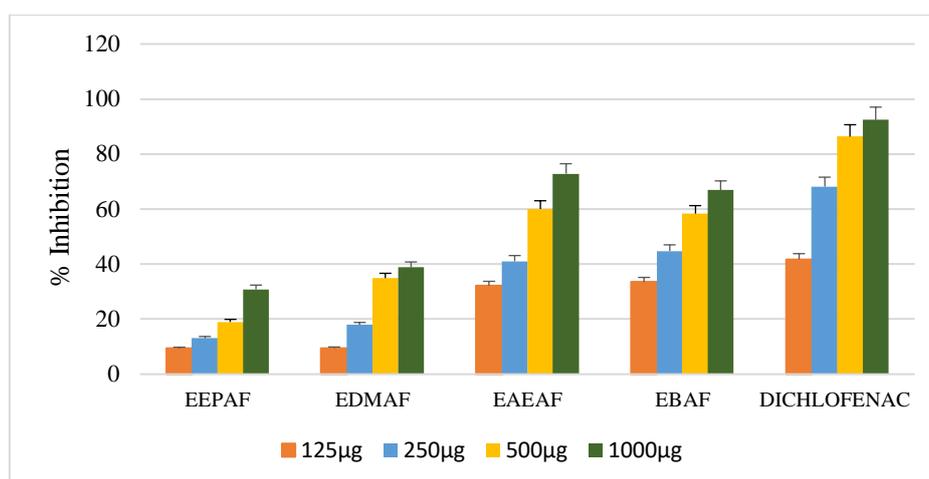


Figure 27. Effet des extraits d'*Atractylis flava Desf* sur la dénaturation de BSA.

III. Evaluation de l'activité antidiabétique in vitro

III. Effet d'EBAF sur l'inhibition de Alpha-amylase et l'Alpha-glucosidase

La capacité des extrait *n*-butanolique pour inhiber l'activité α -amylase et α -glucosidase in vitro a été étudiée et les résultats sont illustrés sur la figure 28 et 29. Les résultats ont montré que l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava Desf* inhibent l'enzymes α -amylase et α -glucosidase de façon dose-dépendante (62,5 à 1000 μ g/ml). L'extrait *n*-butanolique provoque une inhibition des deux enzymes étudiées, à 1000 μ g/ml le pourcentage d'inhibition atteint 89.37 % pour α -glucosidase et de 76.17 % pour α -amylase. L'effet inhibiteur de l'acarbose contre α -amylase

et α -glucosidase est avec des pourcentages de 97,88 %, 93,21 respectivement à une concentration de 1 000 μ g.

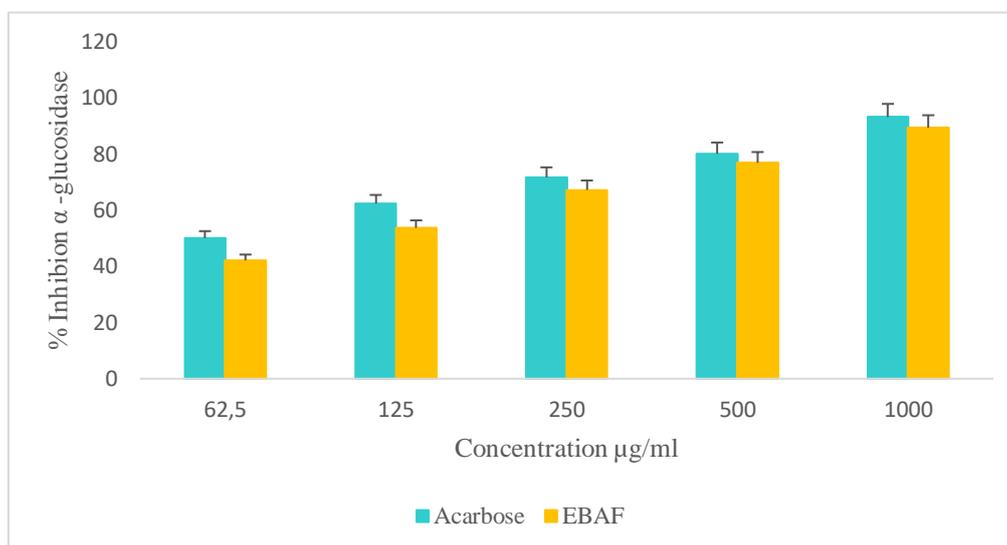


Figure 28. Inhibition de l' α -glucosidase par l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf.

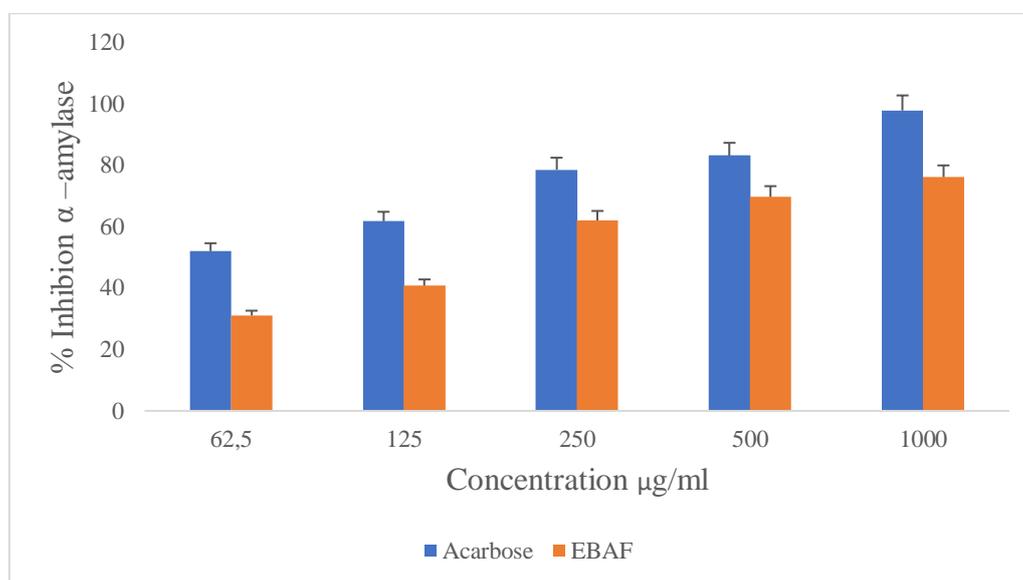


Figure 29. Inhibition de l' α -amylase par L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf.

L'inhibition de l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase, enzymes impliquées dans la digestion des hydrates de carbone, peut réduire de façon significative l'augmentation postprandiale de la glycémie et peut donc être une stratégie importante dans la gestion de la glycémie chez les diabétiques de type 2. Le traitement par drogues synthétiques comme l'acarbose ne se limitent

qu'à un faible contrôle de l'exacerbation, et en plus ont divers effets secondaires. Cependant, l'utilisation des extraits végétaux comme des inhibiteurs l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase pourraient aborder l'inconvénient des effets secondaires tels que la distension abdominale, la flatulence, météorisme et, éventuellement, de la diarrhée (Tundis et al., 2010 ; Lebovitz, 1997).

L'étude phytochimique présentée par chaabani et al en (2016). Montre que l'extrait butanolique d'*Atractylis flava* Desf est riche en métabolites : saponosides, flavonoïdes, terpenoïdes, et phytostérols par la présence de tilloroside et la vicenine 3. Ces résultats montrent que l'extrait butanolique un pouvoir remarquable pour inhiber l'activité d' α -amylase.

Ces résultats suggèrent que les composants de l'extrait butanolique représentés par la présence de tilloroside et la vicenine 3 connu par leur effet inhibiteur de la digestion du carbohydrate (islam et al., 2014 ; Goto et al., 2012) pourraient être les principaux constituants antidiabétiques.

IV. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia salina

Pour évaluer l'activité cytotoxique contre l'Artémia de la plante *Atractylis flava* Desf, les extraits ont été testés avec les concentrations suivante :10,20,40,80 $\mu\text{g/ml}$. Le tableau suivant regroupe les résultats obtenus. Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition de 24 heures aux extraits testés.

Tableau 19. Résultats de l'activité cytotoxique des larves d'artémia.

Extraits	% de mortalité					
	10 μg	20 μg	40 μg	80 μg	DL ₅₀ $\mu\text{g/ml}$	Toxicité
Ether de pétrole	12.50±0.21	16.67±0.20	33.33±6.01	33.33±0.30	≥ 80 $\mu\text{g/ml}$	-
Dichloromethane	25±1.50	25±2.10	54.17±1.22	100±0.00	37.78±3.85	++
Acétate d'éthyle	50±0.00	50±5.12	70.83±3.32	100±0.00	20.00±0.00	++
n-butanolique	25±1.50	25±2.10	54.17±1.22	100±0.00	32.11±1.34	++
K ₂ cr ₂ o ₇	00±00	53.62±10.00	81.22±1.33	100±0.00	19.11±2.56	++

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm écart-type (n=3).

DL ₅₀	Toxicité
DL ₅₀ ≥ 80 $\mu\text{g/ml}$	-
80 $\mu\text{g/ml}$ > DL ₅₀ ≥ 40 $\mu\text{g/ml}$	+
40 $\mu\text{g/ml}$ > DL ₅₀ ≥ 10 $\mu\text{g/ml}$	++
DL ₅₀ <10 $\mu\text{g/ml}$	+++

Pour les extraits testées, la concentration de 80 µg/ml engendrant la mort de 100 % des larves. Il s'agit de l'extrait *n*-butanolique, l'extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait dichlorométhane. L'extrait éther de pétrole a engendré 33.33 % de taux de mortalité.

La dose, qui cause la mort de 50 % des larves d'essai correspond à la DL₅₀. Les résultats de la DL₅₀ montre que Les extraits testés sont toxiques dans l'ordre suivant : l'extrait à l'acétate d'éthyle (DL₅₀ = 20 µg/ml), l'extrait butanolique (DL₅₀ = 32,11 µg/ml), l'extrait dichlorométhane (DL₅₀ = 37,78 µg/ml), l'extrait éther de pétrole (DL₅₀ ≥ 80µg/ml), Ces valeurs indiquent que, les extraits : acétate d'éthyle , *n*-butanolique et dichlorométhane sont les plus toxiques, tandis que l'extrait éther de pétrole est faiblement toxique comparés au standard, le dichromate de potassium (DL₅₀ = 19.11 µg/ml) .

Les résultats obtenus avec cet essai sont quantitatifs et reproductibles. Dans la plupart des cas, ce test rapide, donne une corrélation raisonnable entre la cytotoxicité et la propriété antitumorale (McLAUGHLIN *et al* 1991).

Ce test est donc utilisé pour prédire les propriétés cytotoxiques d'extraits de plantes et aussi la présence possible des composés ayant une activité anticancéreuse (MOSHI *et al* 2009). A part l'activité anticancéreuse, le test de létalité BST indique une large gamme de propriétés pharmacologiques, entre autres, les activités antimicrobiennes, pesticides et cytotoxique (McLAUGHLIN *et al* 1988).

Les métabolites secondaires tel que les saponines, les stéroïdes, les glycosides, les triterpènes parfois même des flavonoïdes présentent des effets cytotoxique (Ozçelik *et al.*, 2011). Le screening phytochimique des extraits de notre espèce a révélé la présence des flavonoïdes, des saponosides, Stéroïdes et Terpènes. Ces résultats suggèrent que les composants de nos extraits pourraient être les principaux constituants de l'effet cytotoxique.

VI. Evaluation de l'activité anticancereuse

VI.1. Test de cytotoxicité

Dans un premier temps, l'effet de l'EBAF a été évaluée sur la croissance des cellules THP-1. La cytotoxicité est évaluée pendant 24 heures et les extraits ont été testés à des concentrations allant de 25 µg/ml à 800 µg/ml.

VI.2. Test de cytotoxicité au WST-1

Le test WST-1 révèle un effet dose-dépendant ; la viabilité des cellules THP-1 chute considérablement lorsque celles-ci sont exposées à des concentrations croissantes en extrait *n*-butanolique, notamment de 200 µg/ml à 800 µg/ml (près de 0 % de viabilité).

Nous pouvons en déduire que l'activité mitochondriale des THP-1 diminue de manière significative au contact d'EBAF et que la plante apparaît toxique pour les cellules (**Figure 30**).

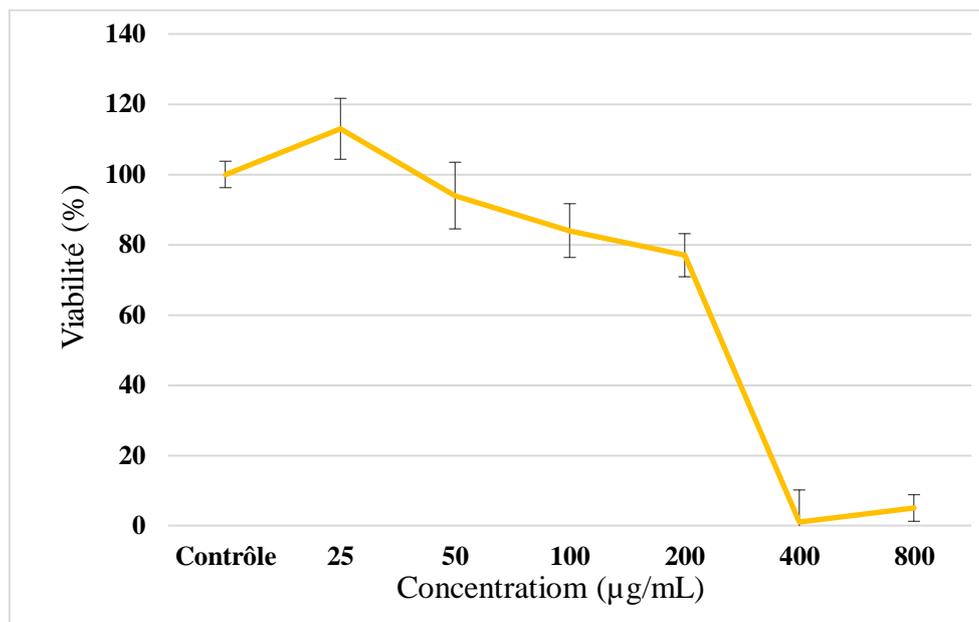


Figure 30. Activité mitochondriale des THP-1 exposés à L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf par test WST-1.

VI.3. Test de cytotoxicité au Alamar bleu

En observant le graphique ci-dessous, nous constatons que l'EBAF ne provoque pas de toxicité sur les cellules THP-1, ceci même à une concentration de 800 µg/ml. Nous observons une hausse de l'activité mitochondriale de près de 250 % lorsque les concentrations en extrait augmentent (**Figure 31**).

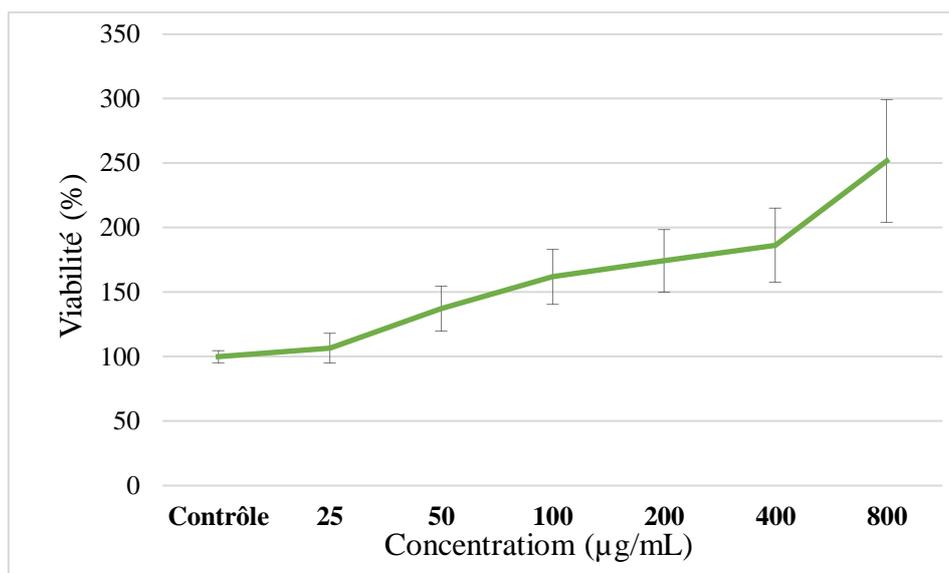


Figure 31. Activité mitochondriale des THP-1 exposées à L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf par le test Alamar bleu.

VI.4. Test de cytotoxicité au bleu trypan

Le test au bleu trypan illustre une baisse de la viabilité cellulaire. En effet, plus la concentration en EBAF augmente, plus la viabilité des THP-1 diminue, et passe de 100 % à 60 % lorsque la concentration atteint 800 µg/ml (**Figure 32**).

L'extrait *n*-butanolique présente donc un impact sur la viabilité des THP-1 ce qui confirmerait le test WST-1 réalisé précédemment.

Cependant, nous notons une discordance entre les résultats des trois tests réalisés. Pour une concentration d'extrait à 400 µg/ml, l'activité mitochondriale des cellules s'effondre d'après le test WST-1. Néanmoins, le test au bleu Trypan montre une viabilité cellulaire proche de 80%, tandis que les résultats du test Alamar bleu semblent présenter une augmentation croissante de l'activité mitochondriale. Cette divergence peut être liée à plusieurs facteurs ; **1** : les tests de cytotoxicité, WST-1, Alamar bleu et bleu Trypan évaluent différents « endpoints », respectivement l'activité enzymatique mitochondriale et l'intégrité membranaire ; **2** : les colorants utilisés peuvent interagir avec l'extrait **3** : l'affection de l'activité mitochondriale par l'extrait. Ceci justifie l'utilisation de plusieurs tests de viabilité pour évaluer la cytotoxicité in vitro.

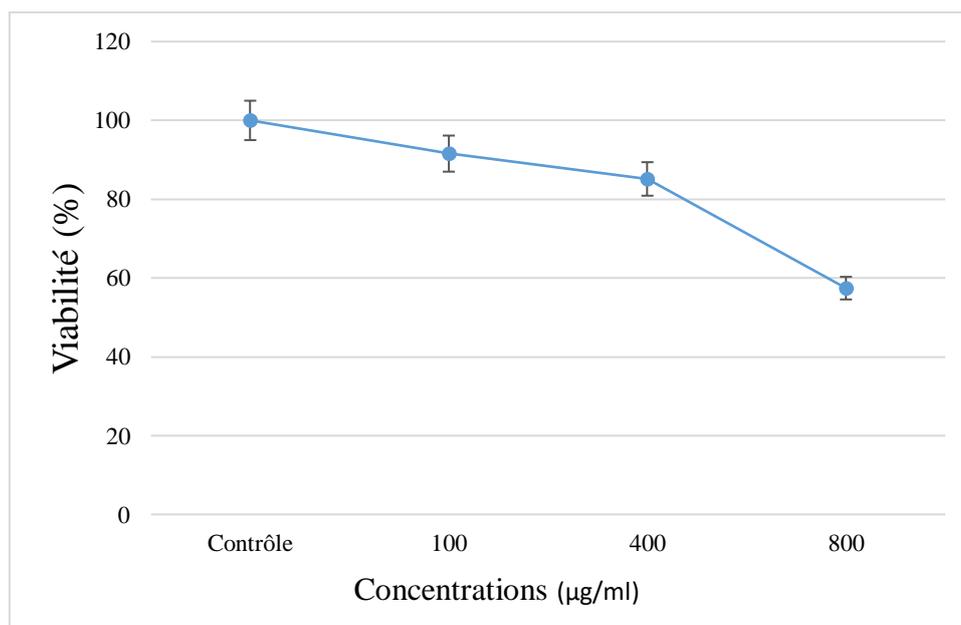


Figure 32. Activité cellulaire des THP-1 exposées à L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf par test au bleu trypan.

VI.5. Exploration des gènes

Pour déterminer le mécanisme d'action de l'EBAF sur les cellules tumorales, nous avons étudié le changement de l'expression génique entre les cellules traitées et non traitées en utilisant la méthode de RT-PCR.

Lorsque l'on passe d'une concentration en extrait de 25 à 100 µg/ml, nous observons une tendance à la sous-expression de tous les gènes d'intérêts, et ceci de manière significative (**Figure 33**). Notons que la sous-expression est plus importante pour les gènes BCL-2, SDHA, (jusqu'à 8 fois moins) ainsi que CASP 8, OPA1 et NCF1 (jusqu'à 4 fois moins). Les gènes pro-apoptotiques de la voie extrinsèque de l'apoptose, TNF- α et CASP 8, sont sous-exprimés ; ainsi que le gène anti apoptotique impliqué dans la voie intrinsèque, BCL-2. Ces éléments suggèrent que la voie intrinsèque de l'apoptose serait impliquée.

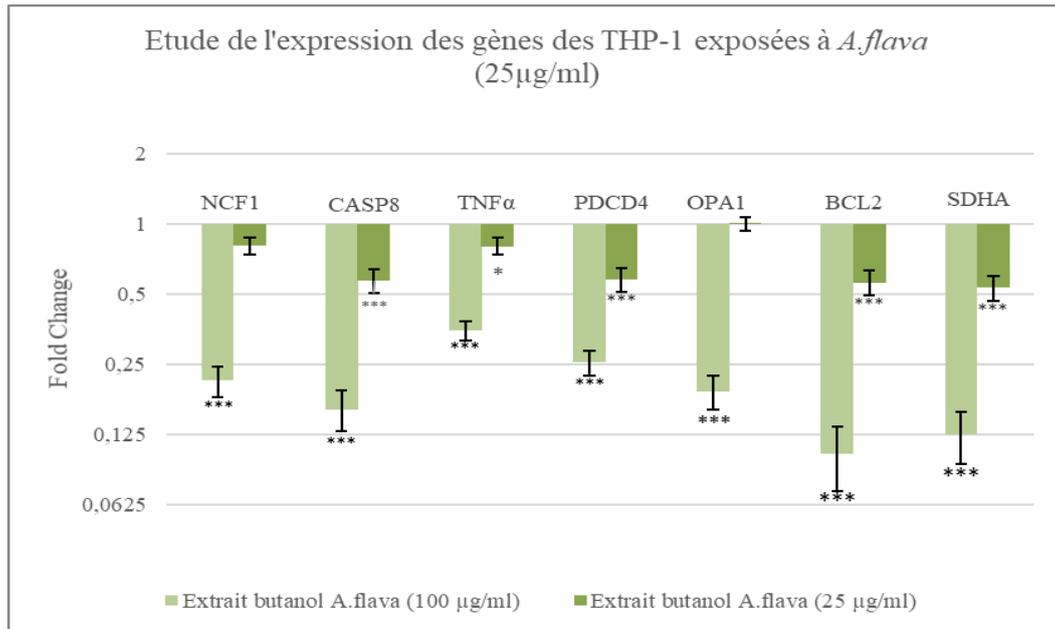


Figure 33. Etude de l'expression des gènes des THP-1 exposées à L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf (100,25 µg/ml).

L'étude de l'activité mitochondriale des THP-1 au contact de l'extrait butanolique a révélé une chute de celle-ci à partir d'une concentration de 200 µg/ml. La sous-expression des gènes OPA1 et SDHA en serait à l'origine puisque ces observations traduisent des altérations morphologiques des mitochondries ainsi qu'une dérégulation au niveau de la chaîne respiratoire.

Parmi les gènes responsables des fonctions mitochondriales, le gène OPA1 qui joue un rôle majeur dans le maintien de la morphologie et de la dynamique du réseau mitochondrial et dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (Chen et al., 2003). Après l'oxydation du succinate par fumarate, qui se produit dans la sous-unité SDHA, les électrons sont transportés via les sites Fe/S dans la sous-unité SDHB vers les sites de liaison Q coenzyme formés par les protéines SDHB/C/D, conduisant à la réduction du flux d'ubiquinone et d'électrons vers le complexe respiratoire III (Cecchini et al., 2003). Toute interférence dans cette chaîne de réactions redox entraîne une fuite d'électrons et la formation de superoxyde suite à l'interaction avec l'oxygène moléculaire. En effet, plusieurs molécules qui ciblent le site de liaison de l'ubiquinone du SDH provoquant la génération de superoxyde qui provoque l'apoptose des cellules cancéreuses ces molécules sont actuellement à l'étude comme des agents chimio thérapeutiques (Kluckova et al., 2013). Inversement, l'altération en amont de l'oxydation du succinate par la sous-unité SDHA peut annuler tout flux d'électrons vers d'autres

composants SDH, inhibant ainsi la génération de ROS. La sous régulation d'OPA 1, qui bloque la fusion des mitochondries, réduit la respiration mitochondriale et induit la diminution du potentiel mitochondrial transmembranaire. Ce gène joue aussi un rôle majeur dans le maintien de la morphologie du réseau et la dynamique mitochondriale, puisque sa sous-expression favorise la fragmentation du réseau mitochondrial, ainsi que dans la régulation des voies de mort cellulaire via l'autophagie. En effet, la sous-régulation d'OPA1 favorise l'agrégation du réseau mitochondrial dans les cellules ganglionnaires rétiniennes et la modification de la structure de la membrane mitochondriale interne avec une désorganisation des crêtes et la libération du cytochrome C, ce qui induit l'apoptose intrinsèque ou mitochondriale. De même, la régulation d'opa1 affecte la fusion des mitochondries contrôlant leur élimination par autophagie (Liesa, M et al., 2009).

L'EBAF, possède un effet anti-cancéreux par modulation de l'expression des gènes apoptotiques contre la lignée cellulaire THP-1 Ceci peut être dû à la présence des flavonoïdes. La modulation de l'expression des gènes par les flavonoïdes peut alors s'expliquer par l'activation ou l'inhibition des facteurs de transcriptions sensibles au statut redox de la cellule, comme NFκB ou AP-1 (Leonarduzzi et al., 2010). Certains flavonoïdes ont également la capacité de se lier directement sur des protéines cibles, notamment sur différents récepteurs à tyrosine kinase, les MAPK (Teillet et al., 2008), PI3K (Walker et al., 2000), mais aussi la protéine kinase C (PKC) (Conboy et al., 2009). Les flavonoïdes seraient capables de se lier sur les poches de fixation de l'ATP situées sur différentes kinases (Teillet et al., 2008). D'autre part, l'inhibition de la PKC par certains polyphénols, notamment la curcumine, pourrait être due à la compétition de ce composé avec les ions Ca²⁺ pour la fixation sur la sous-unité régulatrice de cette protéine (Mahmoud, 2007). La quercétine, quant à elle, est capable d'inhiber la PI3K par fixation directe (Hwang et al., 2009), tout comme la lipoxigénase LOX-3 (Fiorucci et al., 2008). L'inhibition de ces deux protéines est connue pour favoriser la régression tumorale et participe sans doute à l'effet antitumoral des flavonoïdes.

L'étude de l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf révèle également une toxicité sur les cellules THP-1. Effectivement, nous observons une dégradation de l'activité mitochondriale. Ceci n'est autre que la conséquence d'altérations conformationnelles des mitochondries accompagnées d'un dysfonctionnement du cycle de Krebs. En ce qui concerne le gène TNF-α, codant pour une cytokine pro-inflammatoire, étant sous-exprimé, cela pourrait indiquer une réduction des processus inflammatoires.

VI.6. Détermination de l'activité de Caspase-3

L'activation de Caspase-3 est un élément crucial dans la cascade de signalisation apoptotique. Pour comprendre comment l'EBAF peut être toxique pour les THP-1, nous avons examiné l'activité de la caspase-3 des cellules traitées par l'E en utilisant un substrat spécifique de la caspase-3, le DEVD-PNA, qui est clivé pour produire un produit fluorescent. Nos résultats ont montré que l'activité de la caspase-3 dans les cellules traitées avec l'EBAF était significativement élevée, ce qui correspond à l'effet observé de ces extraits sur la viabilité cellulaire (**Figure 33**). Ceci montre clairement que l'activité cytotoxique d'*Atractylis flava* Desf peut être attribuée à l'induction de l'apoptose par activation caspase-3. L'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales est considérée comme un moyen précieux de traiter le cancer. (**Dixon et al ,1997**). On sait qu'une grande variété de substances naturelles induisent l'apoptose dans diverses cellules tumorales. Il est donc important de filtrer les inducteurs apoptotiques des plantes, soit sous forme d'extraits bruts, soit sous forme de composants isolé (**Taraphdar et al., 2001**).

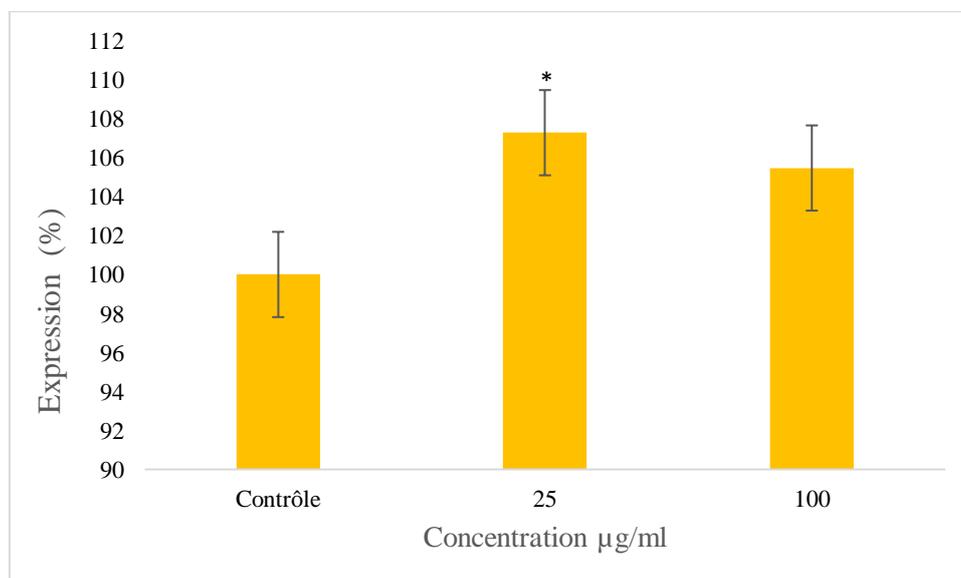


Figure 34. Mesure de l'activité de la protéine caspase-3 des THP-1 exposées à L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf.

I. Etude toxicologique

I. Toxicité aiguë de L'EBAF

I.1.Effets de l'EBAF sur l'aspect général

Selon les observations effectuées sur les animaux en essai aiguë. Les rates n'ont montré aucun changement dans l'apparence physique générale et dans la somatomotricité durant la période d'observation. Aucune manifestation de convulsions, salivation, diarrhée, coma, ou de comportements anormaux n'a été observée. Aucune autre modification liée au traitement, ni aucune mortalité, n'a été observée chez les animaux sur la période de 14 jours suivant l'administration oral d'une dose unique d'extrait à la dose 2000 mg/kg.

I.2.Effets de l'EBAF sur les paramètres hématologiques

Le **tableau 20** présente l'effet de l'extrait *n*-butanolique sur les paramètres hématologiques.

Tableau 20. Valeurs des paramètres hématologiques des rats témoins et des rats traités ; mesurés pendant l'étude de la toxicité aiguë.

Paramètres hématologique	Contrôle	EBAF 2000 mg/kg p.c
<i>GR</i> ($10^6 \times \mu\text{L}$)	7.35±0.14	7.13±0.06
<i>MCV</i> (fL)	55.68±0.85	57.06±0.67
<i>RDW</i> (fL)	13.18±0.26	13.22±0.25
<i>HCT</i> (%)	40.92±0.48	40.74±0.42
<i>PLT</i> ($10^3/\mu\text{L}$)	614.8±61.76	645.4±50.75
<i>MPV</i> (fL)	6.18±0.09	6.32±0.13
<i>GB</i> ($10^3/\mu\text{L}$)	6.10±0.69	6.92±1.10
<i>HGB</i> (g/dL)	14.5±0.17	14.34±0.11
<i>MCH</i> (pg)	19.74±0.25	20.08±0.22
<i>MCHC</i> (g/dL)	35.46±0.17	35.22±0.13
<i>Lymphocyte n°</i>	4.24±0.51	4.82±0.93
<i>Lymphocyte %</i>	69.08±2.43	68.76±2.73

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au témoin.

Les affections du système hématopoïétique est un bon indicateur de toxicité d'une substance, comme l'est la diminution du poids corporel (**Adeneye et al., 2006**). Chez les rates traitées par une dose unique de 2000 mg/kg, aucune différence significative n'a été notée entre les taux moyens des différents paramètres hématologiques évalués chez les animaux des groupes traités et leurs valeurs dans les groupes témoins.

I.3.Effets de l'EBAF sur les paramètres biochimiques

L'effet de l'extrait *n*-butanolique sur les paramètres biochimiques est présenté dans le **tableau 21**.

Tableau 21. Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et des rats traités ; mesurés pendant l'étude de la toxicité aiguë.

Paramètres biochimiques	Contrôle	EBAF 2000 mg/kg p.c
Profil hépatique		
ASAT(U/L)	131 ± 5.54	122.8 ± 3.36
ALAT(U/L)	86.2 ± 7.13	78.4 ± 9.66
Bilirubine Totale (mg/dL)	0.76 ± 0.04	0.70 ± 0.07
Profil rénal		
Urée (mg/L)	0.30 ± 0.01	030 ± 0.01
Créatinine (mg/L)	4 ± 0.01	3 ± 0.0
Profil lipidique		
Cholestérol (mmol/L)	0.57 ± 0.04	0.63 ± 0.05
Triglycérides (mmol/L)	0.83 ± 0.10	1.14 ± 0.15
HDL-Cholestérol (mmol/L)	0.50 ± 0.03	0.54 ± 0.06
LDL-Cholestérol (mmol/L)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Glucose (g/L)	0.67 ± 0.03	0.68 ± 0.05

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au témoin.

Aucune différence significative n'a été signalée entre les taux moyens des différents paramètres biochimiques évalués chez les animaux des groupes traités et leurs valeurs dans les groupes témoins.

Durant cette étude nous avons examiné quelques paramètres biochimiques pour observer l'effet toxique de l'extrait *n*-butanolique sur la fonction rénal et hépatique. L'urée et la créatinine sériques sont considérées comme les principaux marqueurs de la néphrotoxicité, bien que l'urée sérique soit souvent considérée comme un prédicteur de la fonction rénale plus fiable que la créatinine sérique (**Palani et al., 2009**). En effet, Les transaminases sont présentes dans le foie, mais aussi dans le muscle et dans le rein, le pancréas, et d'autres tissus. Elles sont synthétisées au niveau du cytoplasme des cellules de ces organes et déchargées dans la circulation, lorsque ces cellules sont endommagées de plus le foie est le siège essentiel de la synthèse du cholestérol sanguin. Toute atteinte de la fonction hépatique pourrait donc inhiber cette synthèse et par la suite réduire les taux de cholestérol sanguin (**Peirs, 2005**).

I.4.Autopsie générale

L'autopsie des animaux d'essai n'a révélé aucune anomalie liée au traitement.

I.5. Effets de l'EBAF sur le poids relatif des organes

Le tableau 22 présente l'effet de l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf sur le poids relatif (%) de foie et des reins. Aucune différence significative n'a été observée chez les rates traitées comparés groupe témoins à la dose 2000 mg/kg.

Tableau 22. Effets de l'extrait butanolique sur le poids relatif de quelques organes (% du poids corporel)

Poids relatif des organes	Contrôle	EBAF 2000 mg/kg p.c
FOIE	3,89±0,35	4,02±0,24 ns
REIN	0,32±0,03	0,29±0,01 ns

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au témoin.

L'administration d'une dose de 2000 mg/kg d'EBAF par voie orale ne présente pas de toxicité. Aucun signe de toxicité du point de vue comportemental n'a été observé. En effet, aucun changement au niveau du poids relatif des organes, des paramètres hématologiques et biochimiques.

D'après les résultats de cet essai Une DL₅₀ orale estimée supérieure à 2000 mg/kg a été obtenue, cette valeur a permis de classer la toxicité de cet extrait dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé des substances chimiques, catégorie caractérisant les substances faiblement toxiques (OECD, 2001).

I.6. Résultats de l'étude histopathologique

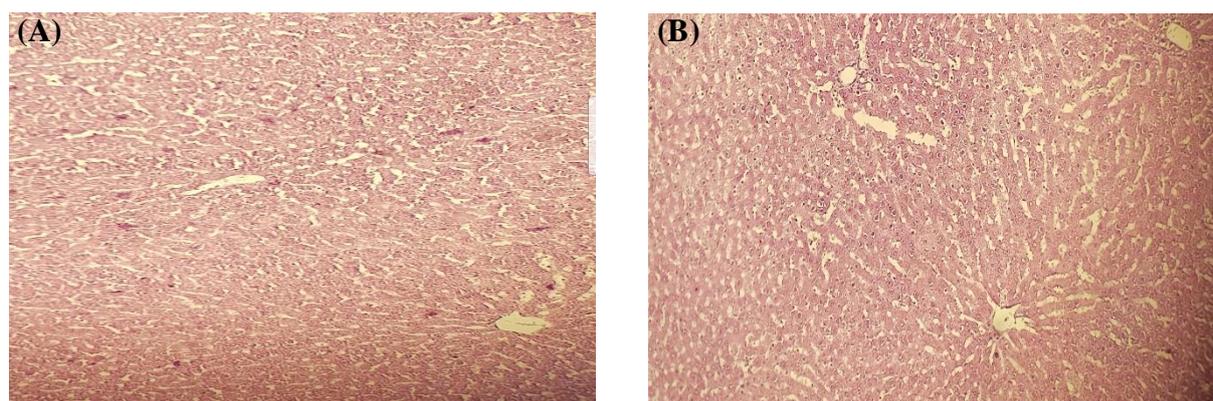


Figure 35 : Coupe histologique du tissu hépatique des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X10).

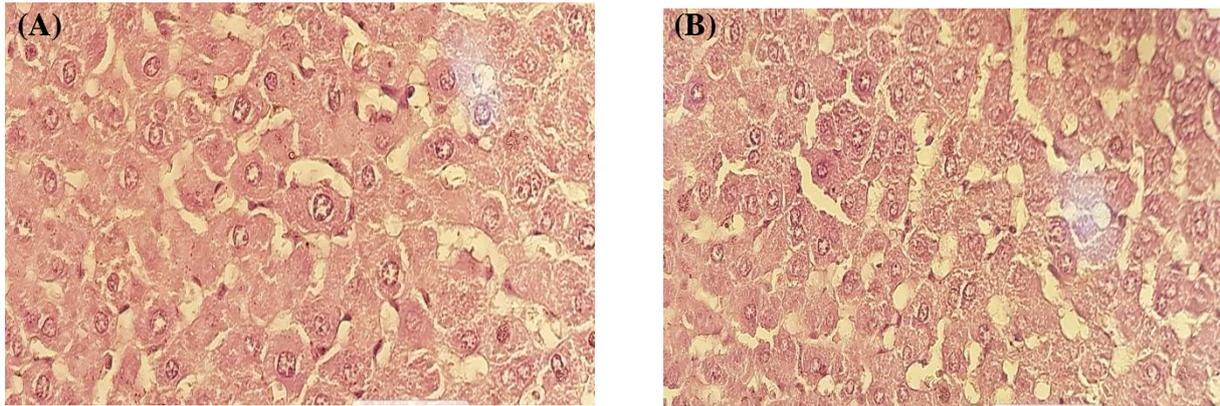


Figure 36 : Coupe histologique du tissu hépatique des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X 40).

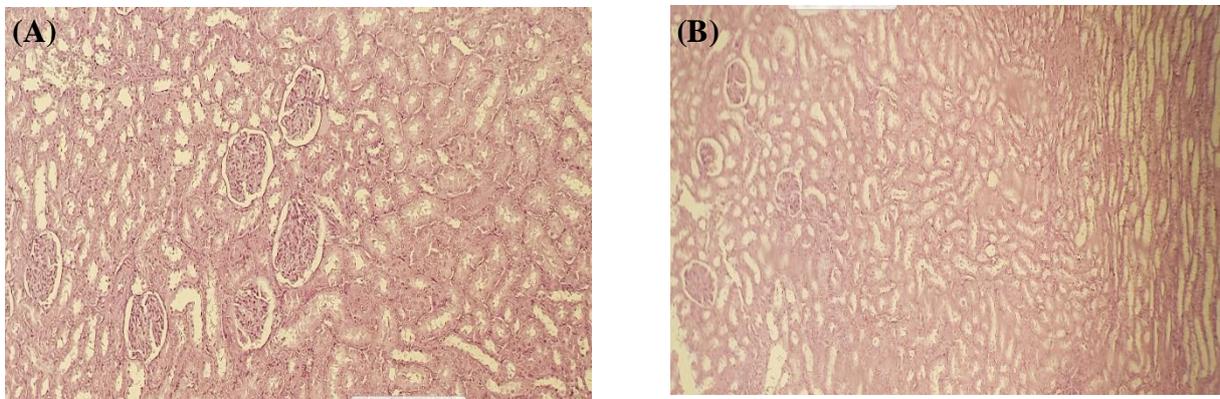


Figure 37 : Coupe histologique du tissu rénal des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X10).

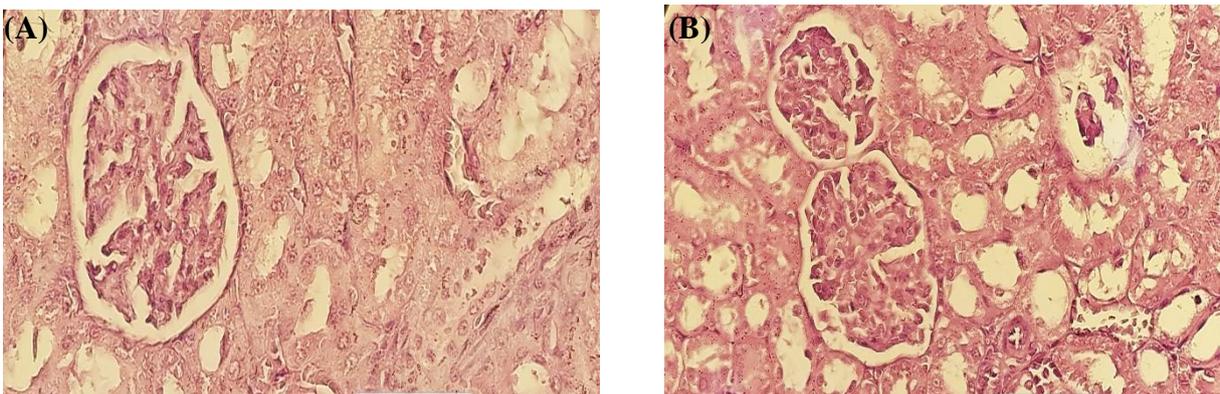


Figure 38 : Coupe histologique du tissu rénal des rats (A) : témoins et des rats traités (B) : avec la dose (2000 mg/kg) d'EBAF Coloration éosine hématoxyline/Grossissement (X10).

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans les figures (35, 36, 37, 38). D'après ces résultats, on a remarqué une absence des traces majeures de la toxicité, les organes étudiés ne présentent aucun changement structural au niveau des tissus hépatiques ou rénales dans les conditions appliquées. L'étude de la toxicité aigüe effectuée nous a fourni des preuves

que l'EBAF ne présente aucun signe de la toxicité sur le foie et les reins avec les doses 2000 mg/kg.

II. Évaluation de l'activité diurétique

Les détails de l'activité diurétique. Sont présentés dans le **tableau 23**. D'après les résultats, il apparaît que EBAF a montré une activité diurétique à toutes les doses testées (100,250,500 mg/kg), avec un effet dose dépendant.

Le volume total d'urine sur la période de 5 h est mesuré pour l'EBAF, le standard (furosémide) et témoin normal. Le furosémide et l'EBAF ont augmenté le débit urinaire de façon significative à 5 h par rapport au rats témoins.

Concernant la réponse diurétique et la puissance d'excrétion électrolytique de l'EBAF ont été très modérées par rapport aux rats témoins normaux, à l'exception de la dose (100 mg/kg). L'EBAF à des doses de 250 et 500 mg/kg a montré une augmentation significative de l'excrétion de Na⁺, de K⁺ et de Cl⁻. Les résultats de l'excrétion d'électrolytes urinaires après le traitement par l'EBAF étaient comparables à ceux du furosémide (tableau 2).

L'excrétion urinaire volumétrique a été de 86% ; 113,33% ; 129 % - 152,33% et 164,66 % respectivement pour le contrôle normal, les doses de 100,250,500 mg/kg, et le furosémide (**tableau 24**).

Tableau 23. Activité diurétique (concentration en électrolytes et Volume urinaire) de l'extrait n-butanolique d'*Atractylis flava* Desf.

Groupes	Volume urinaire	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Contrôle	12,90±0,40	103,4±1,05	43,70±1,00	70,21±0,33
Furosémide	24,70±0,60***	163,3±5,95***	76,95±1,35***	114,3±2,25***
100 mg	17,00±0,50 *	118,9±1,62 ns	49,55±1,25 ns	77,00±1,35 ns
250 mg	19,35±0,45**	141,7±1,94**	63,15±1,85***	94,9±0,30***
500 mg	22,85±0,35***	153,1±2,36***	74,87±0,56***	105,5±3,23***

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au témoin.

Tableau 24. Effet de l'extrait n-butanolique d'*Atractylis flava Desf* sur l'excrétion urinaire et l'activité diurétique.

Groupes	EUV	
Contrôle	86	Pas d'activité diurétique.
Furosémide	164,66	Importante activité.
100 mg	113,33	Faible activité diurétique.
250 mg	129	Faible activité diurétique.
500 mg	152,33	Importante activité.

L'EBAF a été testé pour leur activité diurétique. De la présente étude, nous pouvons conclure que l'EBAF a montré une action diurétique. Cependant, les phytoconstituants responsables de cette activité doivent faire l'objet d'une enquête. Basé sur l'excrétion de l'eau, Na⁺ et K⁺, Cl⁻ il apparaît que le principe actif présent dans cet extrait ayant une activité de type Furosémide, les extraits de la plante pourraient avoir une action similaire à celle des diurétiques de l'anse puisqu'ils augmentent l'excrétion urinaire de potassium et de sodium comme le furosémide. On sait que les diurétiques de l'anse comme le Furosémide augmentent le débit urinaire et l'excrétion d'électrolytes comme le sodium, le potassium et le chlorure, ce qui mène à la suggestion que les extraits de plantes agissent comme un diurétique de l'anse (**Hoda E et al 2018**). Certains flavonoïdes exercent leur activité diurétique en se liant au récepteur A1 de l'adénosine associé à l'action diurétique (**Yuliana ND et al 2009**). En effet, les saponoside par irritation de la muqueuse rénale vont favoriser la sécrétion rénale, augmentant ainsi le volume urinaire (**Jean Bruneton 2009**).

L'activité diurétique de la plante étudiée peut passer par n'importe lequel de ces mécanismes possibles puisqu'elle est riche en saponoside et flavonoïdes. Le site précis, la molécule et les mécanismes cellulaires de l'extrait restent à élucider. La présente étude appuie l'utilisation traditionnelle de la plante *Atractylis flava Desf* pour son activité diurétique.

III. Évaluation de l'activité antipyrétique

Les résultats présentés dans le **tableau 25** montrent que la fièvre a été induite après 18 h de l'injection de levure de bière à 20 % chez les rats. L'administration orale de l'EBAF (500 et 250 mg/kg) a inhibé de façon significative ($P < 0,01$) l'hyperthermie induite par la levure. L'effet antipyrétique du EBAF (500 mg/kg) s'est manifesté dès la première heure et est demeuré significatif jusqu'à la cinquième heure du post-traitement, tandis qu'à la dose de 250 mg/kg, l'effet antipyrétique est apparu après la troisième heure du traitement et est demeuré significatif jusqu'à la cinquième heure. Le pourcentage d'inhibition de la pyrexie de tous les groupes testés est illustré dans la **figure 39**.

Tableau 25. Effet antipyrétique de l'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf sur la fièvre induite par la levure de bière.

Traitement	Dose(mg/kg)	Température rectale						
		T0	18 h	19h	20h	21h	22h	23h
Normal saline	10(ml/kg)	36.56±0.23	38.88±0.18	38.74±0.17	38.56±0.17	38.32±0.12	38.50±0.14	38.56±0.15
	100	36.16±0.12	38.88±0.18	38.74±0.17	38.56±0.17	38.32±0.12	38.50±0.14	38.56±0.15
EBAF	250	36.32±0.37	39.36±0.04	39.04±0.05	38.82±0.05	38.1±0.04**	38.24±0.10***	38.38±0.12***
	500	36.08±0.21	38.82±0.11	38.24±0.09***	38.10±0.07*	37.22±0.09***	37.68±0.05***	37.94±0.06***
Paracétamol	150	35.96±0.23	38.58±0.15	37.36±0.14***	37.3±0.15***	37.15±0.09***	36.70±0.22***	36.44±0.22***

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ par rapport au témoin.

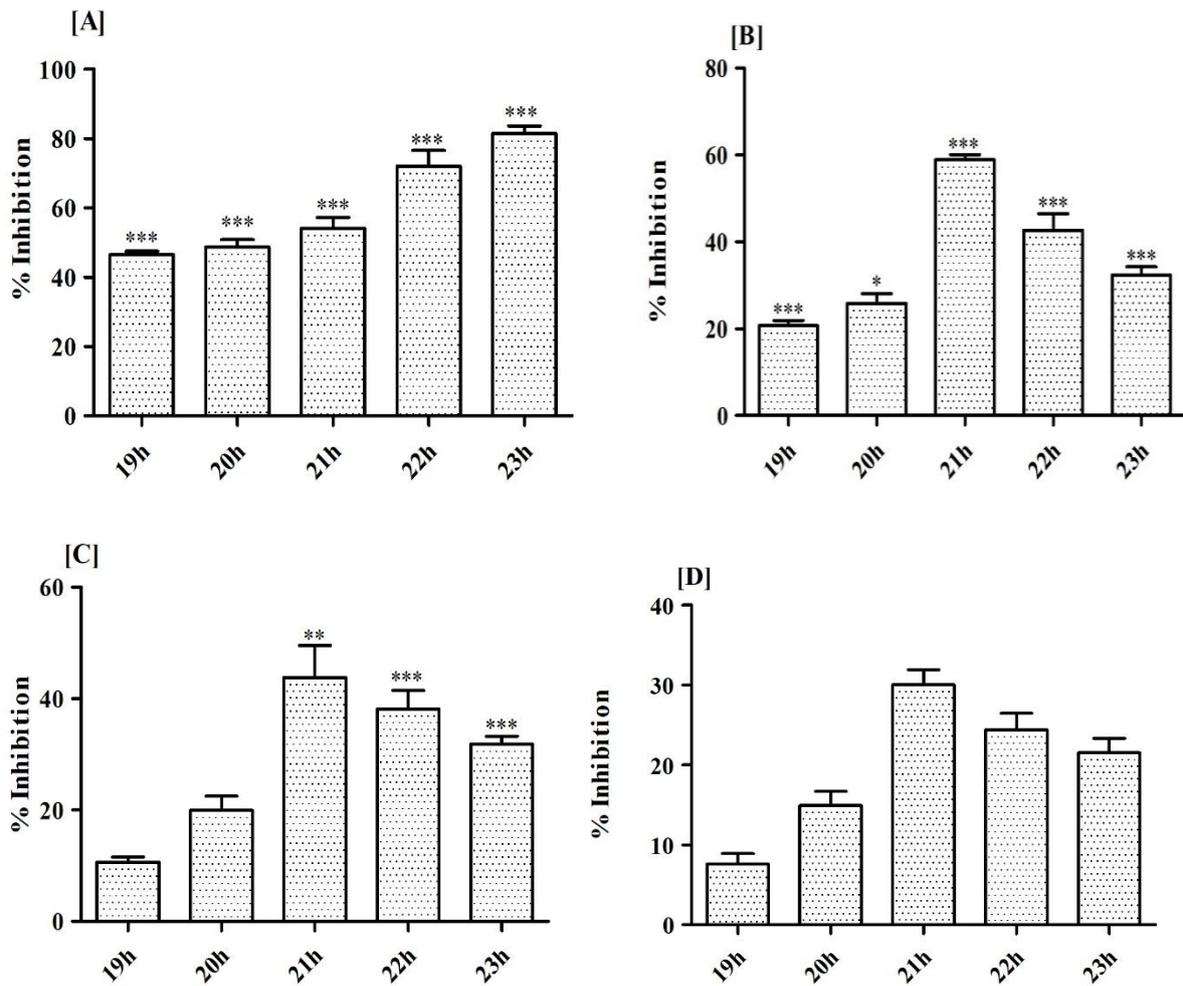


Figure 39. Pourcentage de l'effet antipyrétique de L'EBAF dans le test de la fièvre induite par la levure de bière ; [A]paracétamol,150mg/kg[B]. 500mg/kg et[C] 250[D] 250[D]. 100 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M (n=5). $P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$ par rapport au témoin.

La fièvre est un marqueur de nombreux troubles infectieux et inflammatoires. Sur un point de vue classique, la genèse de la fièvre est induite par des médiateurs inflammatoires (les cytokines, à savoir l'interleukine-1, l'interleukine-6, le facteur de nécrose tumorale et autres) qui sont principalement libérés par les phagocytes mononucléaires périphériques activés et d'autres cellules immunitaires (Zeisberger et al.,1999 ; Roth et al.,2006). L'activité antipyrétique est généralement considérée comme une caractéristique des médicaments ou les composés qui ont un effet inhibiteur sur la biosynthèse ou la libération de prostaglandines (Panthong et al.,2007).

L'injection sous-cutanée de levure de bière évoque la pyrexie en augmentant la synthèse de prostaglandine et est considérée comme un test de dépistage in vivo précieux pour l'évaluation du potentiel antipyrétique (Raouf et al 20014 ; Wan et al 2013 ; Muhammad et al.,2012). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines pourrait être le mécanisme possible de l'action antipyrétique comme celle du paracétamol et l'inhibition de la prostaglandine peut être obtenue en bloquant l'activité de l'enzyme cyclooxygénase (Srinivas et al 2011 ; Igbe et al., 2009 ; Moltz et al.,1993). L'effet antipyrétique du EBAF peut être dû à l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase et à la réduction du niveau de prostaglandine dans l'hypothalamus chez les rats.

IV. Évaluation de l'activité Anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'effet de l'EBAF sur l'inflammation aigue, le modèle de l'œdème de la patte induit par l'ovalbumine a été utilisé chez le rat. Après 5h les rats du groupe traité par 30 mg de diclofénac, on remarque une réduction très significative ($p < 0,001$) de l'épaisseur de la patte par rapport à celle des rats du groupe contrôle avec une inhibition de l'inflammation de 67.28 % (tableau 26). Le traitement des rats par 100,250,500 mg/kg d'EBAF induit une diminution très significative ($p < 0,001$) de l'inflammation par rapport aux groupes contrôle. Le pourcentage d'inhibition est de 38.12% ,52.67% ,57,54 %. Cette inhibition est très significative ($p < 0,001$) qui se rapproche à celle obtenue avec le diclofénac.

Tableau 26. Effet L'extrait *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf sur l'inflammation aigue sur la patte du rat.

Traitement	Dose (mg/kg)	Δ œdème (mm) et % d'inhibition				
		1h	2h	3h	4h	5h
Eau physiologique	10(ml/kg)	5.43±0.11	4.92±0.21	4.64±0.15	4.09±0.17	3.80±0.13
	100	5.19±0.11 (4.42%)	4.46±0.21 (9.50%)	3.83±0.16** (17.49%)	2.78±0.11*** (31.83%)	2.35±0.10*** (38.12%)
EBAF	250	5.02±0.09 (7.53%)	4.28±0.19 (13.07%)	3.66±0.15*** (21.11%)	2.57±0.10*** (36.96%)	1.79±0.06*** (52.67%)
	500	4.76±0.10** (12.40%)	3.89±0.17** (20.93%)	3.18±0.08*** (31.37%)	2.25±0.087*** (44.59%)	1.61±0.05*** (57.54%)
Diclofénac	30	4.85±0.07** (10.65%)	3.87±0.16** (21.43%)	2.71±0.08*** (41.59%)	1.94±0.07*** (52.31%)	1.24±0.03*** (67.28%)

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ par rapport au témoin.

L'œdème de la patte de rat induit par l'ovalbumine est l'un des tests primaires couramment utilisés pour évaluer l'effet anti-inflammatoire des produits naturels. La formation d'œdème résulte de l'action synergique de médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine

et la bradykinine produites sous l'effet de la cycloxygénase-2 (COX-2) au site inflammatoire entraînant une perméabilité vasculaire et une circulation sanguine accrues (**Begum et al.,2010 ; Kang et al., 2008**). La formation d'œdème due à l'ovalbumine dans la patte du rat est un événement biphasique ; la phase précoce de l'œdème, qui commence immédiatement après l'administration de l'irritant et dure jusqu'à 2 h, est probablement due à la libération d'histamine et de sérotonine. Alors que la deuxième phase, qui survient de 3 à 5 h après l'administration de l'irritant, est induite par la bradykinine, la protéase, les prostaglandines et les lysosomes (**Wallace et al.,2002**).

Les résultats de cette étude ont montré que le EBAF inhibait significativement la formation de l'œdème des pattes pendant la première phase et se maintenait significativement dans la seconde phase. On peut suggérer que cet effet anti-inflammatoire pourrait probablement être attribué à l'inhibition de la libération des médiateurs pro-inflammatoires de l'inflammation aiguë, en particulier les prostaglandines.

L'étude phytochimique de la plante entière *Atractylis flava* a montré une abondance de flavonoïdes triterpènes, de stéroïdes et de saponines. De plus, la présence d'un tiliroside, narcissine, vicénine 3, ladaneine et schaftoside ont été détectés dans l'extrait de n-butanol (**chaabani et al.,2016.2013**).

Les flavonoïdes ont démontré qu'ils sont capables d'inhiber une série d'enzymes, qui sont activées au cours du processus inflammatoire (**Kwon et al.,2005**). De plus, des flavonoïdes comme la vicénine 2, le tiliroside et le Schaftoside ont été reconnus comme de puissants inhibiteurs des médiateurs pro-inflammatoires dans différentes études (**Dos Santos et al 2010 ; Rao et al. Matsuda et al.,2002**). L'action anti-inflammatoire et antipyrétique du EBAF peut être due à la présence des phytoconstituants ci-dessus. Par conséquent, l'effet peut être dû à l'effet synergique ou à un seul constituant.

V. Evaluation de l'activité antidiabétique

V.1. Test de tolérance au glucose

L'effet de l'EBAF à 250,500 mg/kg p.c., sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose, est montré sur la **figure 40**.

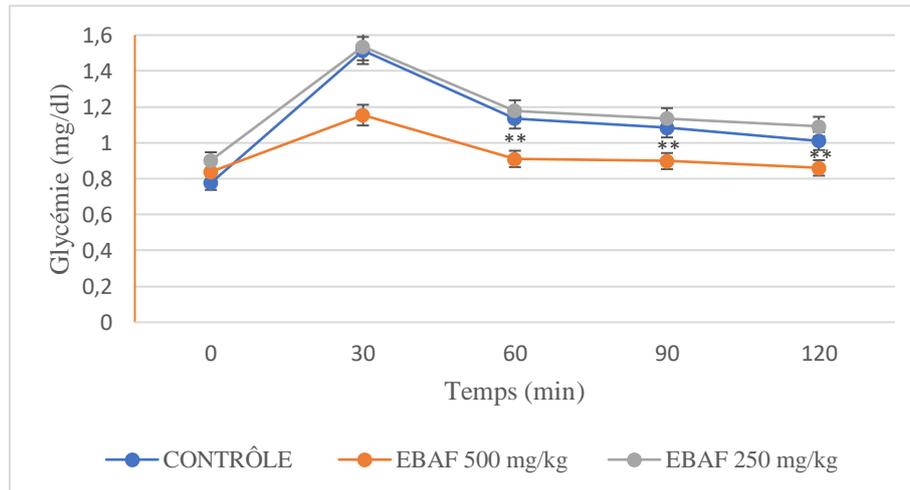


Figure 40. Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait *n*-butanolique *D'Atractylis flava* Desf, et soumis à un test de tolérance orale au glucose.

Les résultats obtenus, de l'effet de ces deux doses 250 et 500 mg/kg p.c., administrés par voie orale, sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose montrent que l'extrait EBAF à la dose 500mg/kg a diminué significativement l'hyperglycémie observée chez les rats témoins après 60,90 et 120 min ($p < 0.01$). Ce résultat, nous a permis de constater que EBAF possède un effet anti hyperglycémiant. Cependant, tout extrait ou molécule capable de diminuer l'hyperglycémie, peuvent intervenir en inhibant l'absorption intestinale du glucose, en favorisant l'utilisation du glucose par le muscle et le tissu adipeux, ou en stimulant la sécrétion de l'insuline par le pancréas (Shrayyef et Gerich, 2010).

V.2. Effet aigüe de l'EBAF sur les rats diabétiques

Les résultats de l'effet antidiabétique sur les rats diabétiques traités par une dose unique de d'EBAF à la dose de 100, 250 et 500mg/kg sont illustrés par le **tableau 27**. Nous avons constaté qu'il y'a eu une diminution significative importante de la glycémie au cours des 120 minutes pour tous les groupes traités par EBAF à différentes doses. En effet, à partir de 30 minutes, la différence du taux de la glycémie des groupes diabétiques traités est déjà significative ($p < 0.001$) par rapport à la glycémie initiale des diabétiques témoins non traités. Cette chute de

glycémie continue dans le temps et d'une manière dose dépendante, pour la dose de 500 mg/kg, le pourcentage d'inhibition atteint 39,40 % à 120 min. Toutes les valeurs obtenues sont hautement significatives.

Tableau 27. Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extraits *n*-butanolique d'*Atractylis flava* Desf.

Temps (min)	% d'inhibition			
	30	60	90	120
Eau physiologique	1,72±0,29	2,57±0,38	-0,18±0,38	-2,69±0,44
Glibenclamide 2,5 mg/kg	35,04±0,45***	39,33±1,01***	45,08±0,95***	56,20±0,71***
EBAF 500 mg/kg	16,80±0,48***	23,90±0,63***	29,49±0,54***	39,40±0,69***
EBAF 250 mg/kg	9,48±0,29***	17,60±0,70***	28,59±0,68***	29,18±0,83***
EBAF 100 mg/kg	3,94±0,70*	8,82±0,96***	16,08±0,88***	18,81±1,69***

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n=5). P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au témoin.

L'activité antidiabétique d'EBAF été évaluée *in vivo* chez des rats Wistar normaux et rendus diabétiques par l'alloxane, la toxicité de l'alloxane a été étudiée par plusieurs auteurs, néanmoins le mécanisme de son effet pro oxydant sur le statut redox cellulaire reste fractionné. Ce produit diabétogène induit des dommages pancréatiques notamment au niveau des cellules β via les radicaux libres produits lors de sa métabolisation (Ammon *et al.*, 1983 ; Lenzen *et al.*, 1996). Ainsi toutes ces réactions mènent à la mort cellulaire, et à des altérations métaboliques liées en premier lieu à un déficit de l'insuline (destruction sélective des cellules β -pancréatiques sécrétrices).

Une activité antidiabétique significative a été obtenue, les différents doses d'EBAF ont provoqué une baisse de la glycémie de base au bout des deux heures comparativement au glibenclamide. Le screening chimique a montré que *Atractylis Flava Desf* contient des flavonoïdes, des saponosides et des terpènes et stérols. L'effet de cet extrait sur la réduction de la glycémie des rats soumis à une hyperglycémie permanente pourrait être lié à la présence de ces composés. Les flavonoïdes agissent en effet en améliorant la sensibilité des cellules de l'organisme à l'insuline, ce qui permet de réduire l'incidence du diabète de type 2 (Chen *et al.*, 2015). Les saponosides sont aussi connus par leur activité antidiabétique, et ceux de nature triterpénoïdes sont considérés comme de potentielle molécules très prometteuses pour le développement de nouveaux médicaments antidiabétiques (Li *et al.*, 2004). De plus, la tilliroside et la vicenine des flavonoïdes isolés de l'extrait butanolique d'*Atractylis flava Desf*, a montré un effet antidiabétique, en inhibant la digestion et l'absorption intestinale des hydrates

de carbone (activité sur SGLT1 et GLUT2) (**Islam et al., 2014 ; Goto et al., 2012 ; Zhu et al., 2010**)

L'EBAF est doué d'une activité anti hyperglycémiant remarquable. Il améliore la tolérance orale au glucose et corrige la glycémie chez les rats diabétiques. De plus, les résultats de l'activité antidiabétique in vitro montrent une activité inhibitrice de α -amylase et α -glucosidase. Ces constatations expriment des effets positifs, à jeun et post-prandial, qui pourraient être expliquées par des mécanismes à différents niveaux.

D'une part, par la stimulation de la sécrétion de l'insuline. Cette hypothèse est argumentée par l'effet positif observé après une surcharge de glucose. Ce test simple reflète la physiologie de la sécrétion d'insuline dont il est connu que la présence des aliments dans la lumière intestinale stimule les entérocytes à libérer le Glucagon like peptide1 (GLP-1) et le Glucose-dépendent insulino-tropic peptide (GIP). Ces hormones intestinales provoquent la sécrétion de l'insuline glucose-dépendante et inhibent la sécrétion du glucagon (**Baggio et Drucker, 2004 ; Brubaker et Drucker, 2004**).

D'autre part, par l'amélioration l'hyperglycémie à jeun résultante des effets toxiques de l'alloxane. Cela pourrait être le résultat d'une potentialisation des effets d'insuline ou d'un insulino-mimétisme qui permet de normaliser un niveau trop élevé de glucose en présence d'insuline. Elle inhibe la néoglucogenèse et la glycolyse (**Bloomgarden, 2004 ; Malher et Alder, 1998**).

Les sulfamides hypoglycémiantes comme le glibenclamide se lient à un récepteur spécifique, sur la membrane des Cellules β pancréatiques au voisinage du canal potassique ATP dépendant et provoquent la fermeture de ce dernier. Ceci va entraîner une dépolarisation membranaire des cellules β avec ouverture des canaux calciques voltage dépendant et un influx de Ca^{2+} déclenchant ainsi par exocytose l'extrusion des granules de sécrétion d'insuline (**Grimaldi et al., 2009**).

L'EBAF a montré une activité anti hyperglycémiant significative, en améliorant la tolérance orale au glucose chez les rats normaux et diabétiques et par inhibition de l' α -amylase et α -glucosidase, cette activité peut être expliquée par trois mécanismes d'action possibles ; une inhibition de l'absorption intestinale du glucose, une stimulation de la sécrétion de l'insuline, ou une amélioration du transport périphérique du glucose.

Les molécules soupçonnées responsable cet effet anti hyperglycémiant observé sont la tilliroside et la vicenine. Cet effet hypoglycémiant peut être due à une seule molécule ou bien à plusieurs molécules qui agissent le plus probable en synergie.

*Conclusion générale
et perspectives*

Les phytoconstitués végétaux restent la source fiable et capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Grâce à la médecine traditionnelle et l'ethnobotanique, la recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation. Les plantes médicinales font l'objet de recherche scientifique soutenue en vue de les valoriser comme source de substances naturelles bioactives.

Au cours du présent travail une espèce végétale Algérienne a été investiguée biologiquement. Il s'agit d'*Atractylis flava* Desf (Asteraceae).

Le présent travail s'est proposé de cribler et quantifier la constitution phytochimique et d'évaluer les activités biologiques des extraits d'*Atractylis flava* Desf, dans le but de valoriser et de rationaliser leurs usages thérapeutiques traditionnels.

Dans un premier temps, le criblage phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des stérols et des triterpènes, des saponosides et des composés réducteurs. Cependant, l'absence des alcaloïdes.

Sur le plan quantitatif, la quantification des flavonoïdes et des polyphénols totaux a révélé une variation du contenu en ces métabolites en fonction de la polarité du solvant. La fraction n-butanol et acétate d'éthyle sont les plus riches en composés phénoliques et flavonoïdes.

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été évalué en utilisant les méthodes suivantes : β -carotène, DPPH, ABTS, CUPRAC, le pouvoir réducteur et la chélation de fer. L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que tous nos extraits manifestent une forte capacité antioxydante et plus particulièrement l'extrait acétate d'éthyle. Ceci pourrait être justifié par la présence d'un contenu relativement important en composés phénoliques, comme il a été révélé auparavant par les analyses phytochimiques.

Les extraits ont montré une activité anti-inflammatoire significative, inhibant la dénaturation du BSA. En effet, l'EBAF s'est révélé également doué d'une activité antidiabétique par inhibition de l' α -glucosidase et l' α -amylase.

D'autre part, le test de larves de crevettes *Artémia salina* à différentes doses montre une mortalité élevée dans tous les lots traités par les extraits étudiés.

Pour l'activité anticancéreuse, l'étude d'*Atractylis flava* révèle également une toxicité sur les cellules THP-1. Effectivement, nous observons une dégradation de l'activité mitochondriale.

Afin d'affiner le mécanisme cytotoxique de l'EBAF, une analyse par RNAseq pour identifier les gènes impliqués dans cette voie exprimée chez THP-1 a été réalisée. Nous observons une tendance à la sous-expression de tous les gènes d'intérêts, et ceci de manière significative. Notons que la sous-expression est plus importante pour les gènes BCL-2, SDHA, (jusqu'à 8 fois moins) ainsi que CASP 8, OPA1 et NCF1 (jusqu'à 4 fois moins). Ceci n'est autre que la conséquence d'altérations conformationnelles des mitochondries accompagnées d'un dysfonctionnement du cycle de Krebs.

Nous soulignons également la probabilité pour *Atractylis flava* de réduire les processus inflammatoires, révélée par une sous-expression du gène TNF- α . Cependant, il faudrait explorer davantage cette voie en étudiant les interleukines et interférons.

Sur le volet toxicité, l'essai de toxicité aiguë pratiqué par voie orale à la dose 2000 mg/kg a montré que l'EBAF de la plante entière de *A. flava* ne présente pas de toxicité chez les rats pour la dose prescrite. De ce fait, d'autres études sont nécessaires pour mieux investir la toxicité subaiguë et chronique de *A. flava*.

L'EBAF a été testé pour leur activité diurétique une réponse diurétique et la puissance d'excrétion électrolytique (Na⁺ et K⁺, Cl⁻) de l'EBAF ont été signalé par rapport aux rats témoins normaux. De la présente étude, nous pouvons conclure que l'EBAF a montré une action diurétique.

De même, l'administration orale de l'EBAF. Prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte de rat induit par l'ovalbumine. De plus, l'EBAF montre un effet antipyrétique sur l'hyperthermie induite par l'injection d'une solution de la levure de bière (20 %) chez le rat.

Concernant l'activité antidiabétique, l'EBAF a montré une activité hypoglycémiant significative, en améliorant la tolérance orale au glucose chez les rats normaux et diabétique et il corrige la glycémie chez les rats diabétiques, cette propriété peut être expliquée par trois mécanismes d'action possibles ; une inhibition de l'absorption intestinale du glucose, une stimulation de la sécrétion de l'insuline, ou une amélioration du transport périphérique du glucose.

Globalement, Les résultats significatifs obtenus au cours de cette étude ont montré que *Atractylis Flava Desf* Possèdent des propriétés Antioxydante, Anticancereuse, Antidiabetique, Diuertique, antiinflammatoire, Antipyrétique.

Les travaux présentés dans cette étude représentent notre humble investigation à l'étude Pharmacologique de cette plante médicinale. Ces résultats constituent une base scientifique qui justifie l'utilisation traditionnelle d'*Atractylis flava Desf* et qui constituent une base scientifique qui justifie l'utilisation dans la prise en charge de diverses pathologies en Algérie.

Pour faire suite à cette étude, il faut savoir que ces activités pharmacologiques sont dues à des principes actifs contenus dans nos extraits.

C'est pour cela qu'il faudrait approfondir des recherches pour la mise en évidence de ces constituants par un fractionnement bio-guidé. Cela permettra d'isoler et de déterminer les principes actifs responsables de ses propriétés et déterminer leur mécanisme d'action.

Une étude in vivo des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

Pour conclure, la plante *Atractylis flava Desf*, qui pousse en Algérie et ne présente pas de toxicité et dotées de propriétés pharmacologiques qui mériteraient d'être approfondies.

Références

1. **Abdel Rahman S. M., Abd-Ellatif S. A., Deraz S. F., Khalil A. A. (2011).** Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 10733–10743.
2. **Adeneye A. A., Ajagbonna O. P., Adeleke T. I., Bello S. O. (2006).** Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 374-379.
3. **Amić D., et al. (2003).** Structure-Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta.* 76 (1): p. 55-61.
4. **Ammon H.P.T., Amm, U., Eujen R., Hoppe E., Trier G., Verspohl E.J. (1983).** The role of old age in the effects of glucose on insulin secretion, pentosephosphate shunt activity, pyridine nucleotides and glutathione of rat pancreatic islets. *Life Sci.* 34, 247–257.
5. **Anosike C.A., Obidoa O., Ezeanyika LUS. (2012).** The anti—inflammatory activity of garden egg (*Solanum aethiopicum*) on egg albumin—induced oedema and granuloma tissue formation in rats. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5(1):62-6.
6. **Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981.
7. **Audrius P., Petras R.V., Sofia S., Pieter D.W., Teris A., van B. (2012).** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania *Food Chemistry* .130:695–701.
8. **Axelrod Y.K., Diring M.N. (2008).** Temperature management in acute neurologic disorders. *Neurol Clin,* 26 (2): 585–603.
9. **Baggio LL., Drucker DJ. (2004).** Glucagon-like paptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best practice and research clinical endocrinology and metabolism.* 18 (4):531-554.
10. **Baldwin B. G., Wessa B. L., Panero J. L. (2002).** Nuclear DNA evidence for major lineages of Helenioid Heliantheae (Compositae). *Systematic Botany* 27, 161–198.
11. **Baranska M., et al. (2005).** Chemotaxonomy of aromatic plants of the genus *Origanum* via vibrational spectroscopy *Anal.Bianal.Chem.* 381(6): p. 1241-1247.

12. **Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U., Kumquat G.G. (2011).** Fortunella japonica Swingle juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food Research International* 44, 21902197.
13. **Bedi S.G., et al. (2003).** Anti-inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus Citriodora* and *Cymbopogon goganteus* inhibited lipoxygenase L-1 and cyclooxygenase of PGHS. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 17 : p. 191-197.
14. **Begum S., Saxena B., Goyal M., Ranjan R., Joshi V.B., Rao C V, et al. (2010)** Fitoterapia Study of antiinflammatory , analgesic and antipyretic activities of seeds of *Hyoscyamus niger* and isolation of a new coumarinolignan. *Fitoterapia.*81(3):178–184.
15. **Bekro Y.A., Bekro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., Ehile E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. Et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences et Nature*, 4(2) : 217- 225.
16. **Bhat M., Zinjarde S.S., Bhargava S.Y., RaviKumar A & Joshi B.N. (2011).** Antidiabetic Indian Plants: A good source of potent amylase inhibitors. Evidence based Complementary and Alternative Medicine.2011; 2011: 1-6.
17. **Bhattacharyya S., Dudeja P.K., Tobacman J.K., (2010).** Tumor necrosis factor alpha-induced inflammation is increased but apoptosis is inhibited by common foodadditive carrageenan. *J. Biol. Chem.* 285, 39511–39522.
18. **Blois M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
19. **Bloom garden ZT. (2004).** Glycemic treatment, Control of glycemia. *Diabetes care.* 27(5) :1227-1234.
20. **Bohlmann F., Schusterp A., Meusel H. (1989).** A Carlina oxides derivative from *Carlina diae*. *Phytochemistry* 20, 823 – 824.
21. **Bouaziz M., Dhouib A., Loukil S., Boukhris M., Sayadi S. (2009).** Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 7017–7027.
22. **Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 114:1198–1205.

23. **Bremer K. (1987).** Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3, 210–253.
24. **Bremer K. (1994).** *Asteraceae: Cladistics and Classification*, Timber Press, Portland.
25. **Bremer K., Jansen R. K. (1992).** A new subfamily of the Asteraceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79, 414 – 415.
26. **Brubaker PL., Drucker DJ. (2004).** Minireview: Glucagon-Like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology.* 145 (6) :2653-2659.
27. **Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales.* 1993, Paris : 2^{ème} édition Tec&Doc. . p.387-402.
28. **Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 3^{ème} édition, éditeur technique et Documentation, Paris.
29. **Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 4^{ème} Edition. Lavoisier, Paris, 1288 p.
30. **Bylka W., Mathawska I., Pilewski N.A. (2004).** Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association.* 7(2): p. 24-26.
31. **Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences,* 74 : 2157–2184.
32. **Carée P. (1953).** *Précis de technologie et de chimie industrielle.* Tome III Ed. Ballière J. B. Et Fils.
33. **Chabani S., Haba H., Lavaud C., Benkhaled M., Harakat D. (2013).** Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochem Lett* .2013;6(1):9–13.
34. **Chabani S., Lavaud C., Benkhaled M., Harakat D., Long C., Haba H. (2016).** Three new oleanane-type triterpene saponins from *Atractylis flava*. *Phytochem Lett* ;15:88–93.
35. **Chandra S., Chatterjee P., Dey P., Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,*178-180.

36. **Chen J., Mangelinckx S., Adams A., Wang Z., Li W., De Kimpe N. (2015).** Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Natural product communications*, 10(1),187-200.
37. **Conboy L., Foley AG., OBoyle NM., Lawlor M., Gallagher H.C., Murphy K.J., Regan C.M. (2007).** Curcumin-induced degradation of PKC delta is associated with enhanced NCAM PSA expression and spatial learning in adult and aged Wistar rats,*Biochem Pharmacol* 77:1245-1265.
38. **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): p. 564-570.
39. **Daniele C., Dahamna S., Firuzi O., Sekfali N., Saso L., Mazzanti G. (2005).** *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 97, 175–18.
40. **Darias V., Bravo L., Rabanal R., Sanchez Mateo C., Gonzalez Luis R. M., Hernandez Perez A. M. (1989).** New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *J. Ethnopharmacol.* 25, 77– 92.
41. **De Padua L.S., Bunyapraphatsara N., Lemmens R.H.M.J. (1999).** *Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1). Medicinal and Poisonous Plants 1.* 1999, Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers.
42. **Decker E.A., Welch B., (1990).** Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.*, 38, 674–677.
43. **Dey P.M. and J.B. (1999).** *Harborne, Methods in plant biochemistry. Vol. 7 Terpenoids.* San Diego: Academic press.
44. **Diatewa M., Badila Samba.C., Hondi Assah .T.C., Abena A.A. (2004).** Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2004; 92:229–232.
45. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D. Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97, 654-660.
46. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Hassani L.M.I., A. Bodoc, Gmira G. (2003).** Screening phytochimique d'une endemique Ibero-marocain, *Thymelaea lytroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61- 78.

47. **Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J. (2003).** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109, 458–463.
48. **Dorosz P.H. (2004).** Guide pratique des médicaments 24e édition. Maloine 27, rue de l'école de Médecine, 75006 Paris. 1876p.
49. **Dos Santos M., Chen G., Almeida M., Soares D., de Souza G., Lopes N. (2010).** and Lantz R. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophorericoides* on in vitro inflammatory mediator production. *Natural Product Communications*.5(5):733-740
50. **Dufour C., Dangles O. (2004).** Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721: 164– 173.
51. **Dykes L., Rooney,L.W. (2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants, *Rev. J. Cereal. Sci.*,44, 236–251.
52. **El Rhaffari L., Zaid A. (2002).** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Dans J. Fleurentin (éd.), *Des sources du savoir aux médicaments du futur*, IRD Editions, Paris, 293–318.
53. **Eyog O.M., et al. (1999).** Rapport du Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au sud du Sahara (programme SAFORGEN) Réseau “Espèces Ligneuses Médicinales” Compte rendu de la première réunion du Réseau 15-17 Décembre 1999 Station IITA Cotonou, Bénin. 1999.
54. **Fabiana C. Vila, Renata Colombo, Tatiana O. de Lira and Janete H. (2008).** Yariwake. HPLC Microfractionation of Flavones and Antioxidant (Radical Scavenging) Activity of *Saccharum officinarum* L. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 19, No. 5, 903-908.
55. **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372- 379.
56. **Farnsworth N.R., O. Akerele A.S., Bingel D.D., Soejarto Guo Z. (1985).** Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organiz.*, 63: 965-981.
57. **Fidele N., Joseph B., David R.K.A., Paul F.S.E. (2015).** Theophile Dimo.Diuretic and antioxidant activities of the aqueous extract of leaves of *Cassia occidentalis* (Linn.) in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2015; 8(9): 685–693.

58. **Fiorucci S., Golebiowski J., Carbol-bass D., Antonczak S. (2007).** Molecular simulation enlighten the binding of quercetin to lipoxygenase-3. *Proteins* 73:290-289.
59. **Funk, V. A., Susanna, A., Steussy, T. F., Robinson, H. E. (2009).** Classification of Compositae. In: Funk, V. A., Susana, A., Stuessy, T. F., Bayer, R. J., Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171–189.
60. **Gevrenova R., Joubert O., Tsv Mandova M., et al. (2014).** Effects of four Caryophyllaceae species extracts on macrophage cell lines. *Pharm Biol.* 52(7) :919-25.
61. **Goetz P. (2007).** Phytothérapie du diabète. Springer ; 5 : 212–217.
62. **González-Gallego J., Sánchez-Campos S., and M.J. (2007).** Tuñón, Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion hospitalaria.* Nutricion hospitalaria, 2007. 22 (3): p. 287-293.
63. **Goto T., Horita M., Nagai H., Nagatomo A., Nishida N., Matsuura Y., Nagaoka S. (2012).** Tiliroside, a glycosidic flavonoid, inhibits carbohydrate digestion and glucose absorption in the gastrointestinal tract. *56(3) :435-45.*
64. **Goto T., Teraminami A., Lee J.Y., Ohyama K., Funakoshi K., Kim Y.I., Hirai S, Uemura T., Yu R., Takahashi N., Kawada T. (2011).** Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *J Nutr Biochem.*
65. **Grimaldi A., Hartemann-Heurtier A., Jacqueminet S., Bosquet F., Masseboeuf N., Halbran M., Sachon C. (2009).** Guide Du Diabète 4e Ed, Masson.
66. **Gurib-Fakim A. (2006)** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: 1 - 93.
67. **Harborne J.B.** The flavonoids, advances in research since 1980. 1988, London : Chapman & Hall.
68. **Hertog M.G. (1996).** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the Nutrition Society.* 55: p. 385-397.
69. **Herz W., Heywood J. B., Harbone B., Turner L. (1977).** The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press, london, 1977. Chapter 11: p. 337.

70. **Hoda E. Hozaien., Walid Hamdy El-Tantawy., Abeer Temraz., Omayma D. ElGindi & Kamilia F. Taha. (2018).**Diuretic activity of ethanolic extract of *Panicum repens* L. roots and rhizomes, *Natural Product Research*.
71. **Hwang M.k., Song N.R., Kang N.J., Lee KW., Lee H.J. (2007).**Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9:its direct inhibition by quercetin.*Int J biochem Cell Biol* 41:1592-1600.
72. **Idriss H.T., Naismith J.H. (2000).** TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* (3):184-95.
73. **Igbe I., Ozolua R., Okpo S., Obasuyi O. (2009).** Antipyretic and analgesic effects of the aqueous extract of the fruit pulp of *Hunteria umbellata* K. Schum (*Apocynaceae*). *Trop. J. Pharm. Res.* 2009; 8:331–336.
74. **Islam MN., Ishita I.J., Jung H.A., Choi J.S. (2014).** Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties. *Food Chem Toxicol.*69:55-62.
75. **Jacquier-sarlin M.R., Polla B.S. (1994).** Protéines de stress : soi, non-soi et réponse Immune. *Médecine/sciences*, 10 (1): 31-41.
76. **Jean Bruneton. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier. 4éd. 1292 pages.
77. **Jeong S.I., Kim, S.Y., Kim S.J., Hwang B.S., Kwon T.H., Yu K.Y., Hang S.H., Suzuki K., Kim K.J. (2010).** Antibacterial Activity of Phytochemicals Isolated from *Atractylodes japonica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 15, 7395–7402.
78. **Jihed Boubaker, Mohammed Ben Sghaier, Ines Skandrani, Kamel Ghedira and Leila Chekir.(2012).** Isorhamnetin 3-O-robinobioside from *Nitraria retusa* leaves enhance antioxidant and antigenotoxic activity in human chronic myelogenous leukemia cell line K562 *BMC Complementary and Alternative Medicine.*12:135.
79. **Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. (1999).** *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach.* Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.
80. **Kang HS, Lee JY, Kim CJ. (2008).**Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythia fructus*. *J Ethnopharmacol* 116: 305-310.
81. **Kim H.P., et al. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences.* 96(3): p. 229-245.

82. **Kim Y.M., Jeong Y.K., Wang M.H., Lee W.Y., Rhee H.I. (2005).** Inhibitory effects of pine bark extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 2005; 21: 756-761.
83. **Kwon K.H., Murakami A., Tanaka T., Ohigashi H. (2005).** Dietary rutin, but not its aglyconquercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of proinflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 69:395-406.
84. **L'Azou B., Jorly J., On D., Sellier E., Moisan F., Fleury-Feith J., et al. (2008).** In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol* 5:22.
85. **Lacaille-Dubois M. A. (2000).** Biologically and Pharmacologically active saponins from plants: recent advances in Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal plants.
86. **Lagnika L., Amoussa A.M.O., Adjilèyè R.A.A., Lalèye A. & Sanni A. (2016).** Antimicrobial, antioxidant, toxicity and phytochemical assessment of extracts from *Acmella uliginosa*, a leafy-vegetable consumed in Bénin, West Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:34.
87. **Landes T. (2010).** OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol*, 21(6): p. 593-8.
88. **Langenheim J.H. (1990).** Plant resins. *Am. Scientist*, 1990. 78: p. 16-24.
89. **Lanneau D. (2010).** Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. *Sciences agricoles. Université de Bourgogne.*
90. **Le K., Chiu F., Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 105, 353-363.
91. **Lebovitz H.E. (1997).** Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metabol Clin North Am.* 1997; 26: 539-551.
92. **Lenzen S., Drinkgern J. & Tiedge M. (1996).** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 463–466.
93. **Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G. (2010).** Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *pharmacology and Therapeutics* .128(2):336-374.
94. **Leporatti M. L., Ivancheva S. (2003).** Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol.* 87, 123–

95. **Leporatti M. L., Pavesi A. (1990).** New or uncommon uses of several medicinal plants in some areas of central Italy. *J. Ethnopharmacol.* 29, 213–223.
96. **Li W. L., Zheng, H. C., Bukuru J. & De Kimpe N. (2004).** Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 1-21.
97. **Liesa M., Palacin M., Zorzano.A. (2009).** Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 2009. 89(3): p. 799-845.
98. **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et Universitaires romandes p. 4-5.
99. **Mahmmoud Y.A. (2007).** Modulation of protein kinase C by curcumin inhibition and activation switched by calcium ions. *Br J Pharmacol* 150:200-208.
100. **Malešev D., and Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2007. 72 (10): p. 921-939.
101. **Malher R.J., Alder M.L. (1998).** Type 2 Diabetes mellitus : update on diagnosis, pathophysiology, anreatment. *Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 84 (4) :1165-1171.
102. **Manitto P., Sammes P.G. (2007).** Biosynthesis of Natural Products. 1981, New York: John Wiley 101. Bakkali, F., et al., Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem. Toxicol.*, 2007. 46(2): p. 446-475.
103. **Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides, 2003, Université de Limoges : Limoges.
104. **Mark M., and Ghyselinc N.B. (2009).** Effets de la vitamine A sur la spermatogènèse. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*, 2009. 11(3) : p. 215-26.
105. **Matsuda H., Ninomiya K., Shimoda H., Yoshikawa M. (2002).** Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorg Med Chem.*10:707–12.
106. **Mccue P., Shetty K. (2004).** Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asian Pac J Clin Nutr.* 13: 101-06.

107. **McLAUGHLIN J. L. (1991)**. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. *Methods Plant Biochem*, Vol. 6, pp. 1-32.
108. **McLAUGHLIN J. L., Bethesda .(1988)**. Bioassays for discovery of antitumor and antiviral agent from natural sources. *Proceeding of NIH workshop*. Vol. 18, p. 220.
109. **Melek F. R., Aboutabl E. A., El-Shabrawy O., Radwan A. S., Hilal S. H., Hammam A., (1992)**. *Atractylis carduus angustifolia* flavonoids and anti-inflammatory activity. *Egypt. J. Pharm. Sci.* 33, 11–19.
110. **Melek F. R., Radwan A. S., Ahmed A. A., Hamman A. A., Aboutabl E. A. (1989)**. Triterpenes from *Atractylis carduus* L. *Pharmazie* 44, 735.
111. **Melo G., Muzitano M., Legora-Machado A., Almeida T., Oliveira D., Kaiser C., Koatz V., Costa S.C. (2005)**, glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS induced mouse lung inflammation. *Planta Medica* .71, 362–363.
112. **Michel T. (2011)**. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de Doctorat. Université d'Orléans.
113. **Middleton E., Kandaswami C., and T.C. (2008)**. Theoharides, The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*.52(4): p. 673-751.
114. **Miguel M. G. (2010)** “Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Antioxidants and Oxidation:” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 2009, no. November 2009, pp. 291–312.
115. **Miller H. M. (1971)**. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.
116. **Moltz H. (1993)**. Fever: causes and consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.*17:237–269.
117. **Montoro P., Braca A., Pizza C., et al. (2005)**. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem*, 92: 349 – 55.
118. **MOSHI M. J., et al. 1, (2009)**. Antimicrobial and brine shrimp toxicity of some plants used in traditional medicine in Bukoba District, north-western Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*, Vol. 11, pp. 23-27.

119. **Muhammad N., Saeed M., Khan H.(2012).** Antipyretic analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC Complement Altern Med.*12(1): 59.
120. **Nahid S., Firouzeh S. (2012).** Essential oil composition and antioxidant activity of *trigonella foenum graecum* L. plant. *IJACS.*2012.4-12.793-797.
121. **Naidu M.M., Shyamala B.N., Naik J.P., Sulochanamma G., Srinivas P. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 44: 451-456.
122. **Novais M.H., et al. (2004).** Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. 93: p. 183-195.
123. **OECD. (2001).** Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, Part 2, pp. 20-24. OECD, Paris.
124. **OECD. (2013).** Ligne directrice de l'ocde pour les essais de produits chimiques OCDE 301. (1) :9.
125. **Ourisson G. and P. Grabbé. (1961).** Les triterpènes tétracycliques. 1961 : Hermann Ed 194.
126. **Oyaizu M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 p. 307.
127. **Ozçelik B., Kartal M., Orhan I. (2011).** Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* 49, 396–402.
128. **Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara, 3ème édition, Ed. CNRS, Paris, France.
129. **Palani S., Raja R., Kumar P., Jayakumar S. (2009).** Therapeutic efficacy of *Pimpinella tirupatiensis* (Apiaceae) on acetaminophen induced nephrotoxicity and oxidative stress in male albino rats. *International Journal Pharm Tech.*
130. **Panero J. L., Funk V. A. (2002).** Toward a phylogenetic classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115, 909–922.

131. **Panero J.L., Funk V. A. (2007).** New infrafamilial taxa in Asteraceae. *Phytologia* 89, 356–360.
132. **Panero J.L., Funk V.A. (2008).** The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 757–782.
133. **Panthong A., Supraditaporn W., Kanjanapothi D., Tae S.T., Reutrakul V. (2007).** Analgesic antiinflammatory and ventonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. *J Ethnopharmacology.* (110) :264-270.
134. **Peirs C. (2005).** Contribution à l'étude phytochimique de *Galega officinalis* L. (Fabaceae). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de Pharmacognosie de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 30p.
135. **Poitras E., Houde A. (2002).** La PCR en temps réel : principes et applications. Décembre 2002;2(2):2-11. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 15 janv 2002;397(2):342-4.
136. **Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtès C., et al. (2011).** Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol.* 8:10.
137. **Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
138. **Quignard E.L.Q., Nunomura S.M., Pohlit A.M., Alecrim A.M., Pinto A.C.S., Portela C.N., et al (2004).** Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. *Pharmaceutical Biology,* 42(3): 253-257.
139. **Ramiarantsoa H., et al. (2009).** A Ketosteroid Isolated from *Morinda Morindoides*. *European Journal of Scientific Research.*28(4) : p. 621-626.
140. **Rampersad S.N. (2012).** Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors.*12(9) :12347-60.
141. **Rao Y.K., Geethangili M., Fang S.H., Tzeng Y.M. (2007).** Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food Chem Toxicol* 2007 ;45 :1770–6.

142. **Rauf A., Uddin G., Siddiqui B.S., Khan A., Khan H., Arfan M., et al. (2014).** In-vivo antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of pistagremic acid isolated from *Pistacia integerrima*. *Phytomedicine*.21(12):1509–1515.
143. **Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2000).** Biologie végétale. Bruxelles, Book University.
144. **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic.Bio. Med.*, 26, 1231–1237.
145. **Rio D.C., Ares M., Hannon G.J., Nilsen T.W. (2010).** Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*.2010(6):pdb. prot5439.
146. **Roth J. (2006).** Endogenous antipyretics. *Clinica Chimica Acta*. 371 :13–24.
147. **Sangita C., priyanka C. (2012).** Evaluation of in-vitro ant-inflammatory .2(suppl1): s178- s180.
148. **Sangita C., Priyanka C., Protapaditya D., Sanjib B. (2012).** Evaluation of invitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012) S178-S180.
149. **Santi R, Rapizzi E, Canu L, et al. (2017).** Potential Pitfalls of SDH Immunohistochemical Detection in Paragangliomas and Pheochromocytomas Harbouring Germline SDHx Gene Mutation. *Anticancer Res*. 2017; 37(2):805-812.
150. **Shrayyef M. Z., Gerich J. E. (2010).** Normal glucose homeostasis. In: Poretzky L, editor. *Principles of Diabetes Mellitus* (p. 19-35). New York: Springer.
151. **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. *Met. Enzym.*, 299, 152-178.
152. **Skalli S., Alaoui I., Pineau, A., Zaid A., Soulaymani R. (2002).** L'intoxication par le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) ; à propos d'un cas clinique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95, 284–286.
153. **SOFOWORA E.A. (1982).** Medicinal plants and traditional medicine in Africa. John Wiley and Sons, New York, 256P.

154. **Srinivas B., Kumar A., Lakshman K., Kn J. (2011).** Comparative antipyretic activity of methanolic extracts of some species of *Amaranthus*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(1): S47-S50.
155. **srinivas B., Kumar A., Lakshman K., Kn J. (2011).** Comparative antipyretic activity of methanolic extracts of some species of *Amaranthus*. *Asian Pac J Trop Biomed* .1(1):S47–S50.
156. **Strober W. (2001).** Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* Appendix 3 : Appendix 3B.
157. **Su L., Gourion A. (1987).** Utilisation des médicaments suivant le diagnostic dialectique des organes et des entrailles. *La Revue Française de Médecine Traditionnelle Chinoise* 125, 292–305.
158. **Sudha P., Ravindran R., Zinjarde S Bhargava S., & Ravi Kumar A. (2011).** Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 110.
159. **Sudha P., Zinjarde S., Bhargava S., & Ravi Kumar, A. (2011).** Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 11(5): 1-10.
160. **Suksamrarn A., et al. (2004)** Antimycobacterial Activity and Cytotoxicity of Flavonoids from the Flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch. Pharm. Res.* 27(5): p. 507-511.
161. **Sultana N., Ata A. (2008).** Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem.* Dec;23(6):739-56.
162. **Svoboda K.P., and J.B. Hampson. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW, p. 1-17.*
163. **Tapas A.R., D.M. (2008).** Sakarkar, and R.B. Kakde, Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of Pharmaceutical Research.* 7(3): p. 1089-1099.
164. **Teillet F., Boumendjel A., Boutonnat J., Ronot X. (2000).** Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents, *Med Res Rev* 28:715-745.

165. **Teixeira S., Siqueta, C., Alvesb C., Boalb I., Marquesc M.P., Borgesd F., Limaa J.L.F.C., Reisa S. (2005).** Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoïds present in diet. *Free Radical Biology & Medicine* 39, 1099-1108.
166. **Tiqwari A.K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*. 81(9): p. 1179-1181.
167. **Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., Nakae S., Konno T., et al. (1982).** Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 42(4):1530-6.
168. **Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980).** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*.26(2):171-6.
169. **Turkoglu A., Emin Duru M., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry* 101: 267–273.
170. **Urquiaga I., and Leighton F. (2000)** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*.33 (2): p. 55-64.
171. **Vikhreva P.N., Shepelev M.V., Korobko E.V., Korobko I.V. (2010).** Pcd4 tumor suppressor: properties, functions, and their application to oncology. *Mol. Gen.Mikrobiol. Virusol.*, 3–11.
172. **Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Wyman M.P., Williams R.L. (2000).** Structural determinants of phosphoinositides 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and sataurosporine. *Mol Cell* 6:909-919.
173. **Wallace J.M. (2002).** Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade: eicosanoids, cyclooxygenase and lipoxygenase-as an adjunct in cancer therapy. *Integr Cancer Ther*.1: 7-37.
174. **Wan J., Gong X., Jiang R., Zhang Z., Zhang L. (2013).** Antipyretic and anti-inflammatory effects of asiaticoside in lipopolysaccharide-treated rat through up-regulation of Heme Oxygenase-1. *Phytother. Res*.27:1136– 1142.
175. **Wang L., Yang X., Qin P., Shan F., Ren G. (2013).** Flavonoïd composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Industrial Crops & Products* 49, 312-31.

176. **Westphal D., Dewson G., Czabotar P.E., Kluck R.M. (2011).** Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.*1813(4):521-31.
177. **Williams L.A.D et al. (2002). in Duganath N., Rubesh Kumar S., Kumanan R., Jayaveera K.N. (2010).** Evaluation Of Anti-Denaturation Property And Anti-Oxidant Activity Of Traditionally Used Medicinal Plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(2): 1-7.
178. **Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49:4083–4089.
179. **Yuliana N.D., Khatib A., Link-Struensee A.M., Ijzerman A.P., Rungkat-Zakaria F., Choi Y.H., Verpoorte R. (2009).** Adenosine A1 receptor binding activity of methoxy flavonoids from *Orthosiphon stamineus* *Planta Med.*75(2):132-6.
180. **Zeisberger E. (1999).** From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol.* 24 :287–326.
181. **Zhu Y., Zhang Y., Liu Y., Chu H., Duan H. (2010).** Synthesis and biological activity of trans-tiliroside derivatives as potent anti-diabetic agents. *Molecules.*10;15(12):9174-83.

Annexes

Table des annexes

Annexe 1 : Protocole pour le passage des cellules	1
Annexe 2 : Protocole de la préparation des concentrations d'extrait de plante.....	2
Annexe 3 : Protocole du test Alamar blue.....	3
Annexe 4 : Protocole du test WST-1	4
Annexe 5 : Protocole du test au bleu trypan.....	5
Annexe 6 : Protocole d'extraction d'ARN	6
Annexe 7 : Protocole du Bio-Analyzer®	7
Annexe 8 : Résultats du BioSpec-nano® et du Bio-Analyzer®.....	8
Annexe 9 : Protocole de la RT-PCR	9
Annexe 10 : Protocole de la PCR	10
Annexe 11 : Protocole du test d'apoptose caspase 3	11

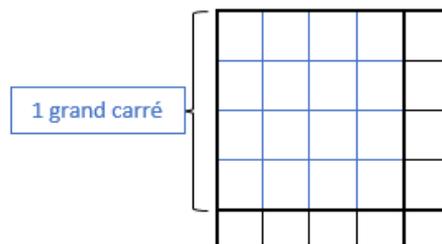
Annexe 1 : Protocole pour le passage des cellules THP-1

Préparation des THP-1 :

- Secouer les flacons contenant les cellules THP-1 pour pouvoir décoller les cellules des parois (cellules semi-adhérentes).
- Transférer le contenu dans des tubes stériles de 15 ml
- Centrifuger à 130g pendant 5 minutes à 25°C puis retirer le surnageant
- Ajouter dans chaque tube 5 ml de milieu frais puis mélanger avec une pipette

Comptage des cellules :

- Dans une microplaque, déposer 20 µl de bleu trypan + 20 µl de suspension (1 puits = 1 réplica). Mélanger à l'aide de la pipette de 100 µl.
- Prélever 20 µl de chaque puits et placer dans une cellule de comptage (lame KOVA)
- Compter les cellules vivantes au microscope optique → 3 grand carré par réplica



$$\text{Nombre de cellules par ml} = \frac{\sum \text{cellules comptées dans N grand carré}}{N} \cdot \text{facteur de dilution} \cdot 10^4$$

Tableau 01 : Comptage des cellules THP-1.

Réplica N°	Nombre de cellules par carré	Nombre de cellules dans 5ml	Volume pour 1,5M de cellules
1	X	$Y = (X/3) \cdot 5\text{ml} \cdot 2 \cdot 10^4$	$(1,5\text{M} \times 5\text{ml}) / Y$
2
3
4

- Placer les volumes correspondant à 1,5 M de cellules dans les flacons
- Ajouter 15 ml de milieu et incuber à 37°C.

Annexe 2 : Protocole de la préparation des concentrations d'extrait de plante

Nous avons 24 puits par concentration + 2 puits d'interaction (car nous avons 2 microplaques) :

- $(24 + 2 \text{ puits}) \times 100 \mu\text{l} = 2600 \mu\text{l} = 2,6 \text{ ml} \rightarrow$ pour chaque concentration nous avons besoin de 3 ml de solution.
- $3 \text{ ml} \times 6 \text{ concentrations} = 18 \text{ ml}$ de solution, que nous arrondissons à 20 ml.

Notre plus grande concentration sera de $800 \mu\text{g/ml}$ (tube initial de la cascade de dilution = T1). Nous avons donc besoin du double, soit $1,6 \text{ mg/ml}$, soit $9,6 \text{ mg/6ml}$.

- Dans un tube de 15 ml nous pesons $0,22\text{g}$ d'extrait, diluons dans 2 ml de milieu DMEM, puis nous homogénéisons la solution obtenue.
- La concentration est de $0,11 \text{ g/ml} = 110 \text{ mg/ml}$

$110 \text{ mg} \rightarrow 1 \text{ ml}$

$9,6 \text{ mg} \rightarrow X \text{ ml}$

$X = (9,6 \text{ mg} \times 1) / 110 \text{ mg} = \mathbf{87 \mu\text{l}}$. Il nous faut prélever $87 \mu\text{l}$ pour notre plus grande concentration qui correspondra au tube T1.

- Réaliser une dilution en cascade selon le tableau suivant (**Tableau 02**)

Tableau 02 : Préparation des dilutions en cascade pour l'ensemencement de 2 microplaques par un extrait de plante.

Tube	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Témoin T0
Milieu	6 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Solution	87 μl	-	-	-	-	-	-
-	-	3 ml T1	3 ml T2	3 ml T3	3 ml T4	3 ml T5	3 ml milieu
[C] en $\mu\text{g/ml}$	800	400	200	100	50	25	0

Annexe 3 : Protocole du test Alamar blue

Préparation du réactif :

- Déposer 1 ml de réactif dans 2 tubes Eppendorf
- Centrifuger 1 minute pour éviter la formation de cristaux

Ensemencement des microplaques :

- Déposer 10 µl de réactif dans chaque puits
- Emballer les microplaques dans du papier aluminium (réactif sensible à la lumière)
- Agiter à l'aide d'un agitateur de plaque 1 minute à 150 rpm
- Incuber 3 heures à 37°C.

Lecture :

- Retirer le couvercle de la microplaque et l'introduire dans le spectrofluorimètre
- Utiliser le logiciel SpectraManager :
 - Cliquer sur « *Fixed Wavelength Measurement* »
 - Cliquer sur « *Measure* »
 - Cliquer sur « *Paramètres* → *open* → *Alamar Blue* »
 - Choisir « *Sensitivity : medium* », vérifier l'absorbance à 570 nm et 585 nm
 - Cliquer sur l'icône [✎] et décocher « *Measure blank* », indiquer « *96 samples* », puis début à partir de « *A1* »
 - Cliquer sur « *Start* »
 - Copier les valeurs obtenues sur un fichier Excel pour traitement des données

Annexe 4 : Protocole du test WST-1

Traitement :

- Déposer 5 µl de réactif WST-1 « Roche – Cell proliferation reagent » dans chaque puits
- Incuber 2 heures à 37°C à l'abri de la lumière (emballage aluminium)

Lecture :

- Allumer le lecteur à microplaques de mesure d'absorbance
- Utiliser le logiciel MPM.6 :
 - o Cliquer sur « *New experiment* »
 - o Cliquer sur « *File → open protocole → WST-1* »
 - o Insérer la plaque dans l'appareil en cliquant sur « *Open/Close* »
 - o Cliquer sur « *Start read* »
- Lire l'absorbance à 415 nm
- Copier les valeurs obtenues sur un fichier Excel pour traitement des données

Annexe 5 : Protocole du test au bleu trypan

Jour 1 : Ensemencement des plaques par les THP-1 :

- Préparer pour chaque réplica une suspension de 25 ml à 5.10^4 cellules par ml
- Sur une plaque de 6 puits :
 - Dans 3 puits, déposer 4 ml de suspension correspondant au réplica X
 - Dans 3 autres puits, déposer 4 ml de suspension correspondant au réplica Y
 - Faire de même avec une seconde plaque (N = 4)
- Incuber 24 heures à 37°C

Jour 2 : Exposition à l'extrait :

- Préparer 2 solutions de concentrations différentes en extrait :
 - 100 µg/ml → peser 2 mg d'extrait et diluer dans 20 ml de milieu
 - 600 µg/ml → peser 12 mg d'extrait et diluer dans 20 ml de milieu
- Par réplica, déposer :
 - 4 ml de solution à 100 µg/ml dans un puits
 - 4 ml de solution à 600 µg/ml dans un autre puits
 - 4 ml de milieu dans le puits témoin
- Incuber 24 heures à 37°C

Jour 3 : Lecture :

- Dans une microplaque, déposer 20 µl de chaque puits + 20 µl de bleu trypan
- Déposer 20 µl du mélange sur une lame de comptage et compter 3 carrés au microscope
- Répéter l'opération une seconde fois, puis réaliser une moyenne du nombre de cellules
- Sur Excel, tracer un graphique représentant la mesure de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en extrait

Annexe 6 : Protocole d'extraction d'ARN

Jour 1 : Ensemencement des boîtes de pétri

- Préparer pour chaque réplica une suspension de 35 ml à $5 \cdot 10^4$ cellules par ml
- Ensemencer 10 ml de suspension par boîte, et 3 boîtes de pétri par réplica (N = 4) :
- Incuber 24 heures à 37°C

Jour 2 : Exposition à l'extrait

- Préparer une solution mère :
 - o Peser 50 mg d'extrait et diluer dans 2 ml de milieu
- Préparer 2 solutions de concentrations différentes en extrait :
 - o 25 µg/ml → prélever 45 µl de solution mère et diluer dans 45 ml de milieu
 - o 100 µg/ml → prélever 180 µl de solution mère et diluer dans 45 ml de milieu
- Déposer 10 ml de chaque solution dans les boîtes de pétri correspondantes :
 - o 4 boîtes avec du milieu = contrôle
 - o 4 boîtes exposées à 25 µg/ml
 - o 4 boîtes exposées à 100 µg/ml
- Incuber 4 heures à 37°C
- Transférer les 20 ml de chaque boîte dans des tubes de 50 ml
- Centrifuger 5 minutes à 130 g, 25°C
- Retirer le surnageant en faisant attention à ne pas aspirer le culot cellulaire
- Ajouter 1 ml de TRIzol dans chaque tube et mélanger « up and down » avec la pipette
- Transférer le contenu dans des tubes Eppendorf
- Placer les tubes au congélateur à -80°C

Jour 3 : Extraction de l'ARN

- Laissez décongeler les tubes Eppendorf à température ambiante (environ 25°C)
- Vortexer chaque tube
- Rajouter 200 µl de chloroforme et vortexer 15 secondes
- Incuber 10 minutes dans de la glace
- Centrifuger les tubes à 12 000 g pendant 20 minutes

- Jeter le surnageant
- Ajouter 1 ml d'éthanol 80% (préparé avec de l'eau DEPC) et tapoter pour mélanger
- Centrifuger à 9 000 g pendant 5 minutes
- Retirer l'éthanol
- Effectuer un deuxième lavage à l'éthanol
- Laisser les tubes ouverts 15 minutes sous la hotte aspirante afin d'évaporer l'éthanol
- Placer les tubes dans un bloc chauffant à 60°C jusque séchage
- Ajouter dans chaque tube 25 µl d'eau DEPC
- Vérifier la qualité et la quantité d'ARN des échantillons avec le spectrophotomètre BioSpec-nano®
- Placer les échantillons au congélateur à -80°C

Annexe 7 : Protocole du Bio-Analyzer®

Etape 1 : préparation des échantillons et du bio-analyzer

- Prélever 2 μ l de chaque échantillon d'ARN et les placer dans des tube Eppendorf 0,2ml.
- Placer les tubes dans de la glace.
- Préparer le tube « Mix » avec 65 μ l de gel et 1 μ l de solution dye.
- Centrifuger à 25°C pendant 10 minutes à 13 000 rpm.
- Laver le bio-analyseur avec des microplaques avec 2 solutions :
 - o RNase free.
 - o RNase away.
- Ajouter 350 μ l de chacune des solutions dans un des puits, au centre de la microplaque ; la solution se diffuse de manière homogène.
- Laisser 30 secondes pour chaque lavage.

Etape 2 : dénaturation de l'ARN

- Ouvrir le logiciel « bioradcfx » → file → open → protocol → bio-analyseur → open → fixer les échantillons dans l'appareil → ok → start run.

Etape 3 : préparation de la RNA Nano Chip (Figure 01)

- Placer 9 μ l du Mix dans le puits (G).
- A l'aide de la seringue fournie dans le kit (**Figure 02**), effectuer une pression et attendre 30 secondes avant de relâcher le piston ; la solution diffuse ainsi par capillarité sur toute la plaque de manière homogène.
- Ajouter 9 μ l de gel + 9 μ l de solution dye dans les deux puits G restant.
- Ajouter 5 μ l de marqueur dans tous les puits sauf les trois G.
- Ajouter 1 μ l de chaque échantillon d'ARN dans tous les puits sauf la dernière colonne de droite.
- Ajouter 1 μ l de solution ladder dans le puits (#).
- Placer la microplaque RNA Nano chip dans l'homogénéisateur pendant 2 minutes à 2400 rpm.

Etape 4 : analyse de la RNA Nano chip

- Placer la microplaque dans le bio-analyseur et lancer le logiciel 2100 expert → cliquer sur la plaque verte → nommer les échantillons → cliquer sur start.



Figure 01 : RNA Nano Chip utilisée lors des manipulations



Figure 1: Seringue du kit Bio-Analyzer system

Annexe 8 : Résultats du BioSpec-nano® et du Bio-Analyzer®

Le tableau ci-dessous regroupe les concentrations en ARN des différents échantillons, les ratios 260/280 et 260/230 obtenus grâce au BioSpec-nano®, ainsi que les RIN obtenus avec le Bio-Analyzer® (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Quantité, qualité et intégrité des échantillons testés

Echantillons	[ARN] ng/μL	260/280	260/230	RIN
Contrôle (1)	259,64	2,01	1,90	9,60
Contrôle (2)	685,10	2,13	1,82	10
Contrôle (3)	813,81	2,15	1,96	9,90
Extrait n-butanolique 25μg/ml (1)	290,95	2,03	1,77	9,60
Extrait n-butanolique 25μg/ml (2)	631,24	2,11	2,19	10
Extrait n-butanolique 25μg/ml (3)	380,74	2,05	1,95	9,90
Extrait n-butanolique 100μg/ml (1)	238,08	2,03	1,60	9,80
Extrait n-butanolique 100μg/ml (2)	603,13	2,08	2,27	9,80
Extrait n-butanolique 100μg/ml (3)	402,46	2,06	2,01	9,50

Annexe 9 : Protocole de la RT-PCR

Matériels et réactifs :

- Appareil Agilent Stratagène Mx 3000P.
- ARN (congelé à -80°C).
- iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR kit BioRad n°Cat.170-8841.

Etape 1 : dilution des échantillons d'ARN

- Le but est d'avoir une concentration en ARN de 20 ng/μl ; réaliser des dilutions à l'aide de la solution nuclease free water.

Etape 2 : préparation du Mix de RT

- Préparer pour chaque échantillon un Mix (**Tableau 04**)

Tableau 04 : Préparation du Mix par échantillon

Composé	V (μl) pour un échantillon
IScript RT supermix (tube gris)	4 μl
Nuclease free water	11 μl
Volume total	15 μl

Etape 3 : réaction dans des tubes à PCR de 0,2 ml (stériles)

- Placer 5 μl d'ARN
- Ajouter 15 μl de Mix de RT et mélanger à l'aide de la pipette « up and down »

Annexe 10 : Protocole de la PCR

Matériels et réactifs utilisés :

- SYBR Green QPCR master mix
- ADNc
- RNase free water.
- Biorad PCR

Étape 1 : préparation des primers :

- Préparer des dilutions au 1/10^{ème} des primers 100 µM à l'aide de la RNase free water
- Conserver les ADNc au congélateur à -20°C

Étape 2 : préparation du Mix de PCR :

- Préparer un design de la plaque avec les gènes d'intérêts
- Placer les solutions SYBR Green QPCR master mix dans de la glace
- Préparer pour chaque puits une solution comme indiqué ci-dessous (**Tableau 05**)

Tableau 05 : Volumes de solutions correspondants à un puits d'une plaque de PCR

Solutions	V pour un puits (µl)
SYBR Green QPCR master mix	10
Primer L	0,6
Primer R	0,6
RNase free water	4,8
ADNc dilué au 1/10^{ème}	4
Volume total	20

Étape 3 : lecture de la plaque

- Placer la plaque dans l'appareil Biorad
- Ouvrir le logiciel correspondant → nommer les puits → enregistrer → cliquer sur start
run

Annexe 11 : Protocole du test d'apoptose caspase 3

Jour 1 : Ensemencement des boîtes de pétri

- Préparer pour chaque réplica une suspension de 52 ml à 5.10^4 cellules par ml
- Ensemencer 10 ml de suspension par boîte, et 5 boîtes de pétri par réplica (N = 4) :
- Incuber une nuit à 37°C

Jour 2 : Exposition à l'extrait

- Préparer une solution mère :
 - o Peser 50 mg d'extrait et diluer dans 2 ml de milieu
- Préparer pour chaque extrait 2 solutions de concentrations différentes :
 - o 25 µg/ml → prélever 45 µl de solution mère et diluer dans 45 ml de milieu
 - o 100 µg/ml → prélever 180 µl de solution mère et diluer dans 45 ml de milieu
- Déposer 10 ml de chaque solution dans les boîtes de pétri correspondantes :
 - o 4 boîtes avec du milieu = contrôle
 - o 4 boîtes exposées à 25 µg/ml de l'extrait méthanolique
 - o 4 boîtes exposées à 100 µg/ml de l'extrait méthanolique
 - o 4 boîtes exposées à 25 µg/ml de l'extrait butanolique
 - o 4 boîtes exposées à 100 µg/ml de l'extrait butanolique
- Incuber 24 heures à 37°C

Jour 3 : Réalisation du test

- Utilisation du kit EnzChek® Caspase-3 Assay de Invitrogen™ qui contient :
 - o Z-DEVD-AMC substrate (MW = 767.7, composant A), 4 mg
 - o Diméthylsulfoxyde (DMSO) (composant B), 1,3 ml
 - o 20X Cell Lysis Buffer (composant C), 1,5 ml
 - o 5X Reaction Buffer (composant D), 20 ml
 - o Dithiothreitol (DTT) (composant E), 100 mg
 - o Ac-DEVD-CHO inhibitor (composant F), 0,2 mg
 - o 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC) reference standard (composant G), 0,5 mg
- Préparation des solutions stock :

- **Solution à 10 mM de Z-DEVD-AMC** : Ajouter 520 µl de DMSO directement dans la fiole de Z-DEVD-AMC substrate ; après utilisation cette solution se conserve à -20°C, à l'abris de la lumière.
- **Solution à 1 M DTT** : Ajouter 650 µl de dH₂O directement dans la fiole de DTT solide ; après utilisation cette solution se conserve à -20°C.

- **Protocole du test :**

- Récupérer le contenu des boîtes de pétri dans des tubes de 50 ml
- Centrifuger 5 minutes à 130 g
- Retirer le surnageant
- Ajouter 1 ml de PBS (Phosphate-Buffered Saline) dans chaque tube puis mélanger « up and down » avec la pipette
- Transférer dans des tubes Eppendorf 1 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5 000 rpm
- Retirer le surnageant
- Effectuer un second lavage au PBS
- Préparer une solution **1X Cell Lysis Buffer** : ajouter 50 µl de la solution 20X Cell Lysis Buffer (composant C) à 950 µl de dH₂O.
- Resuspendre le culot cellulaire de chaque échantillon par 50 µl de la solution 1X Cell Lysis Buffer, puis incuber dans de la glace pendant 30 minutes
- Pendant ce temps, préparer une solution **2X Reaction Buffer** : ajouter 400 µl de la solution 5X Reaction Buffer (composant D) et 10 µl de la solution 1 M DTT à 590 µl de dH₂O.
- Centrifuger les cellules lysées 5 minutes à 5 000 rpm
- Transférer 50 µl du surnageant des échantillons dans les puits d'une microplaque
- Préparer une solution **2X substrate working** : mélanger 20 µl de la solution 10 mM Z-DEVD-AMC substrate avec 980 µl de la solution 2X Reaction Buffer
- Ajouter 50 µl de la solution 2X substrate working dans les puits
- Couvrir la microplaque et incuber 30 minutes à température ambiante
- Mesurer la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre à 342/441 nm

Résumé

Dans le but de valoriser les plantes s à caractère médicinal et au regard de leur impact sur la santé par leur profusion en substances à vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude pharmacologique d'*Atractylis flava Desf* une plante réputée en médecine traditionnelle pour ces effets diuertique.

Une extraction liquide- liquide avec des solvants de polarités croissantes a été réalisée sur la poudre de la plante entière *Atractylis flava Desf*. L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la poudre de la plante a montré la présence des polyphénols, flavonoïdes, des stérols, des triterpènes et des composés réducteurs et l'absence des alcaloïdes. En parallèle, La quantification des phénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits bruts a montré que les fraction *n*-butanol et acétate d'éthyle sont les plus riches en ces composés avec $122.74 \pm 0.78 \mu\text{g GAE/mg}$, $118.76 \pm 0.27 \mu\text{g GAE/mg}$ de phénols totaux et $66.75 \pm 6.12 \mu\text{g EQ/mg}$, $63.32 \pm 3.60 \mu\text{g EQ/mg}$ de flavonoïdes respectivement.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. En particulier la fraction acétate d'éthyle de *A. flava* possède un meilleur pouvoir réducteur ($\text{IC}_{50} = 7,49 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$), un fort piègeur des radicaux DPPH ($\text{IC}_{50} = 158,41 \pm 3,24 \mu\text{g/ml}$) et ABTS ($\text{IC}_{50} = 15,57 \pm 2,93 \mu\text{g/ml}$), avec un puissant pouvoir inhibiteur du blanchiment du β -carotène ($\text{EC}_{50} = 16,52 \pm 1,87 \mu\text{g/ml}$). Cette fraction a une capacité Chélatrice ($\text{EC}_{50} = 78,11 \pm 4,18 \mu\text{g/ml}$) et réductrice de cuivre ($A_{0.50} = 28,58 \pm 0,65 \mu\text{g/ml}$). Les autres extraits montrent des pouvoirs antioxydants moins importants mais intéressants.

L'évaluation du potentiel anti-inflammatoire in vitro montre que les extraits d'*Atractylis flava* ont pu inhiber la dénaturation de BSA d'une façon significative ($P \leq 0.05$) et dose-dépendante. Ainsi, ces extraits ont montré une cytotoxicité contre les larves de l'artémia. En effet, l'EBAF s'est révélé également doué d'une activité antidiabétique par inhibition de l' α -glucosidase et l' α -amylase.

Les résultats du test de cytotoxicité au bleu trypan, WST-1, Alamar bleu de l'EBAF vis-à-vis les THP-1 ont montré que l'EBAF présente un effet cytotoxique vis-à-vis les cellules testées après une incubation de 24 h. L'analyse des ARN messagers réalisée sur la culture cellulaire traitée avec l'EBAF a permis d'identifier les gènes responsable la mort cellulaire ; OPA1, NCF1, PDCD4, TNF- α , CASP 3, CASP 8, SDHA, et BCL-2.

Les essais de la toxicité aigüe, ont montré que l'EBAF, administrés par voie orale ne présentent pas de toxicité chez les rats Wistar même à une dose de 2000mg/kg.

Les différents tests pharmacologiques réalisés in vivo de l'EBAF montrent qu'il possède des propriétés importantes : diuertique, antipyrétiques, anti-inflammatoires ; utilisant le modèle de l'œdème induit par l'ovalbumine, et aussi il provoque une amélioration de la glycémie chez des rats y ont un diabète induit par l'alloxane.

Du fait du potentiel thérapeutique de cette plante médicinale, des études complémentaires seront nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un phytomédicament.

Mots clés : *Atractylis Flava Desf*, Toxicité aigüe, Activité pharmacologiques, EBAF, in vivo, in vitro.

ABSTRACT

In order to enhance the value of medicinal plants and their impact on health through their profusion of substances with therapeutic virtues, we are interested in the pharmacological study of *Atractylis flava* Desf a plant renowned in traditional medicine for these diuetic effects.

Liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarities was carried out on the powder of the whole plant *Atractylis flava* Desf. Then, qualitative phytochemical examination carried out on the plant powder showed the presence of polyphenols, flavonoids, sterols, triterpenes and reducing compounds and the absence of alkaloids. The quantification of total phenols and flavonoids in crude extracts showed that the *n*-butanol and ethyl acetate fraction are the richest in these compounds with 122.74 ± 0.78 μg GAE/mg, 118.76 ± 0.27 μg GAE/mg total phenols and 66.75 ± 6.12 μg EQ/mg, 63.32 ± 3.60 μg EQ/mg flavonoids respectively.

The antioxidant activity methods show that all extracts exhibit antioxidant properties at different levels. In particular, the ethyl acetate fraction of A. Flava has a better reducing power ($\text{IC}_{50} = 7.49 \pm 0.54$ $\mu\text{g}/\text{ml}$), a strong trapper of DPPH radicals ($\text{IC}_{50} = 158.41 \pm 3.24$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) and ABTS ($\text{IC}_{50} = 15.57 \pm 2.93$ $\mu\text{g}/\text{ml}$), with a powerful bleaching inhibitory power of β -carotene ($\text{EC}_{50} = 16.52 \pm 1.87$ $\mu\text{g}/\text{ml}$). This fraction has a chelating effect ($\text{EC}_{50} = 78.11 \pm 4.18$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) and copper reducing capacity ($\text{A}_{0.50} = 28.58 \pm 0.65$ $\mu\text{g}/\text{ml}$). The other extracts show less important but interesting antioxidant powers.

The evaluation of anti-inflammatory potential in vitro shows that *Atractylis flava* extracts significantly inhibited the BSA denaturation ($P \leq 0.05$) in dose-dependent manner. Thus, these extracts showed cytotoxicity effect against artemia larvae. EBAF has also been shown to have anti-diabetic activity by inhibition of α -glucosidase and α -amylase.

The Results of Blue Trypan Cytotoxicity Test, WST-1, Alamar Blue of the EBAF against THP-1 showed that EBAF exhibits a cytotoxic effect to the cells tested after 24 h incubation. The RNA analysis performed on the EBAF treated cell identified the differentially expressed genes.

Acute toxicity tests showed that EBAF, when administered orally, was not toxic in Wistar rats even at a dose of 2000 mg/kg.

The various pharmacological tests carried out in vivo by the EBAF show that it has important properties: diuretic, antipyretic, anti-inflammatory; using the ovalbumin-induced edema model, and also it causes an improvement in blood sugar levels in rats with alloxan-induced diabetes.

Due to the therapeutic potential of this medicinal plant, additional studies will be necessary to make this work usable in the context of the development of a phytomedicine.

Keywords: Atractylis Flava Desf, Acute toxicity, Pharmacological activity, BEAF, in vivo, in vitro.

لتنمين النباتات ذات الخصائص الطبية ونظرا لمدى أهميتها في المجال الطبي وهذا لاحتوائها على مركبات ذات خصائص علاجية. نهدف بهذه الدراسة الى تقييم الخصائص الدوائية لنبته *Atractylis flava Desf*، وهي نبته مشهورة في الطب التقليدي كمدرد للبول.

تمت عملية الاستخلاص اعتمادا على طريقة سائل-سائل باستعمال مذيبات ذات قطبية متزايدة على مسحوق النبتة كاملة. أظهر الفحص الكيميائي الذي اجري على مسحوق النبتة وجود البوليفينولات، الفلافونويدات، الستيروول، التيربينات والسكريات المرجعة وغياب القلويدات. موازاة مع ذلك اظهر الفحص الكمي أن المستخلصات الخامة Acétate d'éthyle هي الاغنى بهذه المركبات لاحتوائها على نسبة $0,78 \pm 122,74$ ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/ملغ و $0,27 \pm 118,76$ ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك من مجموع الفينولات و $6,12 \pm 66,75$ ميكروغرام مكافئ للكرستين/ملغ و $3,60 \pm 63,32$ ميكروغرام مكافئ للكرستين/ملغ على التوالي.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات لها خصائص مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة وعلى وجه الخصوص فإن مستخلص Acétate d'éthyle له أحسن قدرة إرجاع ($IC_{50}=7,49 \pm 54 \mu g/ml$) واصطياد جذور DPPH ($IC_{50}=158 \pm 3,24 \mu g/ml$) و ABTS ($IC_{50}=15,57 \pm 2,93 \mu g/ml$) مع قدرة تثبيط β -carotène ($EC_{50}=16,52 \pm 1,87 \mu g/ml$) زيادة على ذلك قدرة استخلاص ($EC_{50}=78,11 \pm 4,18 \mu g$) وإرجاع النحاس ($Ao_{50}=28,58 \pm 0,65$) باقي المستخلصات أظهرت قدرة مضادة للأكسدة أقل لكن مهمة.

يبين تقييم القدرة المضادة للالتهاب في أن جميع المستخلصات قادرة على تمسخ الالبومين المصلي البقري (BSA) بشكل كبير كما أظهرت هذه المستخلصات سمية خلوية ضد يرقات الارتميا واطهر مستخلص EBAF نشاط مضاد للسكري عن طريق تثبيط الانزيمات α -amylase و α -glucosidase

أظهرت نتائج السمية الخلوية باستعمال اختبار Almar Bleu، WST-1، Bleu trypan أن مستخلص EBAF له تأثير سام على الخلايا كما سمحت دراسة الحمض النووي الريبسي التي أجريت على الخلايا المعالجة بمستخلص EBAF تحديد الجينات التي تسمح لنا باستكشاف الموت الخلوي: OPA1, NCF1, PDCD4, TNF α , CASP3, CASP8, SDHA, BCL2.

لم تظهر اختبارات السمية الحادة لمستخلص EBAF المقدم عن طريق الفم للجرذان أي سمية وذلك حتى جرعة 2000 ملغ/كغ. مختلف الاختبارات الدوائية التي أجريت في الجسم الحي لمستخلص EBAF ان له خصائص مختلفة منها، مدر للبول، خافض للحرارة، مضاد للالتهاب ومحسن لنسبة السكر في الدم.

نظرا للإمكانيات العلاجية لهذا النبات الطبي، سيكون من الضروري إجراء المزيد من الدراسات لجعل هذا قابلا للاستخدام في سياق تطوير دواء ذو أصل نباتي.

الكلمات المفتاحية: *Atractylis flava Desf*، EBAF، السمية الحادة، في الجسم الحي، في المختبر