



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. Marref Salah Eddine

Thème

**Contribution à l'étude des activités biologiques de
l'extrait méthanolique de la plante *Gladiolus
segetum in vivo et in vitro***

Soutenu le 12/12/2018

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

« Le meilleur médecin est la nature : elle guérit les trois quarts des
maladies et ne dit jamais de mal de ses confrères. »

Louis Pasteur

Remerciements

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

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse madame **Benkiki Naima**, maître de conférences à l'université Batna 2 de m'avoir suivi et dirigé tout au long de la réalisation de ce mémoire. Je la remercie aussi pour la confiance qu'elle a placée en moi, pour sa disponibilité permanente, pour sa patience et ses conseils.

Je souhaite également remercier madame **Hambaba Leila**, professeur à l'Université Batna 2 qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être présidente de jury.

J'adresse mes profonds remerciements à monsieur **Yahia Mouloud**, Professeur à l'Université Batna 2 et Directeur de notre laboratoire de recherche de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie sincèrement monsieur **Laroui Salah**, Professeur à l'Université Batna 2 pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de cette thèse. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance et de pouvoir aujourd'hui vous soumettre mes travaux de recherche.

J'exprime mes vifs remerciements à monsieur **Ayachi Ammar**, Professeur à l'Université Batna 1 et Professeur **Yahia Abdelwahab** de l'Université de Mila pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je tiens aussi à remercier mon frère **Melakhessou Mohamed Akram** qui m'a accompagné durant toute la période de réalisation de ce travail.

Un grand merci au docteur **Olivier Joubert** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire des cibles thérapeutiques formulation et expertise préclinique du médicament, Faculté de pharmacie, Université de Lorraine, Nancy, France.

Je tiens aussi à remercier **Ramia Safar**, docteur à l'université de Lorraine, Nancy, France pour son aide technique et scientifique.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

À mes chers parents

À mon frère et mes soeurs

À tous mes amis

Salah Eddine Marref

Liste des abréviations

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

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ALAT: Alanine Transaminase

AMP : Adénosine Monophosphate

ASAT: Aspartate Aminotransférase

BHA : ButylHydroxyAnisole

BHT : ButylHydroxyToluene

BSA : Bovine Serum Albumin

COX: Cyclo-Oxygénase

DEPC : Pyrocarbonate d'Ethyle

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 1,1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyl

DRw : Antigène D Related workshop

EAGS : Extrait d'acétate d'éthyle du *Gladiolus segetum*

ECGS : Extrait Chloroformique du *Gladiolus segetum*

EHGS : Extrait d'hexane du *Gladiolus segetum*

EMGS: Extrait méthanolique du *Gladiolus segetum*

EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESL : Extraction Solide - Liquide

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

fL: Femtolitre

FMN : Flavine Mononucléotide

FNS : Formule Numérique Sanguine.

HCT: Hématocrite

HGB: Hémoglobine

HLA : Human Leucocyte Antigène

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

iNOS : L'oxyde Nitrique Synthase

IC50 : Concentration Inhibitrice Médiane

LDH : Lactate Déshydrogénase

LOX : Lipooxygénase

MCH: Hémoglobine Corpusculaire Moyenne

MCHC: Concentration moyenne en Hémoglobine Corpusculaire

MCV: Volume Cellulaire Moyen

MPV: Volume Moyen des Plaquettes

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NF- κ B : Facteur nucléaire-kappa B

Ome : Oméprazole

PBS : Solution saline tamponnée au Phosphate

PCR : Réaction en Chaîne de la Polymérase

pg: Picograms

PGE2 : Prostaglandine E2

PLT: Plaquettes

GR: Globules Rouges

Rdt : Rendement d'extraction

RDW: Red cell distribution width

RIN : Numéro d'intégrité de l'ARN

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rpm : Rotation par minute

RT-PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase de la Transcriptase Inverse

SVF : Sérum de veau fœtal

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale

GB: Globules Blancs

WST-1 : Water Soluble Tetrazolium

ρ NPG : ρ -nitrophényl- α -D-glocopyranoside

μ g EAG/mg : Microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

μ g EQ/mg : Microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait.

Liste des figures

Numéro	Titre	page
Figure 01.	La plante <i>Gladiolus segetum</i>	7
Figure 02.	Structures de base des flavonoïdes	16
Figure 03.	Structures des différents squelettes des flavonoïdes	17
Figure 04.	Principaux squelettes stéroïdiques	22
Figure 05.	Principaux squelettes triterpéniques	23
Figure 06.	squelettes des anthraquinones	25
Figure 07.	Schéma d'extraction par les solvants organiques de la partie aérienne du <i>Gladiolus segetum</i>	31
Figure 08.	Cellule THP-1 au microscope à balayage (x 11 000) - 1B. Cellule THP-1 au microscope optique	40
Figure 09.	Protocole schématisé du test WST-1	41
Figure 10.	Schéma simplifié de l'isolement de la phase aqueuse contenant l'ARN	42
Figure 11.	Schéma simplifié du principe de l'obtention d'ADNc par RT-PCR et qPCR	43
Figure 12.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	53
Figure 13.	Courbe d'étalonnage de la quercétine	54
Figure 14.	Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	55
Figure 15.	Activité antioxydante ABTS des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	57
Figure 16.	Activité métal chélate des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	58
Figure 17.	Activité de blanchissement du β -carotène par les extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	59
Figure 18.	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	60
Figure 19.	Pouvoir réducteur des extraits du <i>Gladiolus segetum</i> testé par la méthode de FRAP	62
Figure 20.	Activité antiinflammatoire <i>in vitro</i> des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	66
Figure 21.	Effet de l'extrait méthanolique du <i>Gladiolus segetum</i> sur l'inhibition de Alpha-amylase	68
Figure 22.	Effet de l'extrait méthanolique du <i>Gladiolus segetum</i> sur l'inhibition de Alpha-glucosidase	69
Figure 23.	Activité mitochondriale des THP-1 exposées à <i>Gladiolus segetum</i> par le test Alamar blue	71
Figure 24.	Activité mitochondriale des THP-1 exposées à <i>Gladiolus segetum</i> par le test WST-1	72
Figure 25.	Activité cellulaire des THP-1 exposées à <i>Gladiolus segetum</i> par test au bleu trypan	73
Figure 26.	Etude de l'expression des gènes des THP-1 exposées à <i>Gladiolus segetum</i> (25 μ g/ml/100 μ g/ml)	74
Figure 27.	Mesure de l'activité de la protéine caspase 3 des THP-1 exposées à <i>Gladiolus segetum</i>	74

Figure 28.	Coupes histologiques des tissus hépatiques du groupe contrôle et du groupe traité avec l'EMGS [2000 mg/kg p.c]	78
Figure 29.	Coupes histologiques des tissus rénales du groupe contrôle et du groupe traité avec l'EMGS [2000 mg/kg p.c]	78
Figure 30.	Pourcentage de protection du EMGS contre l'ulcère induit par l'éthanol chez le rat.	80
Figure 31.	Effet anti-inflammatoire du EMGS sur l'œdème induit par l'ovalbumine chez le rat	83

Liste des tableaux

Numéro	Titre	page
Tableau 01.	Différentes activités biologiques des polyphénols	19
Tableau 02.	Les amorces utilisées pour l'expression des gènes dans les cellules humaines THP-1	46
Tableau 03.	Résultats du criblage phytochimique réalisé sur <i>Gladiolus segetum</i>	52
Tableau 04.	Rendement, aspect et couleur de différents extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	52
Tableau 05.	Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	53
Tableau 06.	Résultats du dosage des flavonoïdes dans les différents extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	54
Tableau 07.	Inhibition du radical DPPH par les extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	55
Tableau 08.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test DPPH	55
Tableau 09.	Activité antioxydante ABTS des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	56
Tableau 10.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test ABTS	56
Tableau 11.	Activité des extraits du <i>Gladiolus segetum</i> sur les ions chélates	58
Tableau 12.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test de la chélation des ions métalliques	58
Tableau 13.	Activité de blanchissement du β-carotène par les extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	59
Tableau 14.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test de blanchissement du β-carotène	59
Tableau 15.	Inhibition du CUPRAC par les extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	60
Tableau 16.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test CUPRAC	60
Tableau 17.	Pouvoir réducteur des extraits du <i>Gladiolus segetum</i> testé par la méthode de FRAP	61
Tableau 18.	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC ₅₀ par le test FRAP	61
Tableau 19.	Activité anti-inflammatoire in vitro des extraits du <i>Gladiolus segetum</i>	65
Tableau 20.	Cytotoxicité des extraits du <i>Gladiolus segetum</i> contre l'Artémia Salina	69
Tableau 21.	Effet de l'extrait méthanolique du <i>Gladiolus segetum</i> sur les paramètres hématologiques chez le rat	77
Tableau 22.	Effet de l'extrait méthanolique du <i>Gladiolus segetum</i> sur les paramètres biochimiques chez le rat	77
Tableau 23.	Le poids relatif des organes des rats dans la toxicité aigüe	77
Tableau 24.	Activité anti-ulcéreuse de l'EMGS sur l'ulcère induit par l'éthanol chez le rat.	80
Tableau 25.	Activité anti-inflammatoire d'EMGS sur l'œdème induit par l'ovalbumine chez le rat.	82
Tableau 26.	Activité antipyrétique de l'EMGS sur la pyrexie induite par la levure de bière chez le rat.	85
Tableau 27.	Tolérance au glucose pour le groupe contrôle et les groupes traités par <i>Gladiolus segetum</i> .	86
Tableau 28.	Activité antidiabétique d'EMGS sur le diabète induit par l'alloxane chez le rat.	87

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Partie Bibliographique

CHAPITRE I : Généralités sur les plantes médicinales et la plante étudiée

I.1. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle	1
I.2. De la plante au médicament	2
I.3. Présentation de la famille des Iridacées	4
I.3.1. Distribution géographique	4
I.3.2. Distribution En Algérie	4
I.3.3. Utilisation de la plante <i>Gladiolus segetum</i> en médecine traditionnelle	5
I.3.4. Présentation du genre <i>Gladiolus</i>	6
I.3.4.1. Présentation du <i>Gladiolus segetum</i>	6
I.3.4.2. Description botanique du <i>Gladiolus segetum</i>	6
I.3.4.3. Principaux métabolites secondaires de la famille des iridacées (Genre <i>Gladiolus</i>)	7

CHAPITRE II : Métabolites secondaires

II.1. Définition	15
II.2. Biosynthèse des métabolites secondaires	15
II.3. Composés phénoliques	15
II.3.1 Définition	15
II.3.2. Flavonoïdes	16
II.3.2.1. Structures chimiques et classification	16
II.3.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques.....	18
II.3.4. Composés triterpéniques	20
II.3.4.1. Introduction	20
II.3.4.2. Intérêts des triterpènes	20
II.3.5. Saponines	21
II.3.5.1. Définition	21
II.3.5.2. Structure chimique des saponosides	21

II.3.5.3. Propriétés biologiques des saponosides	22
II.3.6. Les Anthraquinones	26
II.3.6.1. Généralités	26
II.3.6.2. Propriétés des anthraquinones	26

Partie expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

I.1. Matériel	30
I.1.1. Animaux	30
I.1.2. Matériel végétal	30
I.2. Macération et extraction	30
I.2.1. Préparation des extraits par Extraction Solide - Liquide (ESL).....	30
I.2.2. Détermination du rendement	32
I.3. Criblage phytochimique	32
I.3.1. Recherche des polyphénols	32
I.3.2. Recherche des flavonoïdes	32
I.3.3. Recherche des alcaloïdes	32
I.3.4. Recherche des Stéroïdes et Terpènes	33
I.3.5. Recherche des saponosides	33
I.3.6. Anthraquinones	33
I.4. Dosages des polyphénols	34
I.5. Dosage des flavonoïdes	34
I.6. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	34
I.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante	34
I.6.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH	34
I.6.1.2. Activité de la chélation des ions métalliques	35
I.6.1.3. Activité de blanchissement du β -carotène	35
I.6.1.4. Activité du piégeage de l'ABTS	35
I.6.1.5. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).36	
I.6.1.6. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	36
I.6.2. Activité antiinflammatoire <i>in vitro</i>	37
I.6.3. Activité antidiabétique <i>in vitro</i>	37
I.6.3.1. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase	37
I.6.3.2. Effet des extraits sur l'inhibition d'Alpha-glucosidase	38

I.6.4. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia	38
I.6.4.1. Description de l'activité de Cytotoxicité	38
I.6.4.2. Protocole	39
I.6.5. Evaluation de l'activité anticancéreuse.....	39
I.6.5.1. Culture cellulaire de THP-1	39
I.6.5.2. Test Alamar blue	40
I.6.5.3. Test WST-1	41
I.6.5.4. Test au bleu trypan	41
I.6.5.5. Exploration des gènes	41
I.6.5.5.1. Extraction d'ARN	41
I.6.5.5.2. La PCR quantitative (qPCR)....	42
I.6.5.5.3. La Rt-PCR	43
I.6.5.5.4. Gènes d'intérêts	44
I.6.5.6. Test d'apoptose caspase 3	46
I.7. Evaluation des activités biologiques <i>in vivo</i> de l'extrait méthanolique	
.....	47
I.7.1. Test de toxicité	47
I.7.1.1. Principe de l'essai	47
I.7.1.2. Autopsie générale	47
I.7.1.3. Hématologie et biochimie clinique	48
I.7.2. Etude de l'activité antiulcéreuse	48
I.7.2.1. Evaluation de l'activité antiulcéreuse	48
I.7.2.2. Détermination de l'indice d'ulcère	49
I.7.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	49
I.7.4. Evaluation de l'activité antipyrétique	50
I.7.5. Evaluation de l'activité antidiabétique	50
I.7.5.1. Test de tolérance orale au glucose	50
I.7.5.2. Induction du diabète expérimental	51
I.8. Etude statistique.....	51
CHAPITRE II : Résultats et Discussion	
II.1. Criblage phytochimique.....	52
II.2. Extraction, rendement et aspects des extraits	52
II.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	53

II.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes	53
II.5. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	54
II.5.1. Evaluation de l'activité antioxydante	54
II.5.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH	54
II.5.1.2. Activité du piégeage de l'ABTS	55
II.5.1.3. Activité de la chélation des ions métalliques	57
II.5.1.4. Activité de blanchissement du β -carotène	58
II.5.1.5. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	60
II.5.1.6. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	61
II.5.2. Activité antiinflammatoire <i>in vitro</i>	65
II.5.3. Activité antidiabétique <i>in vitro</i>	67
II.5.4. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia Salina	69
II.5.5. Evaluation de l'activité cancéreuse	70
II.5.5.1. Test Alamar bleu	70
II.5.5.2. Test WST-1	71
II.5.5.3. Test au bleu trypan	72
II.5.5.4. Exploration des voies de signalisation de la mort cellulaire.	73
II.6. Evaluation des activités biologiques <i>in vivo</i>	76
II.6.1. Test de toxicité aigüe	76
II.6.2. Evaluation de l'activité antiulcéreuse	79
II.6.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	82
II.6.4. Evaluation de l'activité activité Antipyrétique	84
II.6.4. Evaluation de l'activité diabétique	86
II.6.4.1. Test de tolérance orale au glucose	86
II.6.4.2. Effet antidiabétique aigüe	86

Conclusion générale et perspectives

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source importante de médicaments pour des milliers d'années de l'histoire humaine, et même aujourd'hui, elles constituent la base des pratiques systématiques de la médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles dans le monde entier (**Pan et al., 2009**). L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (**Gurib-fakim., 2006**). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (**Benkhniue., 2011**).

En Afrique, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique (**Koffi et al., 2009**).

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (**Merzoug., 2009**). L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie (**Konkon et al., 2006**).

Les vertus médicinales et thérapeutiques des plantes sont dues à leur richesse en métabolites secondaires dits principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Farag et al., 1989 ; Bulduk., 2004 ; Al-Gabbiesh., 2015**). Les recherches récentes sur les métabolites secondaires sont très poussées, particulièrement dans les domaines de la phytothérapie et de l'hygiène alimentaire, en raison de leurs diverses propriétés biologiques : antioxydant, antimicrobiennes, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires...etc. (**Leong et Shui., 2002**). En outre, ces métabolites peuvent avoir des effets physiologiques favorables dans la prévention des cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires (**Middleton et al., 2000 ; Raja et Sreenivasulu., 2015**).

Le genre *Gladiolus* appartenant à la famille des Iridacées, comporte 1750 espèces qui se propagent autour du bassin méditerranéen. Pour notre part, nous avons choisi comme plante d'étude l'espèce *Gladiolus Segetum* car elle possède, surtout, des qualités médicinales importantes utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies du système digestif (ulcère), l'infertilité et d'autres affections inflammatoires dans la région méditerranéenne (**Walter., 2002 ; Leister., 2000**).

Introduction générale

L'objectif de notre travail vise à faire une analyse qualitative (un screening phytochimique) et quantitative des métabolites secondaires existants dans la partie aérienne de cette plante afin d'évaluer les propriétés biologiques des extraits de la plante étudiée *in vivo* et *in vitro*.

Notre étude englobe trois parties :

La première partie est d'ordre bibliographique divisée en deux chapitres ; le premier est consacré à des données générales sur la plante *Gladiolus segetum*, le deuxième chapitre est réservé aux métabolites secondaires et leurs propriétés pharmacologiques.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail expérimental. Nous avons entamé cette partie par une préparation de différents extraits du *Gladiolus segetum*. Des tests phytochimiques préliminaires sont ensuite effectués sur les parties aériennes de cette plante et détermination quantitative des composés actifs dans les extraits de la plante étudiée. En application, les extraits du *Gladiolus segetum* sont testés pour une évaluation des activités pharmacobiologiques *in vitro* et *in vivo* :

Antioxydantes, cytotoxicité, anticancéreuse, toxicité aigüe, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique

La troisième partie est consacrée à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

Partie Bibliographique

I.1.Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

Les propriétés des plantes médicinales figurent dans de nombreux livres et permettent à chacun de choisir en connaissance la plante dont il a besoin. Le plus souvent, ces propriétés n'ont pas été découvertes par les recherches modernes, mais font partie d'un savoir ancien, accumulé pendant plusieurs millénaires. Dès son apparition, il y a 3 millions d'années seulement, l'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que de la nourriture. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être.

Le tout premier témoignage de l'utilisation des plantes médicinales figure sur un papyrus égyptien, daté d'environ 2 000 ans avant J.-C. Ainsi, en Inde et en Chine, la médecine faisait amplement appel aux herbes. Plus tard, la Grèce antique se distingue avec les 1ers thérapeutes, comme HIPPOCRATE. Ce médecin dispensa son enseignement sur l'île de Cos, il fut le 1er à mentionner des observations cliniques avec plus de 230 plantes. Puis les plantes furent classées par degré de toxicité, et THEOPHRASTE devint le botaniste le plus marquant de l'antiquité. Il nomma plus de 500 plantes et se livra à des expérimentations... Par la suite, DIOSCORIDE (herboriste grec) écrivit un recueil de plus de 500 plantes en 5 volumes. Cet ouvrage connu sous le nom de « *Materia Medica* », fut publié pour la première fois en 1478 par l'imprimeur de Venise Aldó Manuce. Il constitua la référence principale en Europe jusqu'au XVIIIe siècle, en rassemblant environ 600 plantes (genévrier, orme, pivoine, bardane, etc.). Une illustration est fournie avec le « *Juliania Anicia Codex* », qui présente des descriptions brèves de plantes, mais surtout des données concernant l'utilisation pratique de végétaux, le type d'indications et les médications. Au moyen âge, les écrits de GALIEN devinrent populaires. Beaucoup de ses 500 livres et manuscrits furent détruits par un incendie, mais quelque 80 œuvres furent sauvées des flammes. Aujourd'hui, GALIEN est considéré comme l'un des médecins les plus renommés de l'Antiquité après HIPPOCRATE. Il traitait les maladies essentiellement par les plantes médicinales, et ceux qui suivaient ses méthodes constituèrent une secte appelée les « Eclectiques » (Callery.,1998 ; Wichtl et Anton., 1999 ; Sofowora., 2010).

Partout dans le monde, les plantes médicinales furent utilisées : les MAYAS, AZTEQUES et INCAS utilisaient la salsepareille, le tabac et le poivre. Puis vint la période du commerce entre l'Europe, le Moyen-Orient, l'Inde et l'Asie... Le développement des explorations furent à l'origine de découvertes importantes.

En 1692, paraissait la première « Pharmacopée Royale Galénique et Chimique » rédigée par M. CHARAS, véritable recueil de préparations médicamenteuses. En 1778, le premier diplôme d'herboriste était décerné par la Faculté de Médecine de Paris. Le premier codex français parut en 1818 et les éditions se sont succédées jusqu'à la parution de la dernière édition de la pharmacopée européenne par **Wichtl et Anton (1999)**.

Aujourd'hui, des progrès immenses ont été réalisés par des pharmaciens et des chimistes qui ont étudié des plantes de notre environnement et d'autres plantes exotiques. Les secrets des remèdes d'autrefois commencent à être découverts. Prenons l'exemple du pavot, la morphine fut isolée par SERTÜRNER en 1817 et la papavérine par MERCK en 1848. Bien entendu, les structures chimiques complètes de ces composés furent élucidées bien plus tard.

L'usage des plantes médicinales totales tombe peu à peu en désuétude au profit du principe actif isolé. On pense ainsi obtenir une action plus nette, plus rapide, mieux ciblée. L'industrie chimique intervient en inventant par synthèse des dérivés toujours plus actifs mais aussi plus toxiques. Il faut attendre le XX^{ème} siècle pour que des médecins, désabusés par la toxicité de ces nouveaux remèdes, reviennent à l'usage des plantes entières, bien connues de la médecine populaire. Les travaux de l'école française de phytothérapie, avec, en tête le merveilleux Dr. Henri LECLERC, ont réactualisé l'emploi des plantes « naturelles » en médecine (**Scimeca et Tétau., 2005**). Cela exprime bien le désir des patients qui veulent être soignés efficacement par des méthodes non agressives, naturelles, épaulant les forces de la nature. La médecine par les plantes a un avenir admirable et de haut rang. Si elle ne peut tout soigner, elle peut soigner beaucoup (**Tétau., 2005**).

I.2. De la plante au médicament

Comment extraire ce que la plante peut nous apporter afin d'en faire un médicament ?

Les connaissances empiriques accumulées depuis des milliers d'années ont permis la sélection de plantes pour soigner diverses maladies. Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et/ou à la mise sur le marché de médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés. De la plante entière ou partie de plante utilisée au départ, on a ensuite utilisé des extraits totaux (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants) liquides ou secs pour faciliter la prise et standardiser les traitements.

Les recherches pharmacologiques et chimiques menées pour identifier les effets de ces extraits et en isoler les molécules actives ont mené à la préparation, souvent par les apothicaires de l'époque, de mélanges de constituants actifs, puis à la purification et à la détermination de structure des composés les plus actifs qui ont alors été commercialisés sous forme purifiée (**Quetin-Leclercq., 2002**). Ces molécules naturelles ont ensuite servi de modèles pour la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouveaux médicaments plus spécifiques, plus actifs, présentant moins d'effets secondaires ou plus facilement brevetables.

Parmi les médicaments les plus utiles en médecine et qui ont été isolés récemment de plantes, on se doit de citer le paclitaxel (taxol), un antitumoral isolé de l'écorce de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*), ainsi que l'artémisinine, un antipaludique isolé d'une plante chinoise (*Artemisia annua*) (**Graham et Depovere., 2002**).

De la molécule au médicament, les étapes sont nombreuses, les risques d'échec augmentent au fur et à mesure que l'on approche des derniers tests cliniques : à partir du principe actif qui constitue la découverte et qui pourra être breveté (durée de validité du brevet : 20 ans), des premiers tests d'affinité, de sélectivité et de toxicité, de la mise au point d'une synthèse industrielle efficace et reproductible aux tests précliniques puis cliniques, il se passera 10 à 15 ans. L'investissement nécessaire varie de 500 millions à 1 milliard d'euros, avec une probabilité d'échec proche de 95 à 99% (**Albericio., 2010**). Ces difficultés techniques peuvent être surmontées par la mise en place de méthodes adaptées et de nouvelles stratégies de recherche (**Koehn et Carter., 2005**). Parmi ces stratégies, se trouvent en particulier les « criblages intelligents », par exemple en utilisant des cibles résistantes aux antibiotiques connus (**Baltz., 2008**), l'intervention de la robotique par couplage des techniques de séparation par HPLC, d'analyse par spectrométrie de masse ou RMN et de criblage haut-débit (**Shapiro et Gounarides., 1999 ; Isbell et al., 2002 ; Corcoran et Spraul., 2003; Kingston., 2011**), la métabolomique (**Verpoorte et al., 2007**) ou le développement d'outils biologiques comme la métagénomique, qui étudie les gènes et leur fonction dans des échantillons provenant directement de l'environnement, en particulier dans le cas de l'étude des micro-organismes du sol. Cette approche couplée à des techniques de criblage automatisé, permettrait de tester pour une activité biologique de nombreux micro-organismes non encore étudiés (**Handelsman et al., 1998 ; Mocali et Benedetti., 2010**). Ce type d'outils et de stratégies permettent ainsi à la chimie des substances naturelles de s'inscrire clairement dans le cadre des sciences de pointe, ouvertes vers l'avenir.

I.3.Présentation de la famille des Iridacées

La famille des Iridacées est une famille de plantes monocotylédones. Elle comprend environ 1750 espèces réparties en 78 (Walter., 2002). Sont des plantes herbacées, rhizomateuses, à cornes, bulbeuses ou à racines épaissies des régions tempérées à tropicales. Les iridacées sont rarement dépourvues de chlorophylle ; constituées de styloïdes (grands cristaux prismatiques) d'oxalate de calcium présents dans les gaines de faisceaux conducteurs. Sont très riches en tannins et/ou de terpenoïdes variés. Les différentes espèces qui composent cette famille sont constituées de feuilles alternes, distiques, généralement équitantes (perpendiculaires à la tige), et à limbe unifacial, caulinaires ou basilaires, simples, entières, à nervation parallèle, en gaine à la base ; en général les stipules sont absentes. Les inflorescences sont bien déterminées, se présentent en cyme scorpenidé souvent modifiée, parfois réduites à une fleur solitaire terminale. La famille est actuellement divisée en quatre sous-familles : Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridioideae, Ixi oideae. La sous famille Isophysidoideae contient le seul genre *Isophysis*, de la Tasmanie. La sous famille Nivenioideae contient six genres d'Afrique du Sud, l'Australie et Madagascar : *Klattia*, *Nivenia* et *Witsenia* ainsi que la seule saprophyte (*Geosiris*). Les sous famille Iridioideae et Ixi oideae contiennent la majorité des genres Iridaceae entre autres les genres *Iris*, *Moraea*, *Bobartia*, *Dietes*, *Ferraria*. *Ixia*, *Gladiolus*, *Crocus*, *Freesia* et *Watsonia* qui se propagent autour du bassin méditerranéen (Walter.,2002), (Leister., 2000).

I.3.1. Distribution géographique

C'est une famille cosmopolite mais qui manque dans les régions froides et le nord de l'Eurasie. Elle se propage dans les régions tropicales, le Madagascar l'Afrique centrale, l'Afrique du sud, l'Afrique de l'est, le bassin méditerranéen, l'Eurasie, l'Amérique centrale.

I.3.2. Distribution En Algérie

On rencontre les espèces suivantes : l'*Iris planifolia*, 'Kikout' en arabe ; floraison octobre-février. Assez commun dans le Tell jusqu'en haute montagne ; plutôt rare sur les Hauts Plateaux. Pousse dans les rocailles, pâturages, clairières des forêts.

L'*Iris unguicularis*, 'Kenouet el Oucif' ; floraison décembre-avril. Commun dans le Tell algéro-constantinois jusqu'à environ 1600 m d'altitude, pousse dans la broussaille, les rocailles et la garrigue.

Le *Romulea bulbocodium*, 'Zhitout' ; floraison janvier-avril. Commun dans le Tell surtout en basse montagne, se propage dans les pâturages, rocailles, terrains sablonneux.

L'Iris *Sisyrinchium*, 'Cheraïq' ; floraison février-mai. Commun dans le Tell et sur les hauts plateaux, pousse dans les paturages sablonneux ou rocaillieux, talus, bord des chemins.

Le *Gladiolus segetum*, « Sif er rorab en arabe, thagastourth en chaoui ». ; floraison février-mai. Commun dans le Tell et sur les Hauts Plateaux, se propage dans les champs de cultures et champs de blé. L'*Iris pseudoacorus*, 'Souçane el asfeur' ; floraison mai-juin. Assez commun dans le Tell, se propage au bord des eaux et les marais (**Beniston.,1984**).

- **Principaux genres** : *Gladiolus* (255spp), *Iris* (250), *Moraea* (125), *Sisyrinchium* (100), *Romulea* (90), *Crocus* (80), *Geissorhiza* (80), *Babiana* (65) et *Hesperantha* (65).

I.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

- ***Gladiolus dalenii*** : utilisé en Afrique du sud (Venda), *exploitation du bulbe* pour le traitement des blessures sous forme de poudre, en macération pour instillation oculaire et auriculaire. En Afrique de l'est (Mozambique) pour le traitement de la diarrhée, de la dysenterie et du choléra. Au Madagasca sous forme de pommade pour le traitement des abcès. En Afrique du sud (zones Zulu, Xhosa et Sotho) pour le traitement des maux de tête et lumbago. En Afrique centrale (Burundi occidental) l'exploitation des tiges en macération dans l'eau par voie orale, des tiges en décoction pour lavement. En Afrique centrale (République Démocratique du Congo (ex. Zaïre) (Rusizi, Kivu) en médecine vétérinaire, pour traitement de la stérilité, tubercule épluché, mixture dans le vagin. Pour le traitement du rhume, tubercule pilé, jus, en instillation nasale. (**Yineger et al., 2008; Arnold et Gulumian, 1984**).
- ***Gladiolus psittacinus*** : utilisé en Afrique centrale (Rwanda) pour le traitement de la toux, consommation du bulbe écrasé par voie orale.
- ***Sisyrinchium angustifolium*** : utilisé en Amérique du nord pour le traitement de la constipation et l'ulcère gastrique en infusion dans l'eau des racines et des feuilles.
- ***Crocus sativus* L** : Utilisé contre la scarlatine, la variole, les rhumes, l'insomnie, la dépression, l'asthme et les tumeurs, le paludisme, rhumatismes arthritiques et les maladies de la peau.
- ***Iris domestica* (L.) (*Belamcanda chinensis* L.)** : Utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise (séché) dans le traitement de la laryngite aiguë, angine aiguë, oedème de la glotte, la toux, le paludisme, et l'empoisonnement de la flèche.
- ***Gladiolus segetum*** : utilisé en Afrique du nord (sud-est de l'Algérie) pour le traitement de l'ulcère gastrique et la stérilité.

I.3.4. Présentation du genre *Gladiolus*

Le genre *Gladiolus* compte plus de 250 espèces. Ce sont des plantes vivaces à cormes qui sont maintenant largement utilisées comme plantes ornementales en massifs ou pour la production de fleurs coupées. La plupart des espèces sont originaires d'Afrique du Sud, mais on trouve aussi certaines espèces à l'état sauvage en Eurasie autour du bassin méditerranéen et en Afrique de l'Est. On compte environ 10 espèces en Eurasie contre 150 en Afrique du Sud et 76 en Afrique tropicale.

Gladiolus qui signifie « petit glaive » en latin fait référence à la forme des feuilles. Ces dernières sont surmontées par une inflorescence en épi. Suivant les espèces la taille de la plante est variable. On peut rencontrer les espèces suivantes :

Gladiolus borneti ; *Gladiolus communis* ; *Gladiolus dubius* ; *Gladiolus glaucus* ; *Gladiolus illyricus* ; *Gladiolus imbricatus* ; *Gladiolus segetum* ; *Gladiolus palustris* (**Beniston., 1984**), (**Bonnier., 1911**)

I.3.4.1. Présentation du *Gladiolus segetum*

Gladiolus segetum connu sous le nom de *Gladiolus italicus* (glaïeul d'Italie ou glaïeul des moissons) est une plante vivace, angiosperme monocotylédone appartenant à l'ordre des Asparagales ou des liliales suivant la classification, à la famille des iridacées (Iridaceae) et au genre glaïeul (*Gladiolus*) (**Beniston., 1984**), (**Bonnier., 1911**).

Règne : Plantae

Phylum : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Ordre : Asparagales

Famille : Iridaceae

Genre : *Gladiolus*

Espece : *Gladiolus segetum*

I.3.4.2. Description botanique du *Gladiolus segetum*

- Hauteur : 40 à 80 cm.
- Tige dressée, robuste, avec 3 à 5 feuilles.
- Feuilles longuement atténuées en pointe aiguë au sommet et disposées sur 2 rangs.
- Fleurs pourpres ou roses au nombre de 5 à 10, disposées en grappe lâche. Chaque fleur est munie de 2 bractées inégales, de 6 divisions dressées inégales et presque disposées

en 2 lèvres soudées en tube court à la base. Anthères plus longues que les filets. Stigmates étroits, régulièrement rétrécis jusqu'à la base.

- Fruits : capsules obovales, membraneuses à 3 angles arrondis, presque globuleuses. Graines non ailées.
- Plante vivace munie d'un bulbe solide, se propageant par de nombreuses bulbilles issues de ce dernier dont l'enveloppe présente des fibres dans le haut en un réseau à mailles ovales.
- Habitat : Bord des chemins, cultures.

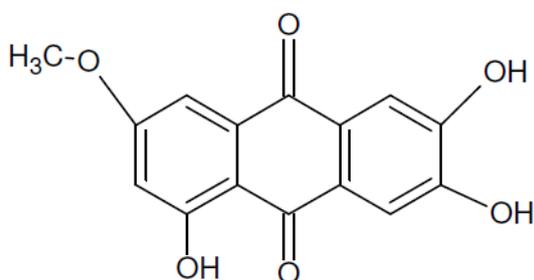


Figure 1. La plante *Gladiolus segetum* (Batna, mai 2015)

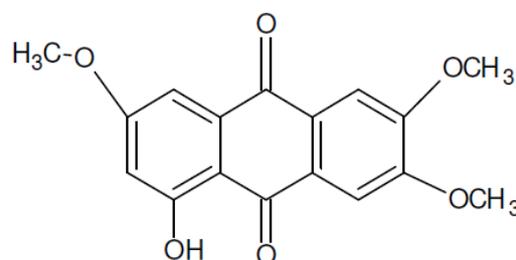
I.3.4.3. Principaux métabolites secondaires de la famille des iridacées (Genre *Gladiolus*)

La famille des iridacées a fait l'objet de fructueuses recherches suite aux différentes applications en médecine traditionnelle des différentes espèces.

- **Ding-yong wang et al.** ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du *Gladiolus gandavensis* des anthraquinones (**Ding., 2003**).



1, 6,7-trihydroxy-3-methoxyanthraquinone (1)



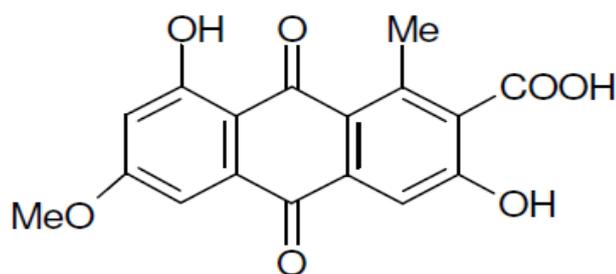
1-methoxy-3,6,7-methyl-anthraquinone (1a)

- **Dieudonne Ngamga et al.** ont isolé à partir de l'extrait chloroformique du *Gladiolus psittacinus* des anthraquinones qui sont (**Dieudonne., 2007**).

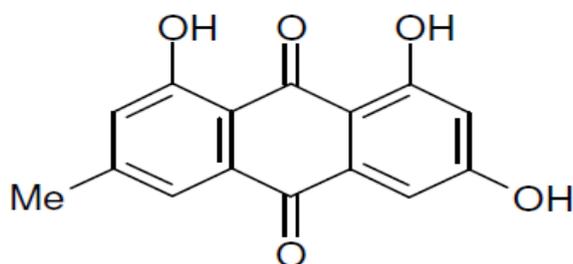
1, 6,7-trihydroxy-3-methoxy-8-methyl-anthraquinone (1)

1-hydroxy-3, 6,7-trimethoxy-8-methyl-anthraquinone (2)

- **Ali et al.** ont isolé à partir de l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* les anthraquinones suivantes (**Ali., 1989**).

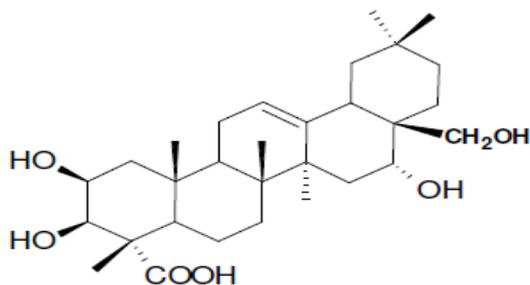


3,8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylantraquinone-2-acide carboxylique

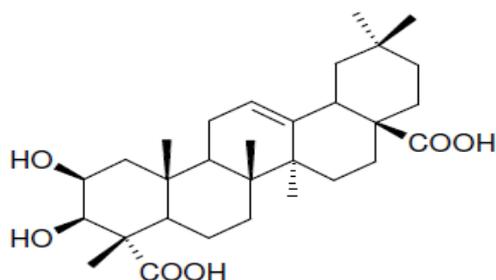


1, 3, 8-trihydroxy-6- methylantraquinone

- **El-Shanawany et al** ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du *Gladiolus segetum*, un triterpène pentacyclique ainsi que l'acide médicagenique (**El-Shanawany, 2009**).



2 β , 3 β , 16 α , 28-tetrahydroxy-olean-12-ene-23-acide carboxylique

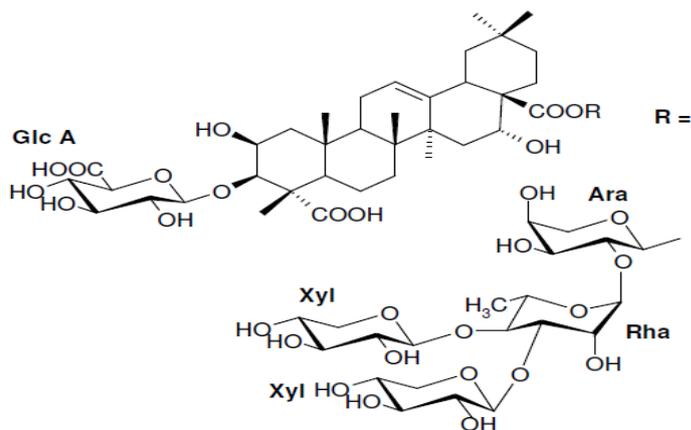


Acide médicagénique

- L'étude phytochimique de Abdessmed portée sur les feuilles, tiges et fleurs (parties aériennes) du *Gladiolus segetum* a permis d'isoler 20 composés dont 5 sont de structures nouvelles (Abdessemed et *al.*,2011 ; Abdessemed et Dibi.,2013) :

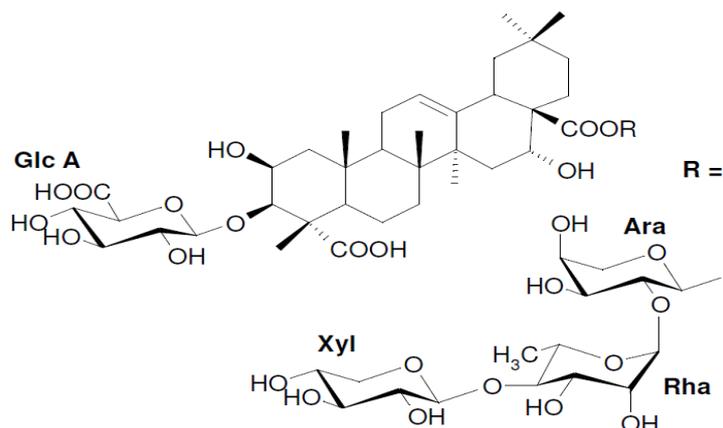
➤ **Saponines :**

Saponine 1 :



16 α hydroxy, 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl acide medicagenique -28-*O*- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)-[β -D- xylopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside

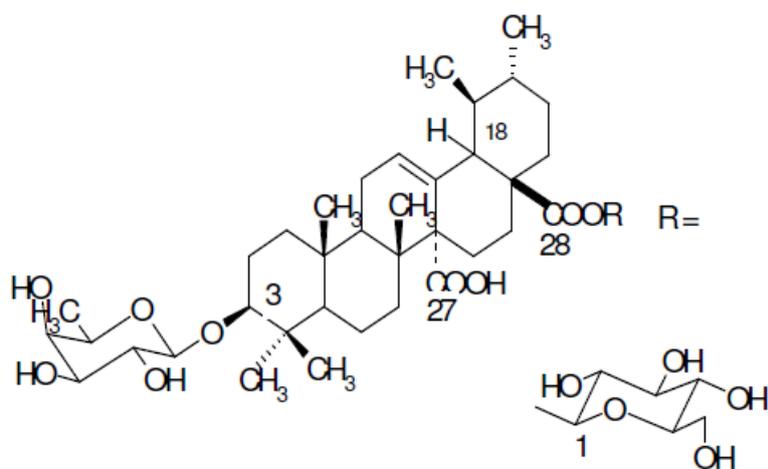
Saponine 2 :



16 α hydroxy, 3-O- β -D-glucuronopyranosyl acide medicagenique -28-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 4) – α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside

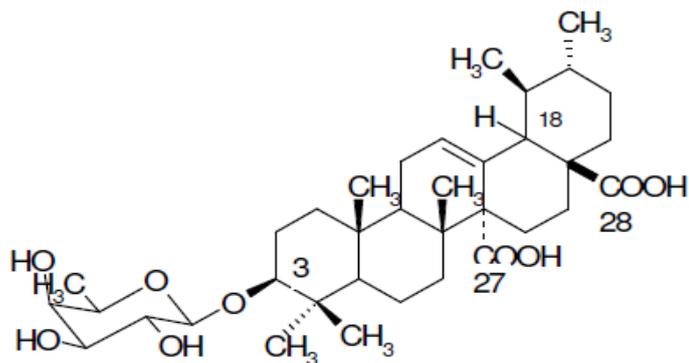
Les saponines 3 et 4 isolés possèdent la même génine, l'acide quinovique.

Saponine 3 :



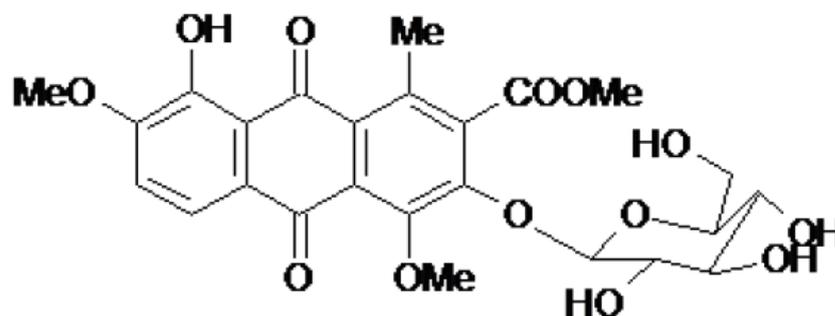
acide quinovique 3-O- β -D-fucopyranosyl (28 \rightarrow 1) β -D-glucopyranosyl ester

Saponine 4 :

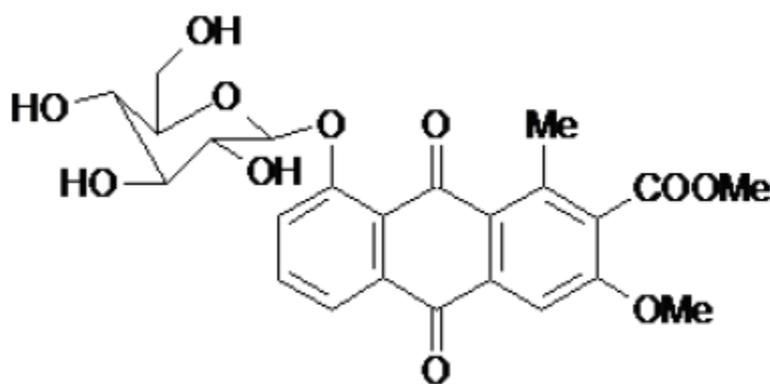
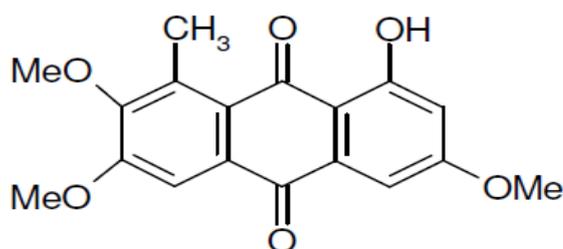


acide quinovique 3-O- β -fucopyranoside

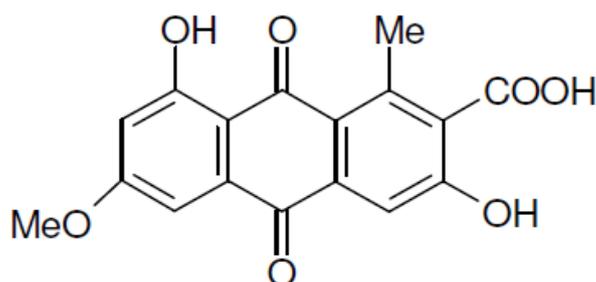
➤ Anthraquinones :



Methyl 8-hydroxy-4,7-dimethoxy-1-methyl-9,10-dioxo-3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate

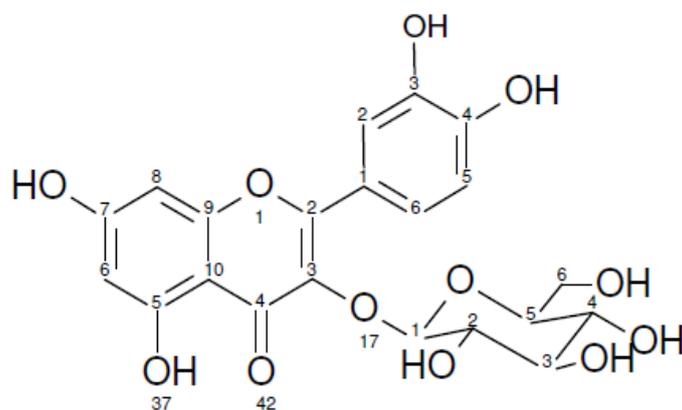
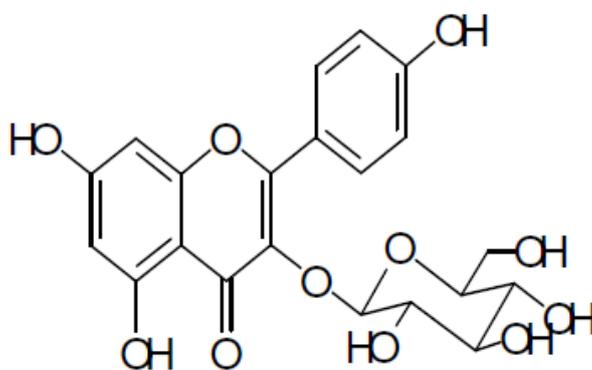
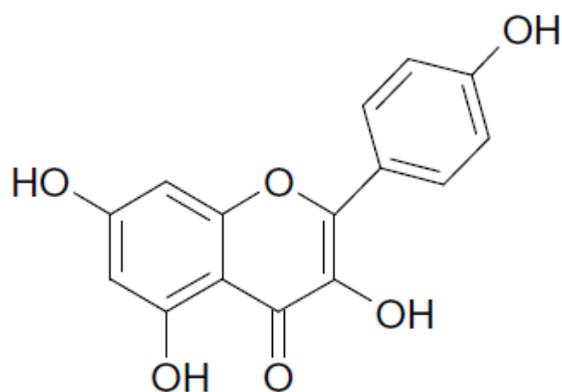
Methyl 3-methoxy-1-methyl-9,10-dioxo-8-(β -D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate.

1-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-8-methylanthraquinone



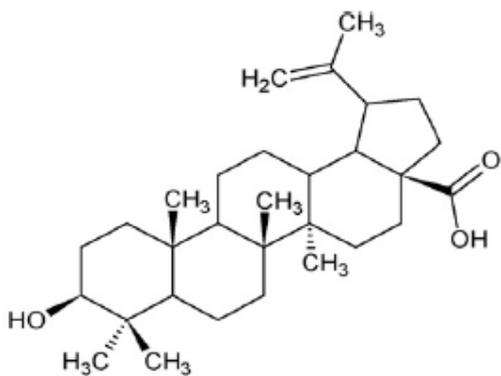
3,8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylanthraquinone-2-carboxylic acid

➤ Flavonoïdes :

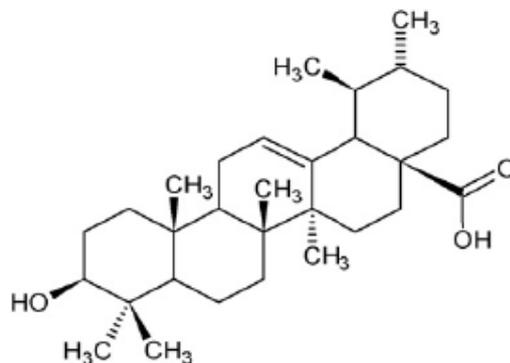
Isoquercitrin (3-O- β -glucosylquercétol)astragaloside (3-O- β -glucosylkaempférol)

Kaempférol

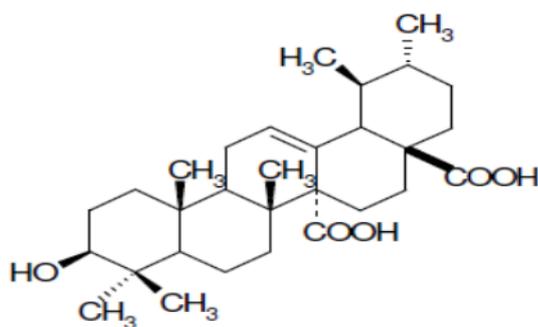
➤ **Triterpènes :**



Acide bétulinique

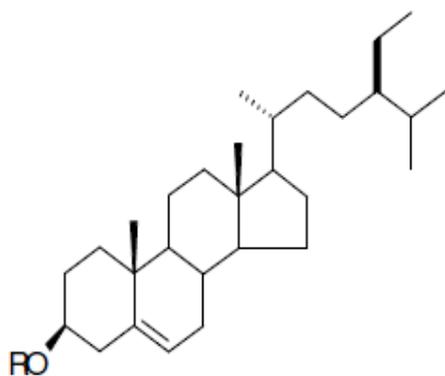


Acide ursolique

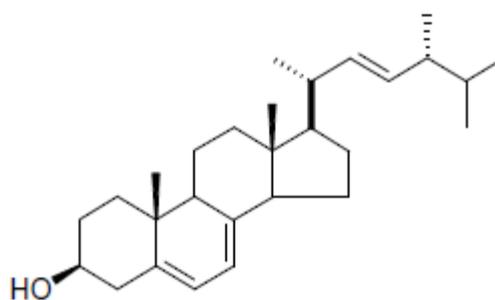


Acide quinique

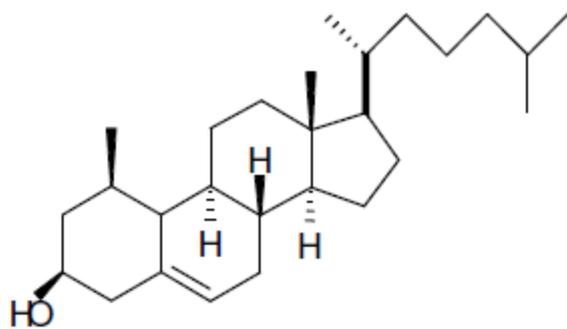
➤ **Phytostérols :**



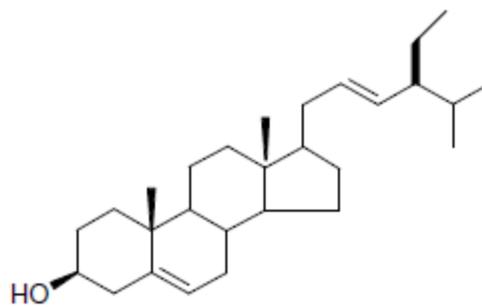
R=H β -sitostérol
R= glucose, daucostérol



Ergostérol

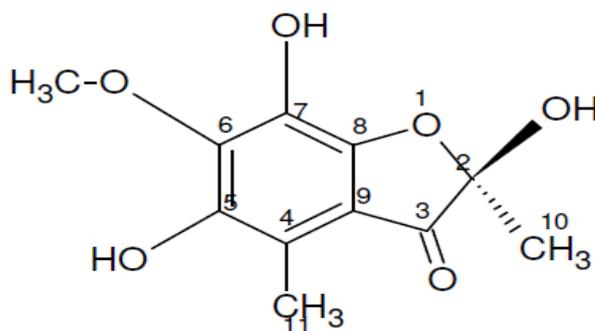


Cholestérol



Stigmastérol

➤ Dérivé benzofuranique :



(R) 2, 5, 7-trihydroxy-2, 4-dimethyl-6-methoxy-1- benzofuran-3-one

II. Métabolites secondaires

II.1. Définition

Les composés organiques des plantes sont divisés en deux catégories : la première, représente les composés qui existent dans toutes les cellules et jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction des cellules incluant les acides nucléiques, les acides aminés, les oses, et les lipides et connues sous le nom de métabolites primaires. La deuxième catégorie, sont les métabolites secondaires, qui n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard., 1996 ; Hanson., 2003**).

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (**Epifano et al., 2007.**)

II.2. Biosynthèse des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate (**VERPOORTE et ALFERMANN, 2000**). La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse (pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl-CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (**Mayer., 2004**).

Du point de vue synthétique, ces métabolites secondaires peuvent aussi être subdivisés en deux catégories : ils peuvent être de type phyto anticipines ou de constitution, C'est-à-dire synthétisés par la plante de manière permanente même en absence d'un facteur de stress par opposition aux métabolites induits ou phytoalexines qui sont synthétisés uniquement en cas de stress et sont donc formés de novo (**Litvak et Monson, 1998**).

II.3. Composés phénoliques

II.3.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille. Le terme « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de molécules divisé

en une dizaine de classes chimiques, selon le nombre d'unités phénoliques présentes. Elles présentent un point commun : la présence dans leur structure d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Bruneton.,1999**).

Ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones (**Stalikas.,2007**). Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

II.3.2. Flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes, et à ce jour, plus de 6500 structures naturelles ont été isolées et caractérisées, répartie en 12 squelettes de base. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C15 caractérisée par un enchaînement C6-C3-C6 (1,3-diphénylpropane) ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (**Figure 02**) (**De Rijke et al., 2007**).

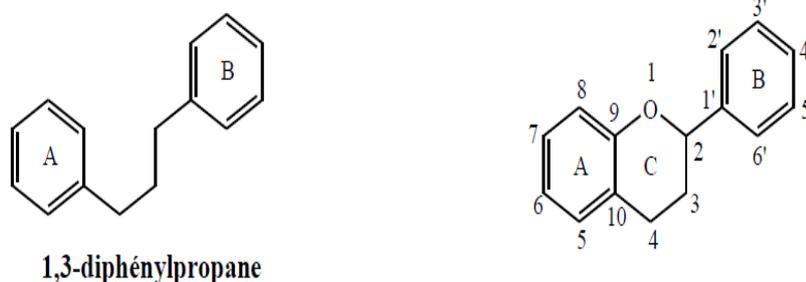


Figure 02. Structures de base des flavonoïdes

II.3.2.1. Structures chimiques et classification

Les flavonoïdes se répartissent en : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavyliumes, chalcones, aures, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes,... etc. (**Figure 03 ;04**).

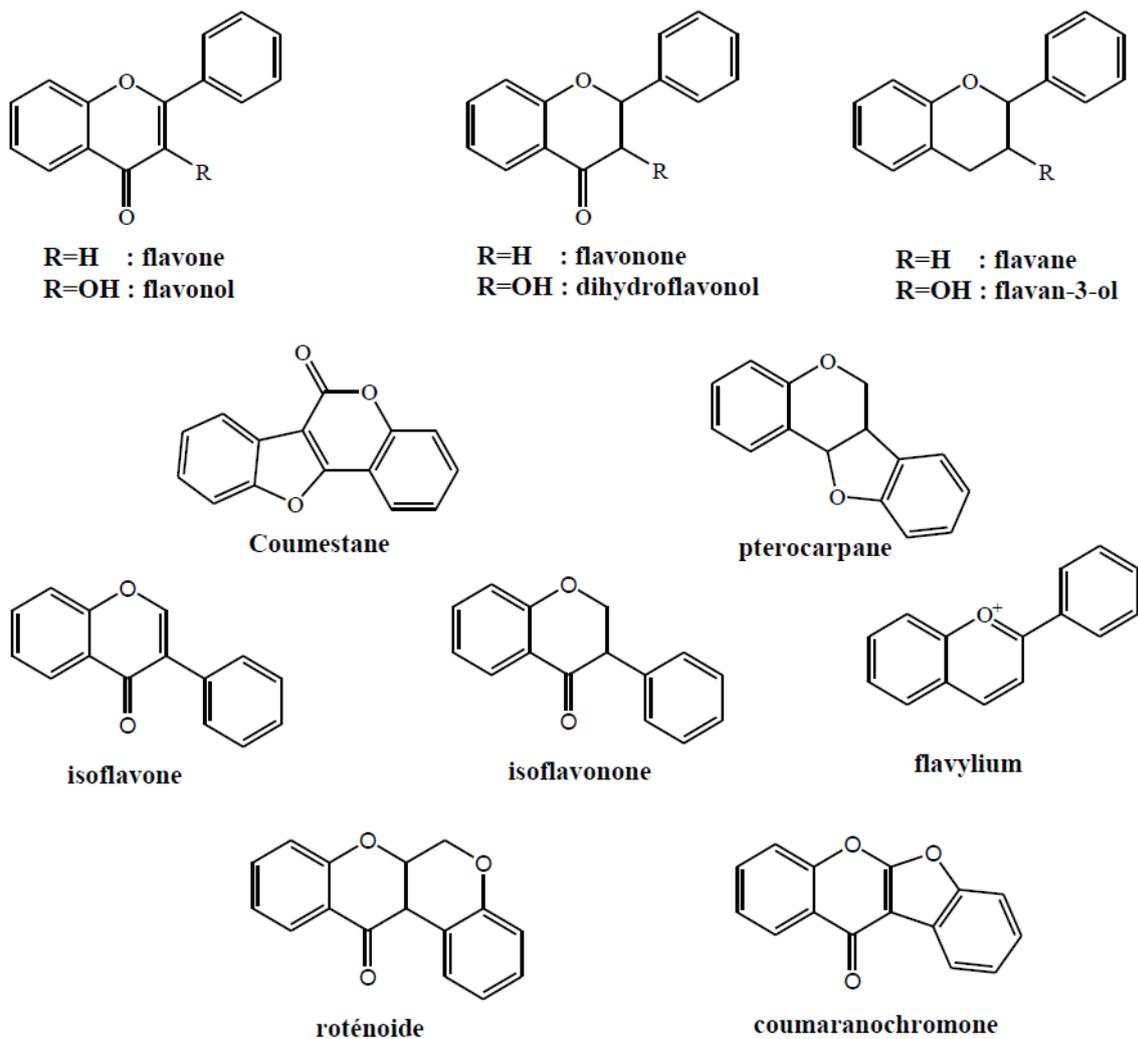
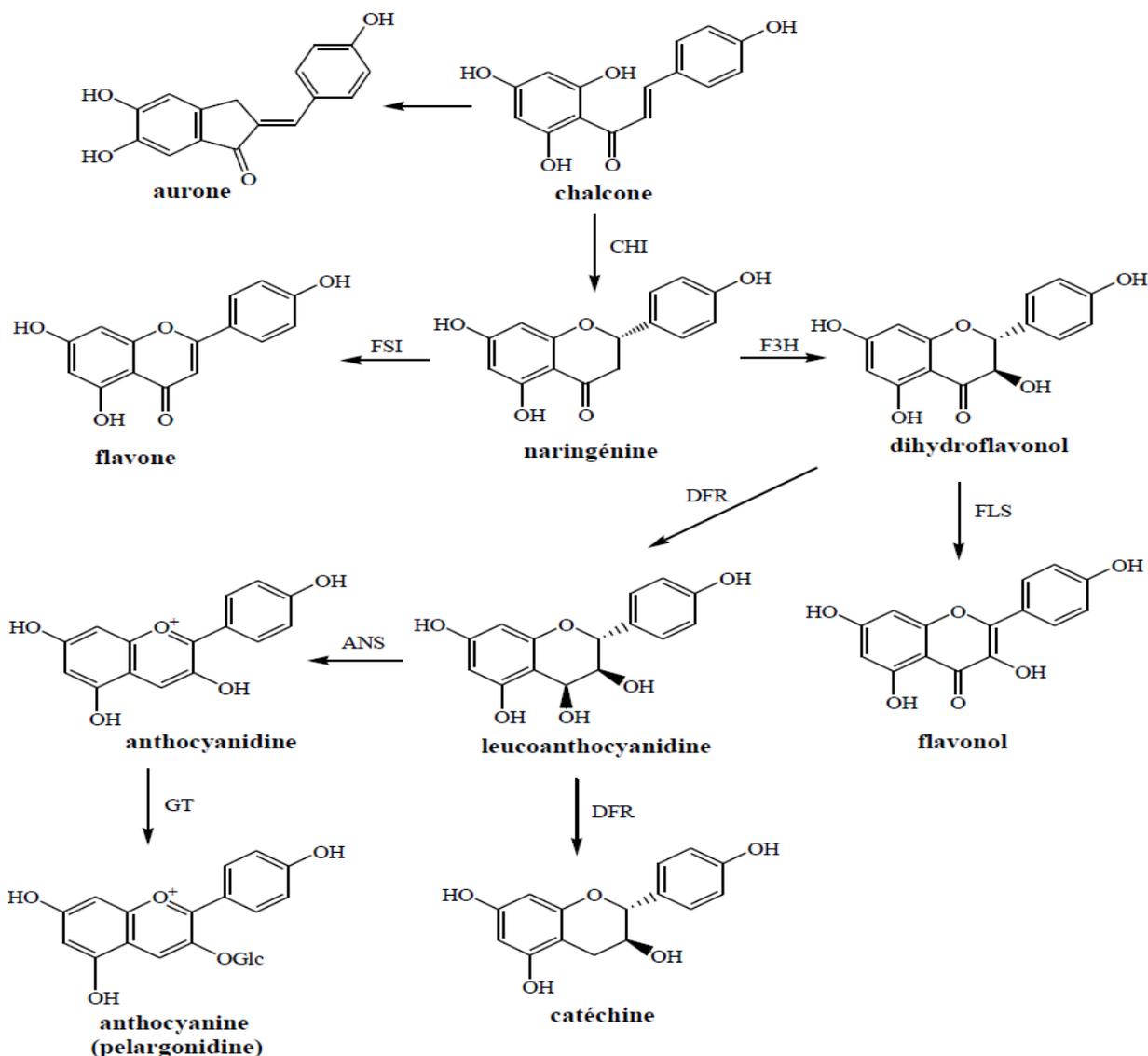


Figure 03. Structures des différents squelettes des flavonoïdes



II.3.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses. Plusieurs études ont été réalisées sur l'impact de la consommation de végétaux sur la santé. La plupart d'entre elles ont mis en évidence une baisse du facteur de risque pour de nombreuses affections telles que l'infarctus et le cancer (Fiuza *et al.*,2004 ; Kawaii *et al.*,2004 ; Sumner *et al.*,2005).

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains nombres de fonctions telles que :

- La physiologie de la plante (lignification et contrôle de la croissance).
- Les interactions plantes-microorganismes (avec les bactéries, les champignons, les insectes et résistance aux UV).
- La pigmentation des fleurs, des fruits et des graines. De ce fait, ils jouent un rôle important dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines.
- La fertilité des plantes et la germination du pollen (**Fleuriet et al.,2005**).

Les composés phénoliques font partie d'un groupe de métabolites secondaires possédant nombreuses propriétés thérapeutiques. Ils sont exploités en phytothérapie à cause de leur rôle dans la protection contre certaines maladies (**Fleuriet et al.,2005**).

On attribue aux flavonoïdes, spécifiquement, des propriétés variées telles que leur rôle dans la pigmentation des végétaux, leur actions anti-radicalaires et anti-oxydantes.

Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans **le tableau 01**.

Tableau 01. Différentes activités biologiques des polyphénols

Polyphénols	Activités biologiques
Acides phénoliques	anti-ulcéreuses (De Barros et al.,2008)
Coumarines	anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiparasitaires, antitumorales et analgésiques (Ito et al.,2005 ; Win et al.,2008 ; Melagraki et al.,2009 ; Kalkhambar et al.,2007 ; Smyth et al.,2009 ; Iranshahi et al.,2007)
Flavonoïdes	antitumorales, antiparasitaires, antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène et anti-oxydantes (Rao et al.,2009 ; Maurya et al.,2009 ; Shon et al.,2004 ; Ko et al.,2000 ; Hirata et al.,2009 ; Ganapaty et al.,2008 ; Portet et al.,2007 ; Gurbuz et al.,2009 ; Sannomiya et al.,2005 ; Sutradhar et al.,2008 ; Choi et al.,2009)
Tannins	anti-oxydantes et antiparasitaires (Okamura et al.,1993 ; Kubata et al.,2005)
Lignanes	anti-inflammatoires, analgésiques et antiparasitaires (Küpeli et al.,2003 ; Kim et al.,2009 ; Borsato et al.,2000 ; Martins et al.,2003 ; Felipe et al 2008 ; Filho et al.,2008 ; Barata et al.,2000 ;

II.3.4. Composés triterpéniques

II.3.4.1. Introduction

Les triterpénoïdes sont une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C30, ce groupe est très répandu dans le règne végétal et animal. Ces composés sont issus de la cyclisation de l'époxysqualène et quelque fois du squalène (**Bruneton.,1999 ;Dey et Harborne.,1991 ; Manitto.,1981**).

Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3 étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. On dénombre plus de 4000 triterpènes, dérivés de plus de 40 types de squelettes, isolés des sources végétales.

II.3.4.2. Intérêts des triterpènes

Les nombreuses activités biologiques des triterpènes en font un groupe de produits naturels de première importance. Ils sont responsables d'une multitude d'activités biologiques : cytostatique, antivirale, insecticide, anti-inflammatoire, molluscicide et analgésique (**Bruneton.,1999**).

A titre d'exemple :

- Le lupéol est reconnu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires (**Fernandez et al.,2011**).
- Le bétulinol a des propriétés médicinales très diversifiées (anti-inflammatoire, antiphlogistique). Il est utilisé aussi en cosmétique et comme émulsifiant (**Patocka.,2003**).
- L' α et β -amyrines, possèdent des activités anti-inflammatoire et analgésiante (**Susunaga et al.,2001**).
- L'acide boswellique est reconnu pour son activité inhibitrice de la biosynthèse des leucotriènes et de la 5-lipoxygénase (**Sharma et al.,2009**).
- L'uvaol, erythrodiol, acide maslinique et l'acide oléanolique isolés de l'huile d'olive appelée « orujo » ; sont décrits pour la prévention contre le stress oxydatif et sont connus comme inhibiteurs de la pro-inflammation des cytokines dans les macrophages des murines péritonéales (**Marques-Martin et al.,2006**).
- L'acide ursolique réputé pour ses effets anticancéreux, anti-inflammatoire et anti-allergique et cardioprotectif. Une étude récente a montré que l'administration de l'acide

ursolique chez des souris diabétiques diminue significativement le taux de glucose dans le sang (**Jang et al.,2009**).

- L'acide bétulinique est reconnu pour son action anti-inflammatoire (**Safayhi et Sailer.,1997**) mais l'activité antitumorale est l'une de ses propriétés biologiques les plus intéressantes (**Fulda et al.,1997 ; Schmidt et al.,1997 ; Zucoet et al.,2002**).
- Le celastrol, un triterpène pentacyclique polyinsaturé isolé d'une plante chinoise utilisée en médecine traditionnelle *Tripterygium wilfordii* (famille Celastraceae) est connu pour ses activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et antitumorale. Il est utilisé pour traiter les maladies neurodégénératives comme la maladie d'alzheimer (**Zhang et al.,2012**).
- Le β -sitostérol appartient à la famille des stérols végétaux ou phytostérols, composés naturels présents dans toutes les plantes. Le β -sitostérol est comparable au cholestérol. Il peut aider à réduire le taux de cholestérol en limitant la quantité de cholestérol qui peut entrer dans le corps (**Wong.,2001**). Le β -sitostérol est également reconnu pour son activité anti-inflammatoire (**Nirmal et al.,2012**).
- Et finalement l'acide arjunolique et l'acide asiatique, deux triterpènes isolés de l'espèce *Syzygium guineense* (Myrtaceae) ont montré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei* (**Djoukeng et al.,2005**).

II.3.5. Saponines

II.3.5.1. Définition

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires, abondamment trouvés dans certaines familles du règne végétal (**Sparg et al.,2004**). Leur nom provient du latin *sapo* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau (**Dewick.,2002**). Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, qui se composent d'une partie lipophile l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

II.3.5.2. Structure chimique des saponosides

Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique ou triterpénique (**Bruneton J. 1999**).

II.3.5.2.1. Saponosides à génines stéroïdiques

Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau furostane et spirostane (**Figure 05**). Ces saponosides ont généralement un hydroxyle en position 3. Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique.

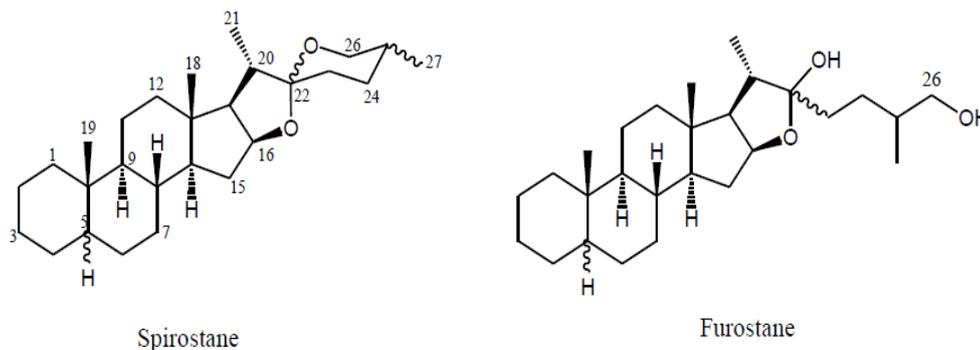


Figure 04. Principaux squelettes stéroïdiques

II.3.5.2.2. Saponosides à génines triterpéniques

Ils constituent la majorité des sapogénines des angiospermes dicotylédones ((**Sparg et al.,2004**) et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles (**Figure 06**). Ce sont des dérivés du noyau oléane, ursane, lupane, friedelane, hopane (pentacycle), ou parfois du noyau dammarane, cucurbitane, lanostane et cycloartane (tétracycle).

II.3.5.3. 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 (**Francis et al.,2002**). En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que :

II.3.5.3.1. Hémostatique

Depuis longtemps, les saponines sont réputées pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes) (**Seeman et al.,1973 ; Vincken et al.,2007**).

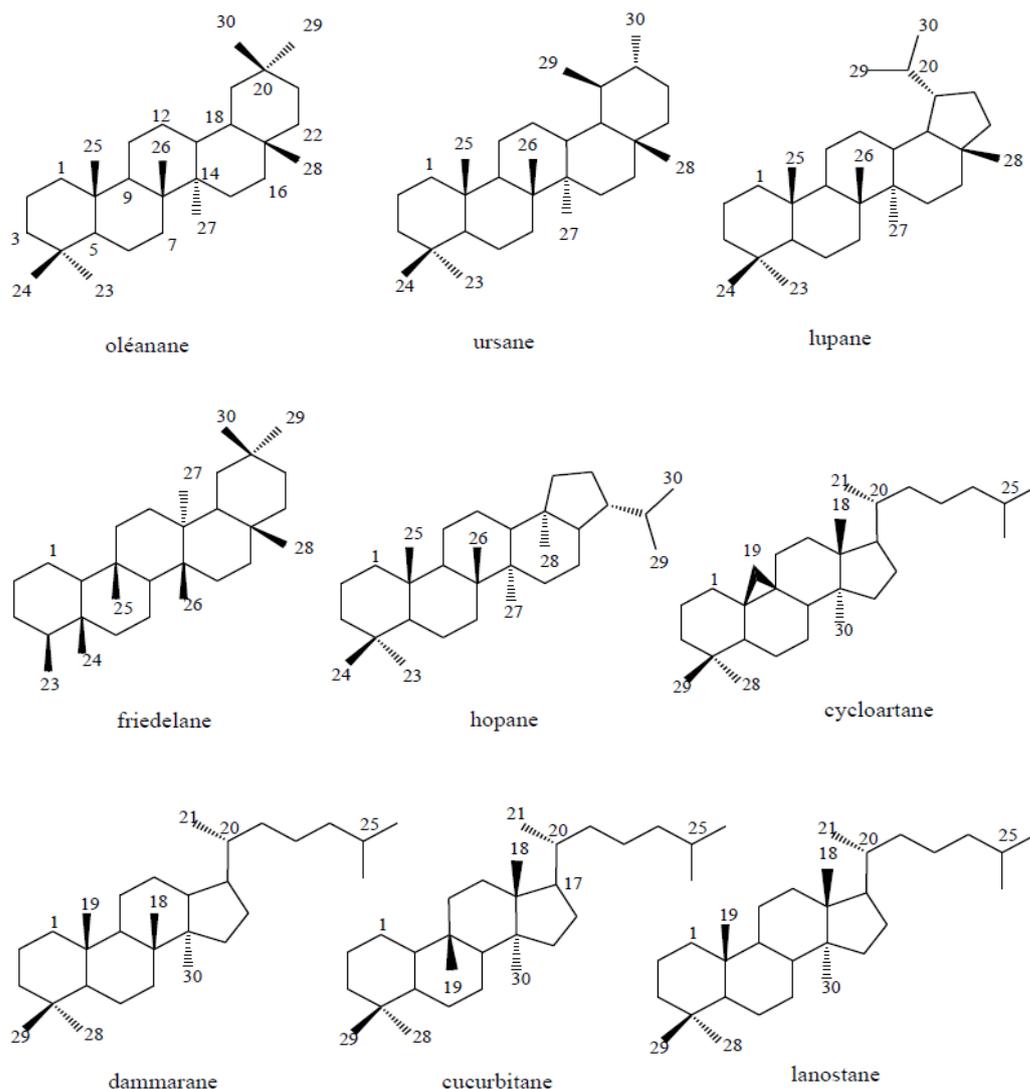


Figure 05. Principaux squelettes triterpéniques

II.3.5.3.2. Molluscicide

Depuis quelques années cette activité retient l'attention de plusieurs chercheurs vu son importance dans le domaine de l'agriculture. Les saponines triterpénoïdes à squelette hédéragénine isolées de *Sapindus mukorossi* Gaertn (Sapindaceae) ont des effets molluscicides contre l'escargot du pommier (*Pomacea canaliculata*) qui est devenu l'un des principaux parasites du riz et d'autres récoltes aquatiques (Huang et al.,2003).

II.3.5.3.3. Anti-inflammatoire

Plusieurs saponines sont reconnues pour leurs effets anti-inflammatoires. Les balanines (balanitine-1 B1, balanitine-2 B2) isolées des écorces de tronc de *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Zygophyllaceae) sont des exemples de saponines stéroïdiques à propriétés anti-inflammatoires et antalgiques (Speroni et al.,2009).

La frutesaponine B, saponine bidesmosidique, isolée de *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae), possède une activité anti-inflammatoire très significative (**Just et al.,1998**).

II.3.5.3.4. Antibactérienne et antiparasitaire

Un bon nombre de saponosides assurent la défense des végétaux contre l'attaque microbienne, il a été démontré que les trois saponines isolées de *Hedera helix* L. (Araliaceae), l'hédérine (alpha et beta) et hédéracolchiside A1, possèdent une activité antileishmaniale (**Delmas et al.,2002**). Les résultats ont montré que ces saponines présentent une forte action antiproliférative dans toutes les étapes de développement du parasite *Leishmania infantum* (**Delmas et al.,2002**).

II.3.5.3.5. Cytotoxique et antitumorale

De nombreuses études ont mis en évidence le caractère fortement cytotoxique, voir même antitumoral, de plusieurs saponines on y trouve :

- Les saponines d'*Argania spinosa* (Arganine A-F) ont une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire PC3 (cancer de la prostate) (**Drissi et al.,2006**).
- La saponine stéroïdique, la dioscine, isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce une activité antitumorale ainsi qu'un vaste spectre d'activités biologiques (antivirale, antifongique et anti-inflammatoire) (**Yu et Tao.,2002**).
- Au niveau des saponines avec génine triterpénique, la Virgaureasaponine E exerce une activité anticancéreuse significative *in vivo* sur des souris porteuses d'un fibrosarcome. Dans cette expérience, la réduction de la taille de la tumeur est proportionnelle à la dose de la saponine administrée (**Plohmann et al.,1997**).
- D'autres molécules inhibent l'activité d'enzymes particulières (sialyltransférases) impliquées dans le développement des métastases (cancer des poumons) comme la soyasaponine I (**Chang et al.,2006**). Et plusieurs travaux ont suggéré que les saponines du soja présentent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du côlon (**Kang et al.,2005 ; Oh et Sung.,2001 ; Ellington et al.,2006**).

II.3.5.3.6. Anti-oxydante

L' α -hédérine, l'hédérasaponine C, l'hédéracolchisides E et F présentent une forte activité anti oxydante (**Gulcin et al.,2004**).

II.3.5.3.7. Antivirale

Arganine C, une saponine isolée des fruits de *Tieghemella heckelii* (Sapotaceae) qu'on retrouve aussi dans *Argania spinosa* présente une activité antivirale (Gosse et al.,2002).

Les saponines triterpénoïdes de type oléanane isolées de quelques espèces de la famille des Fabaceae ont montré une activité anti-herpétique et leurs structures influeraient sur cette activité (Kinjo et al.,2000). Ces saponines sont : kaikasaponine III et azukisaponine V.

II.3.6. Les Anthraquinones

II.3.6.1. Généralités

Les anthraquinones sont des principes assez fréquents chez les Rubiaceae. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides et existent dans les plantes à l'état de génine libre ou sous forme d'hétéroside (Bertille.,2011). Ces composés sont constitués de trois cycles accolés, dont un des cycles est le plus souvent oxydé (Figure 12). Les cycles benzéniques peuvent porter une ou plusieurs fonctions hydroxyles, carboxyles, méthyles, méthoxyles, hydroxyméthyles et former des O-hétérosides avec différents sucres (Bertille.,2011).

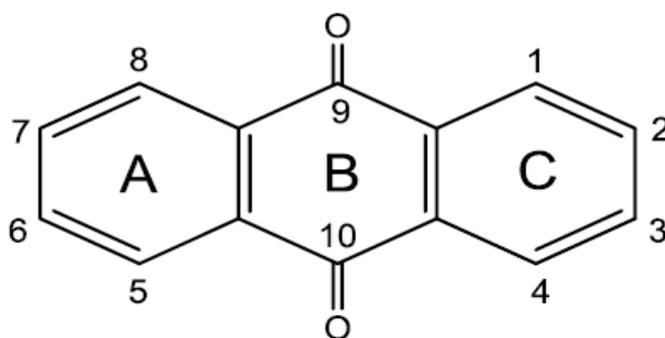


Figure 06. squelettes des anthraquinones

Les anthraquinones sont des composés aromatiques oxydés, principalement d'origine polycétidique dérivé de la cyclisation d'une chaîne « octacétide ». Les composés polycétides proviennent de chaînes « polycetométhylène » $-(CH_2-CO)_n-$. La présence de groupes fonctionnels et leur disposition sont déterminées par la séquence de réactions d'alkylation, de déshydratation, d'oxydation, de condensation, d'hydroxylation et de glycosidation (Manitto et Sammes.,1981 ; Muzychkin.,1998).

II.3.6.2. Propriétés des anthraquinones

II.3.6.2.1. Propriété photosensibilisante

Plusieurs dérivés d'anthraquinone ont été étudiés pour leurs propriétés photosensibilisantes dans les réactions photodynamiques (Zachariades et al.,2009 ; De Rouw.,1991) par exemple, certains d'entre eux présentent une bonne activité antibactérienne et antivirale en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et la molécule d'oxygène singulet (1O_2), qui provoquent des dommages oxydatifs ultérieurs (Comini et al.,2011).

II.3.6.2.2. Propriété antibactérienne

Des travaux réalisés sur six anthraquinones isolées de *Morinda angustifolia* ont montré que la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone à la dose de 13 µg/disque présente une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* avec des diamètres de zones d'inhibition de 14.0, 12.5 et 13.0 mm respectivement (Xiang et al.,2008).

Six anthraquinones isolées de trois espèces du genre *Xanthoria* (*X. falla*, *X. elegans* et *X. polycarpa*), phycion, erythroglaucin, xanthorin, emodin, fallacinal et teloschistin, ont montré une activité antibactérienne à la dose de 25 µg/disque contre *Pseudomonas fluorescens*, *P. glicinea* et *P. phaseolicola* avec une inhibition de la croissance de 5-15%, 5-25% et 5-8% (Manojlović, N.T., et al.,2000).

Les anthraquinones isolées de *Heterophyllaea pustulata*, à savoir soranjidiol, rubiadin, damnacanthal et le 5,5'-bisoranjidiol, ont montré une activité antibactérienne sur *S. aureus* avec des CMI comprises entre 32 et 64 µM (Comini et al.,2011).

L'activité inhibitrice de la croissance de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 des constituants isolés des écorces de *Tabebuia impetiginosa* a été examinée en utilisant la diffusion des disques en papier et la CMI des essais biologiques. L'activité des composés isolés a été comparée à celle des agents anti-*Helicobacter pylori* disponibles dans le commerce, amoxicilline, le métronidazole et la tétracycline. Avec la méthode de diffusion de disque en papier, la 2-(Hydroxyméthyl) anthraquinone a présenté une forte activité contre *Helicobacter pylori* ATCC 43504 à partir de 0.01 mg/disque. L'acide anthraquinone-2-carboxylique, et le métronidazole ont été moins efficaces en présentant une activité anti-*Helicobacter pylori* modérée à 0.1 mg/disque. Pour la CMI des essais biologiques, la 2-(hydroxyméthyl) anthraquinone (2 µg/mL)

et l'acide anthraquinone-2-carboxylique (8 µg/mL) ont été plus actifs que le métronidazole (32 µg/mL) mais moins efficace que l'amoxicilline (0.063 µg/mL) et la tétracycline (0.5 µg/mL) (**Park et al.,2006**).

Le test de létalité des crevettes de saumure a donné une valeur de DL50 de 533 µg/mL pour l'anthraquinone 1,5-dihydroxy-3-méthoxy-7-méthyl-anthraquinone. Elle est active contre deux bactéries à gram positif (*B. anthracis* et *Corynebacterium pseudodiphthericum*) et deux bactéries à gram négatif (*P. aeruginosa* et *P. pseudomalliae*) à la dose de 200 µg/mL (**Kazmi et al.,1994**).

Deux anthraquinones, zenkequinones A et B ont été isolées à partir des écorces de la tige de *Stereospermum zenkeri*. L'activité antimicrobienne des composés isolés a été évaluée contre six souches multirésistantes d'agents pathogènes. Zenkequinone B a montré la meilleure activité antibactérienne contre les bactéries à gram-négative *P. aeruginosa* avec une valeur de CMI de 9.50 µg/mL (**Lenta et al.,2007**).

II.3.6.2.3. Propriété antifongique

Parmi les six anthraquinones isolées de *M. angustifolia*, la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone à la dose de 13 µg/disque, possède une activité antifongique contre *C. albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 7.5 mm (**Xiang et al.,2008**).

Les travaux de Manojlović *et al* (**Manojlović, N.T., et al.,2000**) ont signalé que les six anthraquinones isolées des trois espèces du genre *Xanthoria* présentaient des activités fongicides contre *Aspergillus niger*, *Doratomyces stemonilis*, *Trichoderma viride* et *Penicillium verucosum* en inhibant la croissance de 10 à 65% avec une dose de 100 µg/disque.

Une étude de **Kanokmedhakul et al.** a démontré que nordamnacanthal et damnacanthal isolés de *Prismatomeris fragrans* présentaient des activités antifongiques contre *C. albicans* avec les valeurs de CI50 de 6.0 et 22.6 µg/mL respectivement (**Kanokmedhakul et al.,2005**).

Rhein, physcion, aloe-emodin et chrysophanol isolés à partir des rhizomes de *Rheum emodi* ont montré une activité antifongique contre *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Aspergillus fumigatus* avec des valeurs de CMI comprises entre 25 et 250 µg/mL (**Agarwal et al.,2000**).

II.3.6.2.4. Propriété antivirale

Les deux anthraquinones emodin et barbaloin ont montré une activité antivirale. L'excellent agent virucide est l'émodin (Alves et al.,2004). Le damnacanthol isolés des racines de *Morinda elliptica* a montré une activité modérée contre le VIH (Ali, A.M., et al.,2000). Un certain nombre d'anthraquinones, des dérivés d'anthrones et d'anthraquinones ont été évalués pour leur activité antivirale contre le cytomégalo virus humain (HCMV).

Parmi les composés évalués, quinalizarin, emodin, rheim, hypericin, protohypericin, alizarin, emodin bianthrone et emodin anthrone ont montré une activité antivirale contre la souche AD-169 de HCMV. Lors d'un essai sur une souche de HCMV résistante au ganciclovir, les valeurs de la CE50 pour quinalizarin, rheim et l'alizarine étaient supérieures aux valeurs obtenues pour la AD-169 (Barnard et al.,1992).

II.3.6.2.5. Propriété anticancéreuse

Parmi les anthraquinones isolées des racines de *Morinda elliptica*, le damnacanthol et le lucidin- ω -méthyl éther, sont cytotoxiques sur les lignées cellulaires MCF-7 (cellules tumorales mammaires) et CEM-SS (leucémie lymphoblastique T). Le rubiadin et le nordamnacanthol sont cytotoxiques sur la lignée CEM-SS. Le nordamnacanthol, damnacanthol et 1-hydroxy-2-hydroxyméthyl-3-méthoxyanthraquinone isolés de *P. fragrans* ont montré une activité cytotoxique contre les cellules de la lignée BC avec les valeurs de IC50 respectives de 6.9, 10.1 et 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De plus, les anthraquinones 1,3-dihydroxy-2-méthyl-5,6-diméthoxyanthraquinone, nordamnacanthol, damnacanthol, rubiadin, rubiadin-1-méthyl éther de *P. fragrans* et la 1-hydroxy-2-méthyl-4,5,6-triméthoxyanthraquinone préparée à partir du traitement 1,3-dihydroxy-2-méthyl-5,6-diméthoxyanthraquinone ont montré une activité cytotoxique contre les cellules de la lignée NCIH187 avec des valeurs de CI50 de 8.7, 1.9, 13.5, 14.2, 4.5, 9.4 et 5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement. Le dérivé éther méthylique, 1-hydroxy-2-méthyl-4,5,6-triméthoxyanthraquinone, est plus active contre NCI-H187 que son parent (Kanokmedhakul et al.,2005).

II.3.6.2.6. Propriété laxative

Barbaloin (10-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-(hydroxyméthyl)-9(10H)-anthracénone: aloin A) est l'anthraquinone majoritaire des exsudats et des gels d'*Aloe vera* (Groom, Q.J. and T. Reynolds.,1986) qui sont largement utilisés pour la fabrication de plusieurs types de boissons, produits alimentaires, cosmétiques et produits pharmaceutiques. Ces préparations ont montré plusieurs activités pharmacologiques dont l'activité laxative est la principale (Plasket.,1996) Il a été souligné que le clivage de la partie glycoside du barbaloin par la flore intestinale des rats conduit à la formation de son dérivé aglycone, l'aloé-emodin anthrone, qui possède un effet laxatif puissant (Akao et al.,1996)

II.3.6.2.7. Propriété antipaludique

Des études ont montré l'activité antipaludique de certaines anthraquinones isolées des plantes. Le digitolutein, l'éther rubiadin 1-méthyl et damnacanthal, des anthraquinones extraites de l'écorce du tronc et des racines de *M. lucida* ont inhibé significativement la croissance de *P. falciparum in vitro*. Le nombre de parasites (schizontes) a diminué d'une manière dose-dépendante jusqu'à 100% d'inhibition obtenue avec 30 à 40 µg pour chaque composé testé (Koumaglo et al.,1992) L'emodin, est l'anthraquinone la plus abondante et la plus active isolée de *Cassia nigricans*. Elle a induit environ 85% de mortalité sur les larves de moustiques *Anopheles gambiaea* à 50 et 25 µg/mL en 24 h (Georges et al.,2008).

Onegi et al. ont montré que le sterekunthal A présente une forte activité antiplasmodique contre deux souches de *P. falciparum* (PoW et Dd2) avec des valeurs CI50 de 1.3 µg/mL pour la souche PoW et 0.4 µg/mL pour la souche Dd2 (Onegi et al.,2002).

II.3.6.2.8. Propriété antituberculeuse

Les molécules Nordamnacanthal, damnacanthal, rubiadin et 1-hydroxy-2-hydroxyméthyl-3-méthoxyanthraquinone isolés de *P. fragrans*, ont montré une activité antituberculeuse contre *Mycobacterium tuberculosis* avec des valeurs de CMI respectives de 100, 25, 100 et 50 µg/mL (Kanokmedhakul et al.,2005).

Partie expérimentale

I.1. Matériel

I.1.1. Animaux

Les activités biologiques *in vivo* ont été réalisées sur des rats Wistar albinos (mâles et femelles) de poids compris entre 120 et 205 g, issus de l'institut pasteur d'Alger, Algérie.

Les rats ont été gardés dans des cages en polypropylène dans un environnement standardisé, avec une température ambiante de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ et un cycle de 12 h de lumière- obscurité. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture.

Les animaux ont été acclimatés aux conditions de laboratoire pour une période de 7 jours avant le début de test. Toutes les procédures expérimentales ont été adoptées en conformité avec les directives internationales de protection d'animaux.

I.1.2. Matériel végétal

La partie aérienne de la plante *Gladiolus segetum* a été récoltée à la wilaya de Batna (Aurès) région d'Ouyoun El-Assafir à la fin du mois de mai 2015. L'identification a été effectuée par le Professeur Bachir Oudjehih du département des Sciences Agronomique de l'Université de Batna par comparaison avec un spécimen enregistré sous le numéro 183DAUB2004. Le matériel a été séché à l'ombre dans un endroit bien aérée et pulvérisé en poudre fine avec un moulin électrique, ensuite la poudre a été bien conservée dans des sacs propres.

I.2. Macération et extraction

I.2.1. Préparation des extraits par Extraction Solide - Liquide (ESL)

L'extraction a été effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant quatre solvants à polarité croissante : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol (MeOH), méthode décrite par **Diallo et al.,(2004)**. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire (dans notre cas, 5 L de solvant pour 600 g de la poudre végétale). Les macérations sont effectuées sous agitation continue et à température ambiante durant 48 heures, après filtration, Les filtrats sont ensuite évaporés à sec en utilisant l'évaporateur rotatif (BÜCHI).

Chaque macération est répétée 2 fois pour extraire le maximum de substances. Les extraits ont été récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la **figure 07**. Le rendement d'extraction a été calculé par rapport au poids total de la poudre végétale.

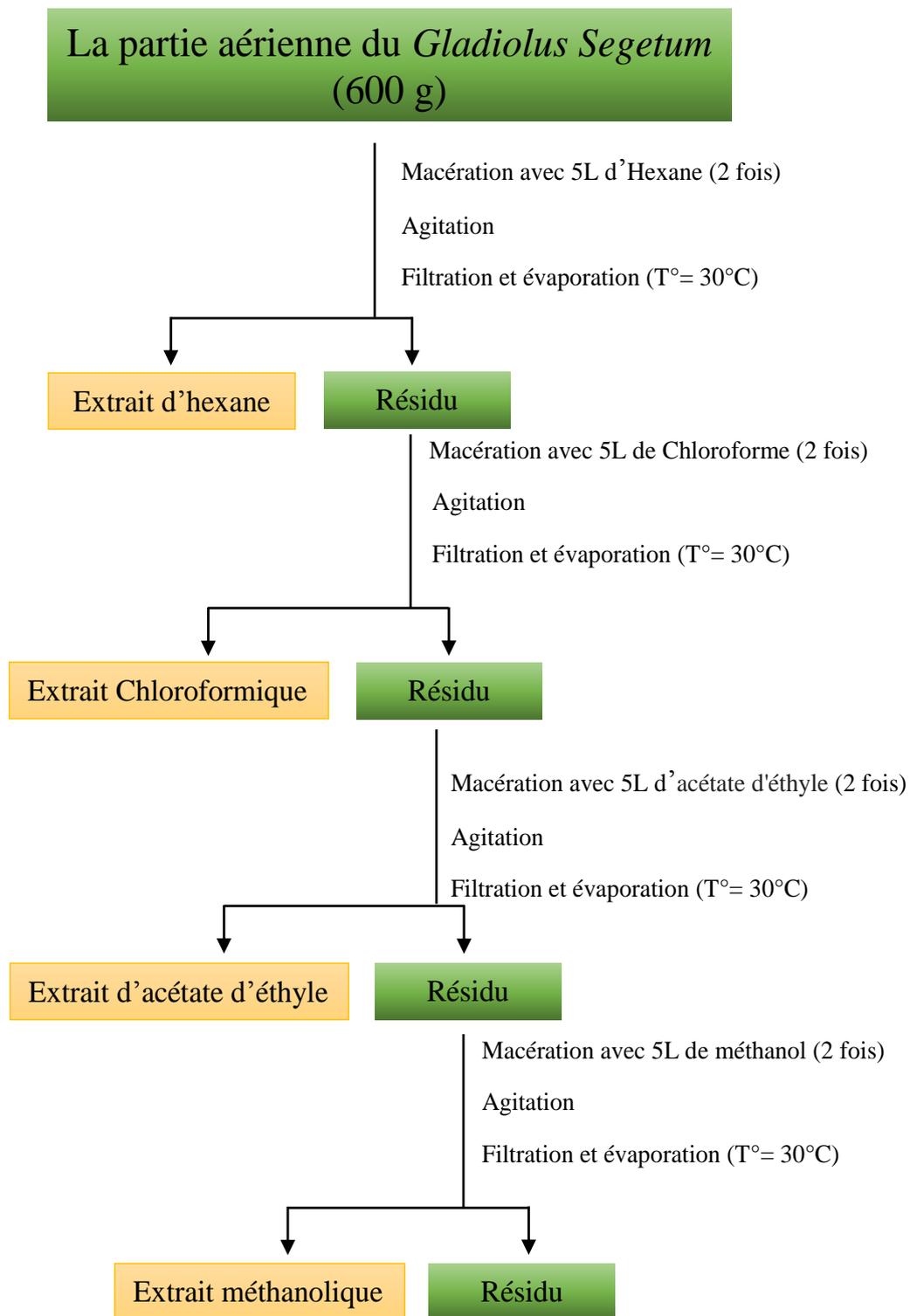


Figure07. Schéma d'extraction par les solvants organiques de la partie aérienne du *Gladiolus segetum*

I.2.2. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction (Rdt) est exprimé en pourcentage par rapport au poids de la poudre végétale utilisée selon la formule : (Loubaki *et al.*, 1999 ; Pratima et Mathad., 2011)

$$Rdt = \frac{\text{Poids d'extrait obtenu}}{\text{Poids de la poudre initiale}} \times 100$$

I.3. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de colorations et/ou de précipitations par des réactifs spécifiques. C'est l'un des outils indispensables qui permet de déceler la présence des différents groupes des phytoconstitués dans une plante donnée. C'est ainsi que ces plantes investiguées sont passées au screening phytochimique en se référant aux techniques décrites dans les travaux de Sofowora (1982).

Dahou *et al.*, (2003) ; Békro *et al.*, (2007) et Bruneton., (2009) Cherchant à éclairer les prescriptions des tradipraticiens et à sélectionner des matières premières représentatives des métabolites secondaires.

I.3.1. Recherche des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) a permis de caractériser les polyphénols. A 2 ml d'infusé à 5 % de poudre végétale on ajoute 2 gouttes de solution alcoolique de FeCl₃ à 2%. L'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols (Bruneton.,2009).

I.3.2. Recherche des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml d'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).

I.3.3. Recherche des alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes est effectuée en utilisant des réactifs de Burchard et de Dragendorff (Sofowora.,1982). Dans un erlenmeyer de 250 ml, introduire 10 g de la poudre végétale et 100 ml d'une solution aqueuse acidifiée par H₂SO₄ à 10%. Le mélange est agité et macéré pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Il est ensuite filtré sur papier filtre et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 100 ml de filtrat. Dans deux tubes à essai sont introduit 2 ml de filtrat à 10 % puis on ajoute 3 gouttes des réactifs de Burchard (2.5 g d'iode, 5 g d'iodure de potassium et 100 ml H₂O) dans le premier tube et de Dragendorff

dans le second. L'apparition d'un précipité brun rougeâtre et orange respectivement dans les deux tubes confirme la présence des alcaloïdes.

I.3.4. Recherche des stéroïdes et terpènes

La recherche des stéroïdes et des polyterpènes est fondée sur la réaction de Libermann Burchard. 1 g de la poudre végétale 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 sec, le résidu sec est dissous dans un mélange de 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml 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 stéroïdes et des polyterpènes (Bruneton., 2009).

I.3.5. Recherche des saponosides

La mise en évidence des saponosides repose sur leur faculté à former une mousse (Dahou et al., 2003). Dans un bécher, on ajoute 100 ml d'eau distillée à une quantité de 2 g de poudre végétale, 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 d'infusé à 2% de poudre végétale 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.

I.3.6. Recherche des anthraquinones

20 g de la poudre végétale a été mouillée avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%. Il s'en est suivi une macération dans 3 ml d'un mélange d'éther du pétrole durant 3 minutes.

Après filtration, 1 ml de cette solution a été traité avec 1 ml d'une solution aqueuse de soude caustique (NaOH) 1%. Une forte coloration rouge-rosâtre apparaît chez *Gladiolus segetum* seulement témoignant la présence des anthraquinones (Oloyede, 2005).

I.4. Dosages des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al.,1999 ; Djeridane et al.,2006**). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique. 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**).

I.5. Dosage des flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est basée sur la complexation avec Al^{+3} et les résultats sont exprimés en équivalents de Quercétine (**Türkoğlu et al. 2007**). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

I.6. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

I.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de la partie aérienne de la plante *Galdiolus segetum* est testée par plusieurs méthodes :

Piégeage du radical libre DPPH ; piégeage de l'ABTS ; la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) ; Chélation des ions métalliques ; Pouvoir réducteur ; Blanchissement du β -carotène.

I.6.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité du DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois (**Blois.,1958**). Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2diphényl-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.6.1.2. Activité de la chélation des ions métalliques

L'activité de chélation des ions métalliques des extraits de la plante *Gladiolus segetum* par l'ion ferreux Fe²⁺ a été déterminée selon la méthode décrite par **Decker et Welch (1990)**. Les extraits de différentes concentrations 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.6.1.3. Activité de blanchissement du β-carotène

L'activité de blanchissement du β-carotène des extraits de la plante *Gladiolus Segetum* a été évaluée en utilisant le modèle de l'acide β-carotène-linoléique (**Miller.,1971**).

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.6.1.4. Activité du piégeage de l'ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été déterminée selon la méthode de **Re et al (1999)**.

L'ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium est stockée dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Le radical cation est stable sous cette forme depuis plus de 2 jours dans le stockage dans l'obscurité à la température ambiante. Avant utilisation, l'ABTS a été dilué pour obtenir une absorbance de 0,708 ± 0,025 à 734 nm avec de l'éthanol. Ensuite,

160 µl 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.6.1.5. Activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée selon la méthode décrite par **Apak et al (2004)**.

Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50 µl Cu²⁺ (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 A_{0.5} (µg / ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

I.6.1.6. Activité du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Cette méthode a été déterminée selon la technique d'**Oyaizu (1986)**.

La méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations 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.

L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants synthétiques (BHA et la quercétine).

I.6.2. Activité antiinflammatoire *in vitro*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* consiste à préparer quatre solutions. Elle a été effectuée sur les extraits de la plante *Gladiolus segetum* selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (Sangita et Priyanka.,2012).

- 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 G.S avec les concentrations 125, 250,500 et 1000µg/ml.
- La solution control test (Tc) (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.
- 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 G.S 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.

Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N), les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder l'échantillons à 57°cpendant 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 calculé comme suit:

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

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

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

I.6.3. Activité antidiabétique *in vitro*

I.6.3.1. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase

L'activité antidiabétique des extraits de la plante *Gladiolus segetum* par rapport à l' α -amylase est réalisée par la méthode décrite par Mccue et Shetty (2004). Un volume de 100 µl de solution tampon du phosphate de sodium à une concentration de 0.02 mol / l (pH = 6.9) est mélangé

avec 100 µl d'extraits 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'incuber 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) par l'utilisation de UV-Visible. Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par de l'extrait est Calculée en utilisant l'équation suivante.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A \text{ control} - A \text{ échantillon})}{A \text{ control}} \times 100$$

I.6.3.2. Effet des extraits sur l'inhibition d'Alpha-glucosidase

L'inhibition α-glucosidase est effectuée selon la méthode de Suresh (**Kim et al.,2005**). En utilisant p-nitrophényl-α-D-glocopyranoside (pNPG) comme abstraite, qui est hydrolysé par α-glucosidase pour libérer p-nitrophényl (un agent coloré qui peut être surveillée à 405 nm). Un volume de 200 µl de l'extrait 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 pNPG (4 mmol / l). L'absorbance est calculée à 405 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. Même mélange sans extrait utilisé comme témoin. Le pourcentage de la capacité d'inhibition de α-glucosidase des extraits est calculé à partir de l'équation ci-dessus.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A \text{ control} - A \text{ échantillon})}{A \text{ control}} \times 100$$

I.6.4. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia

I.6.4.1. Description de l'activité de Cytotoxicité

Des 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., 2004**).

I.6.4.2. Protocole

Une quantité de 2 g des œufs de l'artémia a été déposée 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 réfrigérée à 26°C durant 48h. Et afin d'assurer les besoins de l'artémia en oxygène une pompe est relié au récipient contenant les œufs. Après l'éclosion des œufs, les larves sont mises en contact avec différentes concentrations des extraits (10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/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 de control est préparé en remplaçant l'extrait par 100 µl du DMSO. Le standard utilisé était dichromate de potassium.

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)**.

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

Où :

A : nombre de larves mortes dans l'extrait.

B : nombre de larves mortes dans le control.

I.6.5. Evaluation de l'activité anticancéreuse

I.6.5.1. Culture cellulaire de THP-1

Les cellules THP-1 sont une lignée de monocytes humains, provenant de patients atteints de leucémie. Ces cellules tumorales se multiplient 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 (**Figure 08**) (**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.(2)

Dans le cadre de nos expériences, afin d'avoir N=4, nous utiliserons des cellules THP-1 issues de 4 répliques différents.

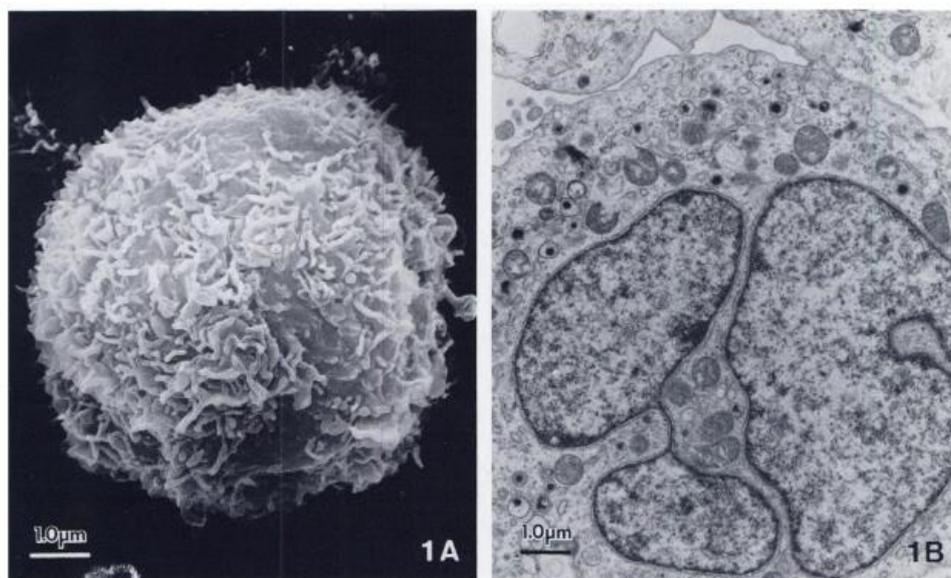


Figure 08. Cellule THP-1 au microscope à balayage (x 11 000) - 1A. Cellule THP-1 au microscope à transmission (x 9 500) (Tsuchiya et al.,1982)

I.6.5.2. Test Alamar bleu

Alamar bleu 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.,2012).

Dans notre contexte, nous utilisons le test Alamar bleu dans le but d'étudier la viabilité cellulaire, et pouvoir ainsi démontrer la cytotoxicité des échantillons que nous testons.

I.6.5.3. Test WST-1

Il s'agit d'un test qui 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 09).

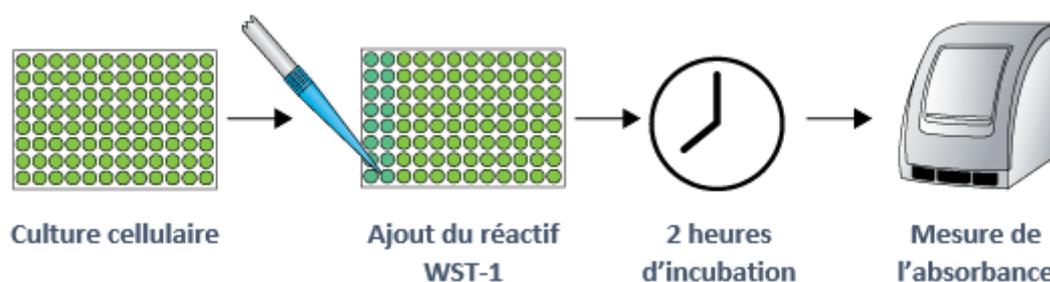


Figure 09. Protocole schématisé du test WST-1

I.6.5.4. Test 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.,2001).

I.6.5.5. Exploration des gènes

I.6.5.5.1. Extraction d'ARN

La technique d'extraction d'ARN lors de nos manipulations utilise le TRIzol (*TRI Reagent*). Il s'agit d'une méthode développée dans le but d'isoler l'ARN dans une phase aqueuse. 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 et al.,2010).

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%. L'ARN extrait est donc purifié et peut-être analysé par le spectrophotomètre BioSpec-nano® (figure 10).

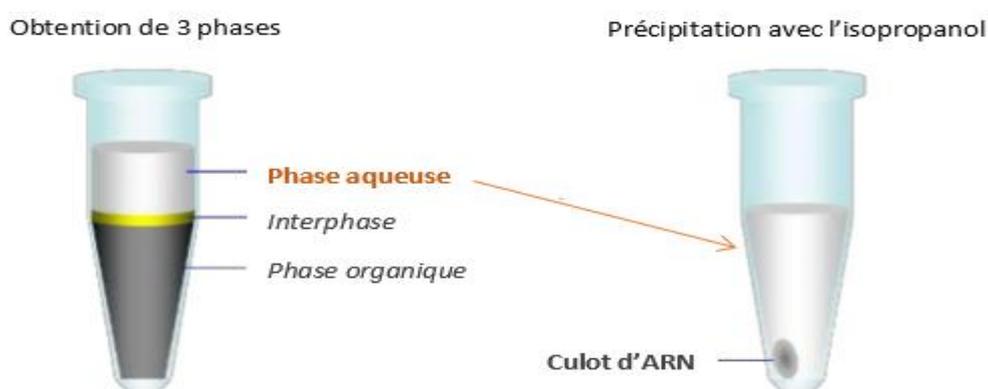


Figure 10. Schéma simplifié de l'isolement de la phase aqueuse contenant l'ARN

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 par des sels tels que le chloroforme ou les phénols.

I.6.5.5.2. La 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 et Houde.,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' .

I.6.5.5.3. La RT-PCR

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 11).

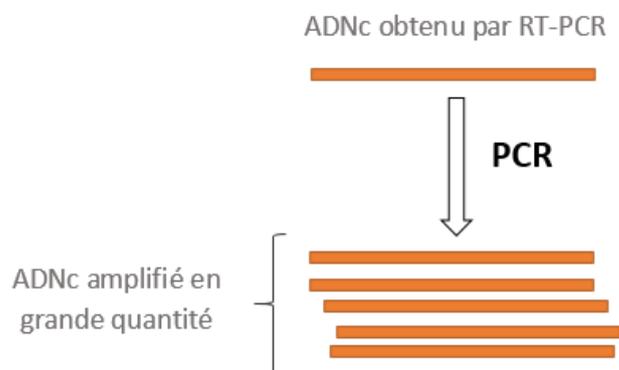


Figure 11. Schéma simplifié du principe de l'obtention d'ADNc par RT-PCR et qPCR

I.6.5.5.4. 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 BCL2.

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.,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 Naismith.,2000**).

CASP 3 et CASP 8 :

Les caspases sont une famille de protéase à cystéine (de l'anglais *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 pro-enzymes 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**).

BCL2 :

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**).

Tableau02. Les amorces utilisées pour l'expression des gènes dans les cellules humaines THP-1

Classe	Gènes	Séquences
	ACTB (contrôle)	F:5'-TTGGCAATGAGCGGTTCC-3' R:5'-GTACTTGCGCTCAGGAGGAG-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'-GCCAGGACCTAGAGTTTGTTTC-3' R: 5'-GCCTTGACTGTTAATGAGAATGC-3'
Inflammation	TNF α	F: 5'-TAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' R: 5'-GATGGCAGAGAGGAGGTTGA-3'

I.6.5.6. 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.7. Evaluation des activités biologiques *in vivo* de l'extrait méthanolique

I.7.1. Test de toxicité

La toxicité orale aiguë de l'extrait méthanolique de plante *Gladiolus segetum* a été évaluée chez le rat conformément à la ligne directrice n° 423 de l'OCDE pour les essais des substances chimiques adoptée le 17 décembre 2001 (OCDE, 2013).

I.7.1.1. Principe de l'essai

Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étape, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë de la substance peuvent être obtenues pour permettre sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (le plus sensible) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- 1) Arrêt de l'essai.
- 2) Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires.
- 3) Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Uniquement des femelles ont été utilisées pour ce test (OCDE., 2013). L'analyse des publications sur les essais classiques de détermination de la DL_{50} montre en effet que, bien que la différence de sensibilité entre les deux sexes soit généralement faible, dans les cas où l'on constate une différence, les femelles sont généralement un peu plus sensibles (Lipnick et al., 1995).

I.7.1.2. Autopsie générale

Tous les animaux d'essai ont été sacrifiés 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).

L'étude histopathologique des organes (foie et reins) a été effectuée au niveau de laboratoire d'anatomie-pathologique de C.H.U de Batna.

I.7.1.3. 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*).

I.7.2. Etude de l'activité antiulcéreuse

I.7.2.1. Evaluation de l'activité antiulcéreuse

Le test consistait à vérifier l'action protectrice de l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* contre l'ulcère provoqué chez les animaux par administration d'un agent ulcérogène. La Substance à tester était l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* au doses de 100,200 et 500 mg/kg, l'Oméprazole est utilisé comme contrôle positif, à la dose de 30 mg/kg et l'eau distillée, comme contrôle négatif, à la dose de 10 ml/kg .

Les rats ont été mis à jeun pendant 24 heures avant l'expérimentation mais avaient accès libre à l'eau. Au début du test, les rats ont reçu par voie intragastrique les différentes doses de l'extrait préalablement dissouts dans l'eau physiologique (Nacl 0,9%). Une heure après les traitements, chaque rat a reçu 0,5 ml d'éthanol à 90% selon la méthode décrite par **Germano et al.,(1996)**. Une heure après l'administration de l'agent ulcérogène, les rats ont été sacrifiés.

L'estomac de chaque rat a été prélevé, ouvert selon la grande courbure à l'aide d'un ciseau, lavé avec une solution physiologique, puis fixé dans une solution de formol pendant 5 minutes.

Après ce temps, chaque estomac a été bien étalé sur une tablette pour mieux observer les ulcères formés à l'œil nu et à l'aide d'une loupe. La longueur de chaque ulcère a été mesurée à l'aide d'une règle graduée en mm. Le nombre et la gravité des ulcères ont été déterminés selon une échelle arbitraire de 0 à 6 : **(Germano et al.,1996)**

0	pas de lésion
1	1 à 3 petites lésions ≤ 10 mm
2	1 à 3 larges lésions ≥ 10 mm
3	1 à 3 lésions épaisses
4	plus de 3 petites lésions
5	plus de 3 larges lésions
6	plus de 3 lésions épaisses

I.7.2.2. Détermination de l'indice d'ulcère

L'indice d'ulcère (IU) de chaque estomac a été exprimé comme la somme des points et le pourcentage de protection (PP) a été calculé par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'ulcération} = \frac{\text{indice d'ulcère du groupe contrôle} - \text{Indice d'ulcère du groupe traité}}{\text{indice d'ulcère du groupe contrôle}} \times 100$$

I.7.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est induite par injection de l'ovalbumine au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du rat d'une solution de 100% **(Anosike et al.,2012)**. L'œdème causé par cet agent phlogogène sera traduit en volume et mesuré par le pied à coulisse ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire.

Pour l'essai de l'activité anti-inflammatoire, Cinq lots de 5 rats mâles ont été utilisés. 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 mn avant l'injection de l'ovalbumine dans la voûte plantaire de la patte droite du rat.
- **Lot référence** : Les rats de ce lot ont été traités par voie orale avec un anti-inflammatoire de référence (diclofénac a 30mg/kg), 30 mn avant l'injection de l'ovalbumine.

- **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 ont été estimées 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.

I.7.4. Evaluation de l'activité antipyrétique

L'hyperthermie est provoquée chez les rats par l'administration d'une suspension aqueuse de levure de bière 20% à la dose de 20 ml/kg. L'administration est réalisée par voie sous-cutanée dorso-latérale des rats mis à jeun pendant 24 h avec accès libre à l'eau. La température rectale est prélevée avant administration de la levure de bière (T° basale).

24 heures après cette administration, la température rectale est de nouveau prélevée et les rats reçoivent les différents produits comme suit : le groupe témoin négatif reçoit 0,5 ml/100g d'eau distillée ; le groupe témoin positif reçoit le Paracétamol à 25 mg/kg et les trois autres groupes tests (3, 4 et 5) reçoivent l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg respectivement. Les températures rectales sont ensuite prélevées à 1 ; 2 ; 3 et 4 heures à l'aide d'un thermomètre électronique (Srinivas et al.,2011).

I.7.5. Evaluation de l'activité antidiabétique

I.7.5.1. Test de tolérance orale au glucose

Le test de tolérance a été effectué sur 15 rats normaux à jeun répartis en trois groupes (n=5). 5 rats témoins ont été gavés par une solution de NaCl (0.9%,10 ml/kg p.c.) et 10 rats ont été traités par voie orale par l'extrait méthanolique de la plante *Gladiolus Segetum* à 250 et 500 mg/kg p.c., 60 min avant le gavage par une solution de glucose (4g/kg p.c.). La glycémie a été

mesurée à 0 min (avant le gavage par l'extrait), à 60 min (avant le gavage par le 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.).

Dans chaque groupe, la glycémie a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux, en utilisant le glucomètre.

I.7.5.2. Induction du diabète expérimental

L'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de la plante *Gladiolus Segetum* a été effectuée selon une méthode d'un modèle de rat diabétique induit par l'alloxane. L'injection de l'alloxane par voie intra péritonéale (125 mg/Kg de poids) déclenche un diabète chez le rat (**Diatewa et al., 2004**), sachant que l'alloxane monohydrate est indicteur de diabète qui provoque une nécrose sélective sur les cellules béta du pancréas donnant ainsi une déficience insulinique chronique (**Dhanabal et al., 2007**). L'alloxane monohydrate (Pharmacia, St.Quentin en Yvelines, France), reconstitué juste avant l'administration dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%) pour constituer la concentration décrite précédemment pour être injecté au rat une semaine après l'injection, une évaluation de glucose sanguin est effectuée et les rats dont le glucose sanguin est supérieur à 2 g/l sont considérés diabétiques et répartis en groupe de 5 aléatoirement,5 groupes de 5 rats sont utilisés.

- **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 méthanolique 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.

I.8. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique Graph Pad Prism 5. Les résultats sont analysés par le test Anova univariée 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

II.1. Criblage phytochimique

Les tests préliminaires consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie aérienne traitée du *Gladiolus segetum* par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le **tableau 03**, Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Tableau 03. Résultats du criblage phytochimique réalisé sur *Gladiolus segetum*

Tests	Polyphénols	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Stéroïdes et Terpènes	Saponosides	Anthraquinones
<i>Gladiolus Segetum</i>	+	+	-	+	+	+

+ : présence certaine, +/- : présence incertaine, - : absence

Gladiolus segetum est donc riche en métabolites secondaires, l'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables. Ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en médecine traditionnelle.

II.2. Extraction, rendement et aspects des extraits

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne du *Gladiolus segetum* a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit de : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol.

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétale. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique (7.5%) suivi par l'extrait de chloroforme (2.16 %), l'extrait d'hexane (2 %), et enfin l'extrait d'acétate d'éthyle possède le plus faible rendement avec (1.33 %). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (**Tableau 04**).

Tableau 04. Rendement, aspect et couleur de différents extraits du *Gladiolus segetum*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Hexane (EHGS)	Pâteux	Marron	2
Chloroforme (ECGS)	Pâteux	Marron foncé	2.16
Acétate d'éthyle (EAGS)	Poudreux	Marron	1.33
Méthanol (EMGS)	Pâteux	Marron foncé	7.5

II.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu en utilisant comme standard l'acide gallique. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg) à l'aide d'une courbe d'étalonnage (**Figure 12**).

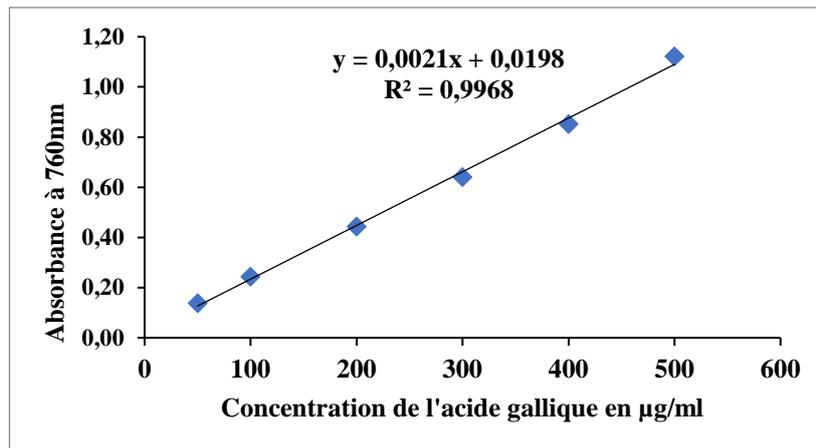


Figure 12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'EMGS et l'EAGS possèdent les teneurs les plus élevées en composés phénoliques avec des valeurs ($64,96 \pm 1,08$ μg EAG/mg d'extrait, $64,43 \pm 2,58$ μg EAG/mg d'extrait) respectivement, suivi par l'ECGS ($57,61 \pm 1,44$ μg EAG/mg d'extrait) tandis que l'EHGS contient ($46,87 \pm 1,03$ μg EAG/mg d'extrait) (**Tableau 05**).

Tableau 05. Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	Teneur en polyphénols totaux (μg EAG/mg)
Hexane	$46,87 \pm 1,03$
Chloroforme	$57,61 \pm 1,44$
Acétate d'éthyle	$64,43 \pm 2,58$
Méthanol	$64,96 \pm 1,08$

Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes \pm SD

II.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg) à l'aide d'une courbe d'étalonnage (**Figure 13**).

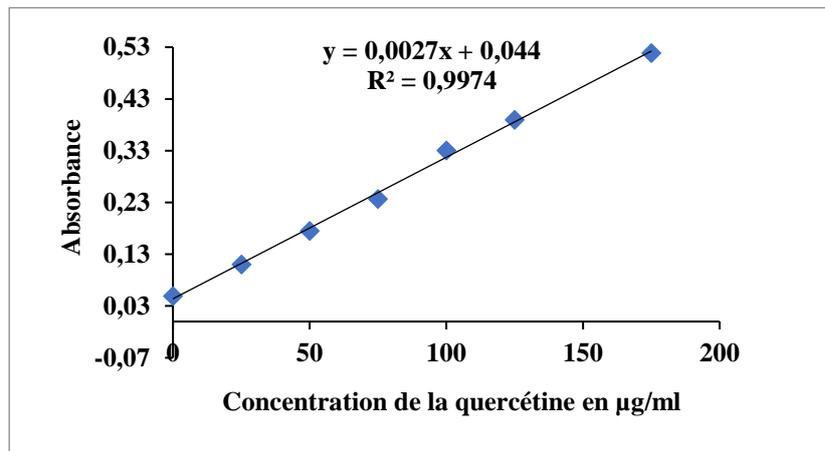


Figure 13. Courbe d'étalonnage de la quercétine

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux montre que l'EMGS est le plus riche en flavonoïdes avec une valeur de $(39.79 \pm 2.36 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$ suivi par l'EAGS $(27.96 \pm 1.97 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$ et l'ECGS $(27.10 \pm 1.36 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$ tandis que l'EHGS comporte $(24.03 \pm 1.55 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$ (**Tableau 06**).

Tableau 06. Résultats du dosage des flavonoïdes dans les différents extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	Teneur en flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$)
Hexane	$24,03 \pm 1,55$
Chloroforme	$27,10 \pm 1,36$
Acétate d'éthyle	$27,96 \pm 1,97$
Méthanol	$39,79 \pm 2,36$

Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes \pm SD

II.5. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

II.5.1. Evaluation de l'activité antioxydante

II.5.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 07**, **Tableau 08**). Le standard utilisé était le BHA. Les valeurs inférieures à IC_{50} indiquent l'efficacité de l'extrait et donc le pouvoir antioxydant plus fort.

L'EMGS a montré une activité antiradicalaire plus importante par rapport aux autres extraits. A une concentration de $800 \mu\text{g/ml}$, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 88,33% proche

de celui du standard (90,14%), suivi par l'EAGS (65,68%) alors que les extraits ECGS et EHGS n'ont atteint que 52,20% et 44,76% à cette même concentration (**Figure 14**).

Tableau 07. Inhibition du radical DPPH par les extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	% Inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Hexane	1,50±0,40	4,85±0,46	9,46±0,13	15,75±0,46	24,22±0,66	36,07±2,02	44,76±1,76
Chloroforme	2,14±0,04	8,60±0,24	13,87±0,81	19,25±0,73	27,75±0,52	39,03±1,78	52,20±1,03
Acétate d'éthyle	3,99±1,48	8,47±0,83	15,54±1,69	23,24±3,67	45,14±3,82	48,20±1,52	65,68±2,84
Méthanol	1,69±0,40	9,26±0,58	21,91±0,24	44,24±0,20	75,75±0,95	87,51±1,23	88,33±0,76
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 exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3)

Tableau 08. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test DPPH

Extraits	IC ₅₀ µg/mL
Hexane	>800
Chloroforme	733,21±6,19
Acétate d'éthyle	441,16±4,79
Méthanol	118,29±0,64
BHA	6,14±0,41

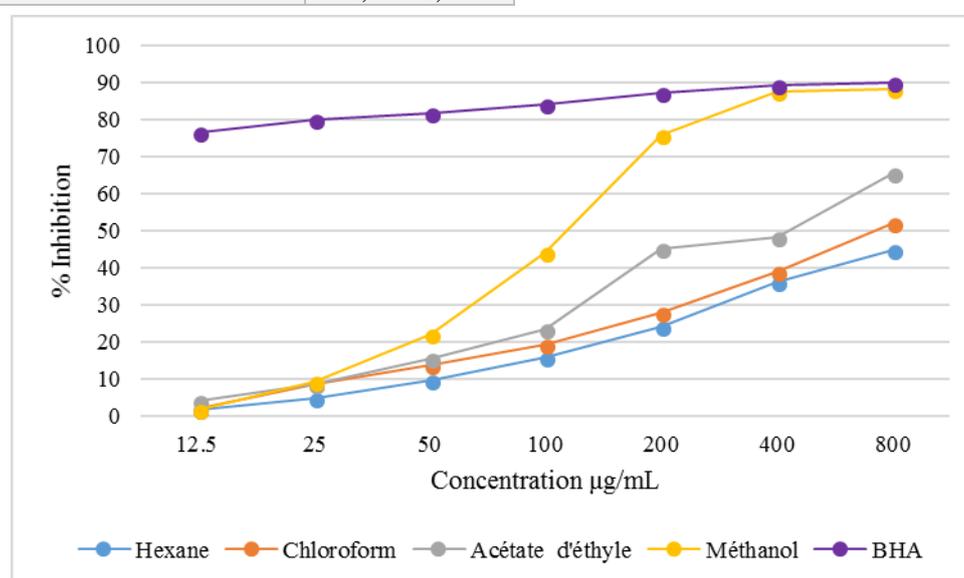


Figure 14. Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits du *Gladiolus segetum*

II.5.1.2. Activité du piégeage de l'ABTS

L'activité antioxydante des différents extraits du *Gladiolus segetum* est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS•+, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le BHA. Les résultats de l'activité inhibitrice du radical ABTS sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 09, Tableau 10**).

On remarque que presque tous les extraits testés possèdent une activité antioxydante et sont capables de piéger le radical cation ABTS•+. L'EMGS atteint un pourcentage d'inhibition égale à 92,24% proche à celui de standard (94,53%), suivi par l'EHGS (89,76%) et l'ECGS (86,79%) alors que l'EAGS atteint une inhibition plus de 78% (**Figure 15**).

Tableau 09. Activité antioxydante ABTS des extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	% Inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Hexane	16,80±2,78	31,10±2,06	52,68±0,82	72,73±0,73	88,79±0,28	91,82±0,55	92,24±0,10
Chloroforme	38,07±0,82	42,19±0,66	62,01±2,02	75,34±0,69	77,22±2,10	86,00±0,96	86,79±0,64
Acétate d'éthyle	33,23±1,24	38,44±2,64	57,22±3,48	60,43±6,67	61,34±5,10	77,82±2,54	78,43±5,99
Méthanol	34,38±2,93	51,10±3,78	70,98±2,96	73,52±1,46	82,49±0,82	87,40±1,51	89,76±0,64
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 exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3)

Tableau 10. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test ABTS

Extraits	IC ₅₀ µg/mL
Hexane	47,34±0,69
Chloroforme	30,15±1,14
Acétate d'éthyle	26,85±1,01
Méthanol	23,76±2,02
BHA	16,91±0,1

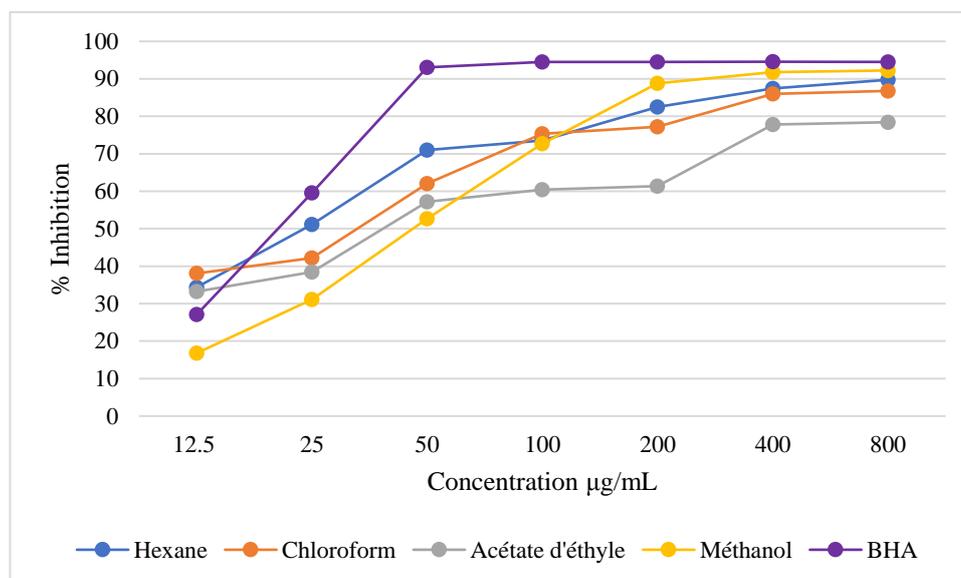


Figure 15. Activité antioxydante ABTS des extraits du *Gladiolus segetum*

II.5.1.3. Activité de la chélation des ions métalliques

Le calcul de la capacité des extraits du *Gladiolus segetum* à la chélation des métaux a été évalué par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard EDTA. Les résultats de la capacité des extraits à chélater les ions ferreux sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 11, Tableau 12**).

L'activité de chélation du métal augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. L'EMGS a montré la plus forte activité de chélation du métal par rapport aux autres extraits du *Gladiolus segetum* avec une IC_{50} égale à 40,80 µg/ml inférieure à celle de standard (48,11 µg/ml). Les valeurs inférieures de IC_{50} indiquent l'efficacité de l'extrait et donc le pouvoir antioxydant plus fort (**Figure 16**).

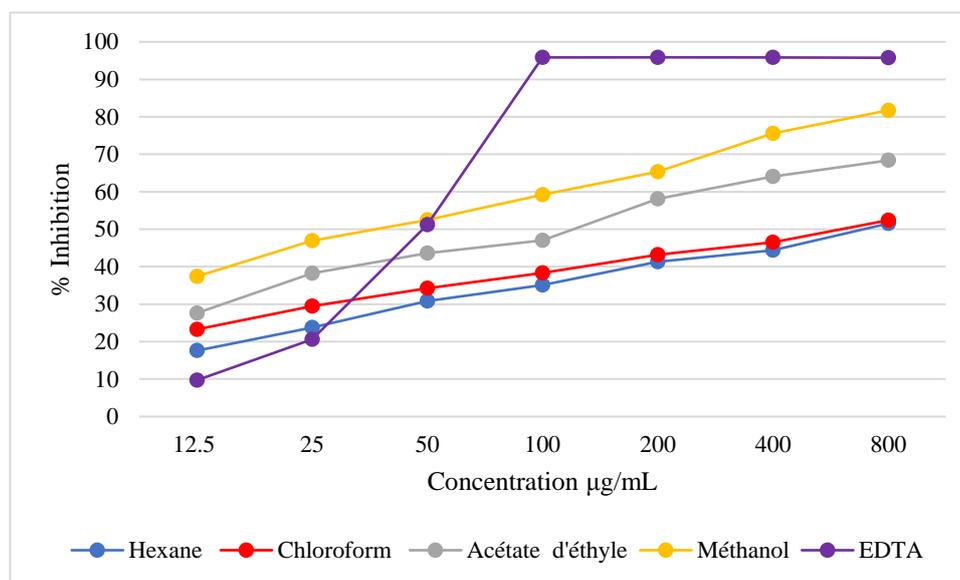
Tableau 11. Activité des extraits du *Gladiolus segetum* sur les ions chélatés

Extraits	% Inhibition						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Hexane	17,58±1,59	23,75±1,53	30,79±1,26	35,04±1,17	41,33±0,43	44,39±0,53	51,51±0,34
Chloroforme	23,25±0,75	29,49±1,20	34,24±1,74	38,34±1,26	43,16±0,52	46,50±0,24	52,39±0,29
Acétate d'éthyle	27,61±3,31	38,26±1,72	43,58±0,23	47,03±2,07	58,10±0,59	64,08±1,31	68,36±0,65
Méthanol	37,38±1,67	46,92±1,22	52,47±0,70	59,17±0,98	65,30±0,72	75,53±1,17	81,73±1,17
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

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3)

Tableau 12. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test de la chélation des ions métalliques

Extraits	IC ₅₀ µg/mL
Hexane	717,05±7,61
Chloroforme	641,41±14,97
Acétate d'éthyle	120,70±5,75
Méthanol	40,80±1,71
EDTA	48,11±0,32

**Figure 16.** Activité métal chélate des extraits du *Gladiolus segetum*

II.5.1.4. Activité de blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est mesurée en présence du β -carotène qui est employé comme marqueur. Les données expérimentales obtenues et les valeurs des IC₅₀ sont présentées dans les **tableaux (13 et 14)**, permettant ainsi d'évaluer et de comparer l'efficacité de nos extraits.

Tous les extraits testés du *Gladiolus segetum* ont montré une meilleure activité de blanchissement du β -carotène à 800 $\mu\text{g/ml}$, plus particulièrement l'EMGS qui a montré la meilleure activité par rapport au standard le BHA avec un pourcentage d'inhibition de 98,34%, 98,79% respectivement (**Figure 17**).

Tableau 13. Activité de blanchissement du β -carotène par les extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	% Inhibition						
	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg
Hexane	3,40 \pm 0,85	14,77 \pm 0,57	36,78 \pm 2,22	59,97 \pm 1,68	77,42 \pm 2,71	86,91 \pm 1,67	93,86 \pm 0,37
Chloroforme	16,44 \pm 0,41	39,15 \pm 1,93	61,68 \pm 0,93	86,46 \pm 1,02	89,22 \pm 1,67	92,11 \pm 1,98	96,36 \pm 1,77
Acétate d'éthyle	21,50 \pm 0,23	40,38 \pm 2,74	68,19 \pm 2,36	84,04 \pm 2,12	92,86 \pm 1,88	94,12 \pm 1,98	97,33 \pm 2,02
Méthanol	27,06 \pm 1,39	44,18 \pm 0,86	67,89 \pm 0,44	81,63 \pm 0,54	90,40 \pm 0,68	94,40 \pm 2,42	98,34 \pm 0,68
BHA	86,78 \pm 1,76	91,35 \pm 0,47	94,29 \pm 0,95	95,87 \pm 0,29	97,02 \pm 0,35	97,40 \pm 0,03	98,79 \pm 0,23

Les valeurs exprimées sont des moyennes \pm S.D (n=3)

Tableau 14. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC_{50} par le test de blanchissement du β -carotène

Extraits	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
Hexane	81,04 \pm 2,32
Chloroforme	36,75 \pm 0,87
Acétate d'éthyle	32,51 \pm 1,98
Méthanol	29,67 \pm 1,99
BHA	0,90 \pm 0,02

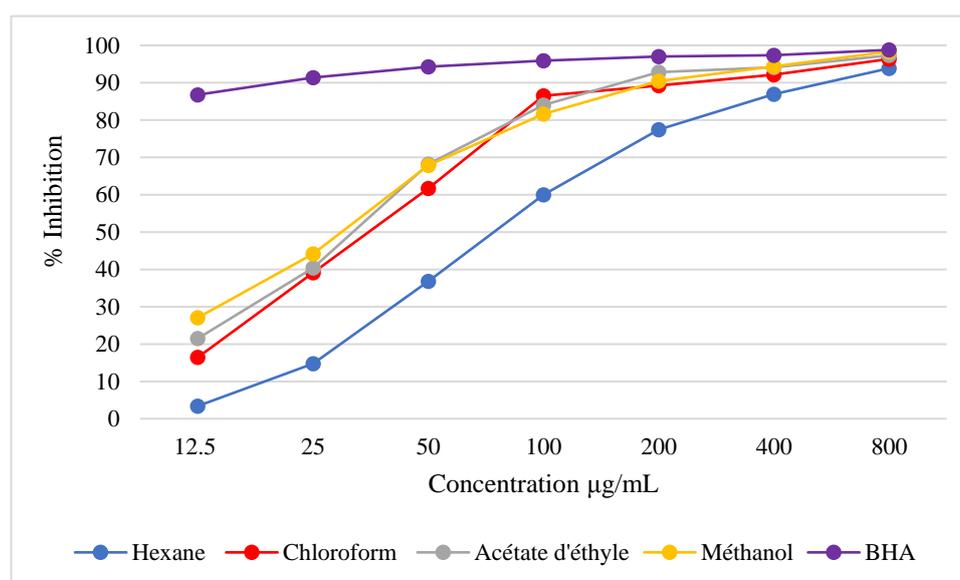


Figure 17. Activité de blanchissement du β -carotène par les extraits du *Gladiolus segetum*

II.5.1.5. Activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de la capacité des extraits à réduire le cuivre sont représentés par les absorbances pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (Tableau 15, Tableau 16). Les standards utilisés étaient le BHA et le BHT.

L'EMGS a montré une meilleure activité inhibitrice du CUPRAC ($A_{0.50} = 47,34$) par rapport aux autres extraits (Figure 18).

Tableau 15. Inhibition du CUPRAC par les extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	Absorbances						
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Hexane	0,17±0,01	0,24±0,01	0,35±0,01	0,58±0,02	0,95±0,06	1,64±0,09	2,93±0,08
Chloroforme	0,18±0,01	0,29±0,01	0,47±0,05	0,72±0,07	1,36±0,03	2,41±0,07	3,39±0,17
Acétate d'éthyle	0,19±0,00	0,29±0,02	0,44±0,01	0,76±0,03	1,29±0,10	2,26±0,05	3,41±0,23
Méthanol	0,20±0,00	0,29±0,03	0,49±0,02	0,86±0,02	1,35±0,05	2,31±0,08	3,61±0,08
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 exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3)

Tableau 16. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC_{50} par le test CUPRAC

Extraits	$A_{0.50}$ (µg/mL)
Hexane	84,94±4,32
Chloroforme	59,19±2,84
Acétate d'éthyle	58,34±2,32
Méthanol	47,34±4,50
BHA	5,35±0,71
BHT	8.97±3.94

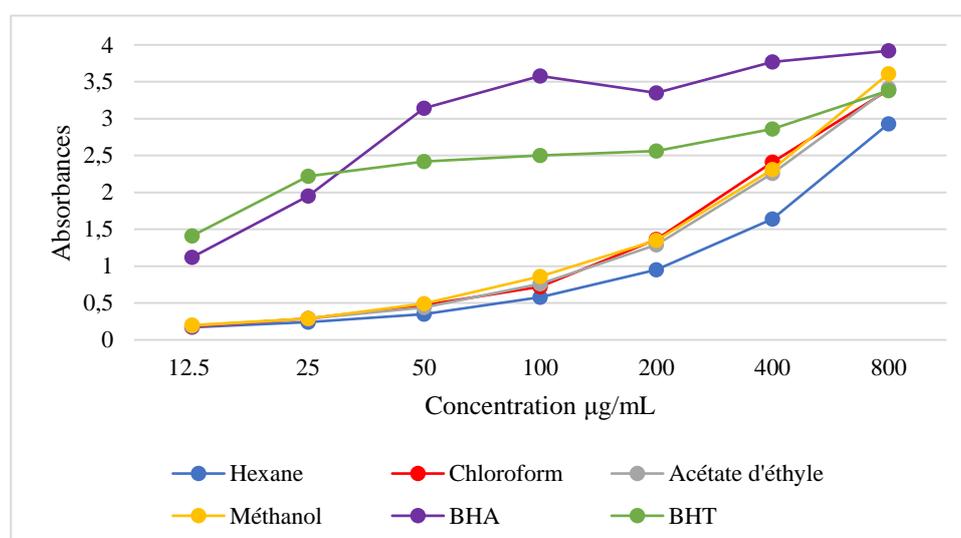


Figure 18. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits du *Gladiolus segetum*

II.5.1.6. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Pour ce test, une gamme de concentration a été préparée pour chaque extrait. Les valeurs des densités optiques obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations. Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer sont représentés par les absorbances pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 17**, **Tableau 18**). Les standards utilisés étaient le BHA et la quercétine.

D'après nos résultats, nous pouvons constater que tous les extraits testés possèdent une capacité dose-dépendante à réduire le fer et l'EMGS a présenté l'activité la plus importante avec une IC₅₀ de 55,34 µg/ml (**Figure 25**).

Tableau 17. Pouvoir réducteur des extraits du *Gladiolus segetum* testé par la méthode de FRAP

Extraits	Absorbances						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg
Hexane	0,09±0,00	0,10±0,01	0,14±0,02	0,14±0,01	0,26±0,01	0,36±0,03	0,59±0,01
Chloroforme	0,08±0,00	0,10±0,00	0,12±0,00	0,17±0,01	0,25±0,02	0,40±0,01	0,63±0,02
Acétate d'éthyle	0,10±0,00	0,12±0,01	0,15±0,00	0,18±0,01	0,40±0,00	0,55±0,01	0,77±0,02
Méthanol	0,18±0,01	0,31±0,01	0,45±0,01	0,80±0,01	1,25±0,06	2,33±0,02	3,46±0,05
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
Quercétine	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 exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3)

Tableau 18. Activité antioxydante exprimée en valeurs IC₅₀ par le test FRAP

Extraits	A _{0.50} (µg/mL)
Hexane	160,44±4,94
Chloroforme	145,79±4,63
Acétate d'éthyle	85,30±1,34
Méthanol	55,34±0,69
BHA ^b	9,29±0,22
Quecetine	4,31±0,64

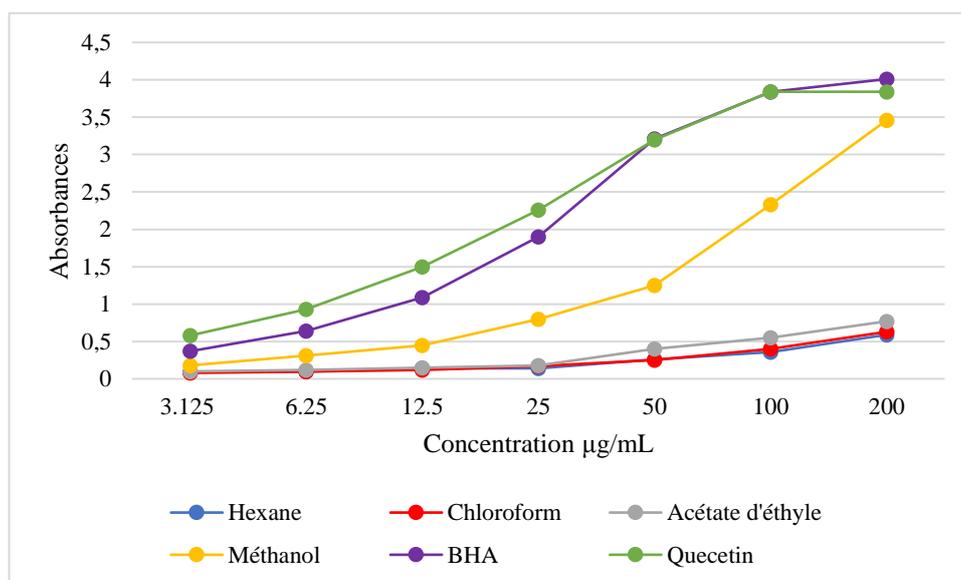


Figure 19. Pouvoir réducteur des extraits du *Gladiolus segetum* testé par la méthode de FRAP

L'activité antioxydante *in vitro* des extraits de la partie aérienne du *Gladiolus segetum* a été évaluée par plusieurs méthodes différentes.

L'activité antiradicalaire de nos extraits a été déterminée par la méthode de réduction du radical DPPH, ABTS et blanchissement du β -carotène. Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants peut s'opérer selon deux types de mécanismes, la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ou la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Popovici *et al.*, 2009). 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).

Dans le système β -carotène / acide linoléique, la β -carotène subit une décoloration rapide en absence d'un antioxydant. Les radicaux libres de l'acide linoléique formés lors de la production d'un atome d'hydrogène à partir de l'un de ses groupes méthylène diallyliques, ces radicaux libres attaquent la β -carotène hautement insaturée. En conséquence, la β -carotène est oxydée et décomposée en partie ; ensuite elle perd sa caractéristique de couleur orange. (Miladi *et Damak*, 2008 ; Rufino *et al.*, 2010). La présence des antioxydants réduit l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes.

Il semble important de souligner que l'activité antioxydante par blanchissement du β -carotène a augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait (**Lai et Lim.,2011**), et c'est le cas de nos extraits. La dégradation et le blanchissement du β -carotène est ralenti par les antioxydants des extraits du *Gladiolus segetum*, qui neutralisent les radicaux libres formés.

Les extraits qui retardent ou inhibent le blanchissement du β -carotène peuvent être décrits comme des piègeurs des radicaux libres et comme des antioxydants primaires (**Liyana-Pathirana et Shahidi., 2006**). En se conformant à plusieurs auteurs, ce test paraît très utile comme modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

L'activité antiradicalaire des extraits du *Gladiolus segetum* pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques et plus particulièrement les composés flavoniques (**Abdessmed et al.,2011 ; Abdessmed et Dibi.,2013**). Il a été suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire (**Yang et al., 2008**).

Il a été montré qu'il existe une corrélation positive entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante (**Kadri et al., 2011 ; Ghedadba et al., 2014**). Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres, ils ont la capacité de piéger les radicaux libres et, par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (**Gao et al.,2000 ; Roudsari et al., 2009**).

L'activité antioxydante également a été évaluée par d'autres méthodes telles que la réduction du fer (FRAP), chélation des ions métalliques et la réduction du cuivre (CUPRAC) qui représentent un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des extraits du *Gladiolus segetum* en particulier l'extrait méthanolique (EMGS). Le pouvoir réducteur des extraits de la plante *Gladiolus segetum* est dose dépendante (concentration dépendante). Il est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et al.,2007 ;Bougandoura & Bendimerad., 2012**).Des études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al.,2004 ; Kumaran et al.,2007 ; Bougandoura & Bendimerad, 2012**).Les ions Fe^{2+} sont les

prooxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gulcin et al., 2010). Ils catalysent la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemail et al., 1999). Ainsi, les chélateurs efficaces des ions ferreux peuvent fournir une protection contre le dommage oxydatif par la chélation de ces ions (Gulcin et al., 2010). Les résultats de Sahreen et ses collaborateurs (2010) montrent que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants.

L'activité de chélation des ions métalliques est aussi attribuée à quelques flavonoïdes (Le et al., 2007 ; Bruneton J , 1999) et acides phénoliques (Capecka et al., 2005).

Les composés phénoliques et flavonoïdes sont des meilleurs donneurs d'électron ou d'hydrogène (Shahidi et Naczka., 2004), chélateurs des ions métalliques (Pratt et Hudson., 1990 ; Ladaniya., 2008). Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (Heijnen et al, 2001 ; Heim et al, 2002), et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la potentialité antioxydante (URI, 1961).

De nombreuses études ont montré que le kaempférol et l'isoquercitroside qui sont présentes dans la plante *Gladiolus segetum* ont un effet antioxydant puissant non seulement in vitro, mais également in vivo (Park et al., 2006 ; Kampkotter et al., 2007 ; Verma et al., 2009).

Le kaempférol s'est révélé être un puissant piègeur de superoxyde, avec une IC50 de 0,5 µM (Wang et al., 2006). La capacité du kaempférol à réduire les concentrations de superoxyde à faible concentration peut jouer un rôle important dans son activité antioxydante, car la formation d'anion superoxyde est nécessaire à la production normale de la plupart des espèces d'oxygène et d'azote réactifs impliquées dans le stress oxydatif (Klaunig et al., 2004).

L'anion superoxyde est généralement transformé en H₂O₂ par les enzymes superoxyde dismutases. En présence de métaux de transition réduits (par exemple des ions ferreux ou cuivreux), H₂O₂ peut être converti en un radical hydroxyle hautement réactif. L'anion superoxyde peut également réagir avec l'oxyde nitrique pour former du peroxy-nitrite. Le radical hydroxyle et le peroxy-nitrite sont des espèces hautement réactives connues pour endommager l'ADN, les protéines et les lipides. Wang et al (2006) ont évalué l'activité antioxydante de plusieurs flavonoïdes et ont constaté que le kaempférol était l'un des plus puissants inhibiteurs du radical hydroxyle généré par Fenton, avec une IC50 de 0,5 µM. De même, Heijnen et al

(2001) ont observé que le kaempférol était un puissant piègeur de peroxy-nitrite, avec une IC50 de $0,35 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Le kaempférol s'est également avéré exercer des effets antioxydants par le biais d'autres mécanismes d'action par l'inhibition de l'activité d'enzymes générant des ROS, telle que l'enzyme xanthine oxydase (Wang *et al.*, 2006 ; Nagao *et al.*, 1999 ; Ozyurek *et al.*, 2009).

Comme d'autres flavonoïdes, le kaempférol peut également réduire la formation de radicaux hydroxyles lors de la réaction de Fenton en chélatant des ions ferreux ou cuivreux (Mira *et al.*, 2006 ; Ren *et al.*, 2008). Le kaempférol peut également induire des effets antioxydants en augmentant l'expression ou l'activité d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutase et catalase (Doronicheva *et al.*, 2007 ; Hong *et al.*, 2009).

II.5.2. Activité antiinflammatoire *in vitro*

Dans la présente étude, l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits du *Gladiolus Segetum* a été évalué par rapport à la dénaturation de sérum bovin albumine (BSA). Les résultats sont résumés dans le **tableau 19**.

L'EMGS a montré un pourcentage d'inhibition plus important de la dénaturation de BSA par rapport aux autres extraits. A une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 73,42% inférieur à celui de standard (92,45%), suivi par l'EAGS (59,82%) alors que les extraits ECGS et EHGS n'ont atteint que 36,50% et 25,06% respectivement à cette même concentration (**Figure 19**).

Tableau 19. Activité antiinflammatoire *in vitro* des extraits du *Gladiolus segetum*

Extraits	% Inhibition			
	125 μg	250 μg	500 μg	1000 μg
Hexane	10,35 \pm 0,23	11,48 \pm 0,25	19,11 \pm 0,48	25,06 \pm 0,53
Chloroforme	11,69 \pm 0,79	11,69 \pm 0,79	34,11 \pm 0,17	36,50 \pm 0,51
Acétate d'éthyle	31,49 \pm 0,65	34,33 \pm 0,63	41,07 \pm 0,36	59,82 \pm 0,50
Méthanol	32,24 \pm 0,53	41,73 \pm 0,36	60,60 \pm 0,03	73,42 \pm 0,94
Diclofénac	41,73 \pm 0,36	68,19 \pm 0,73	86,35 \pm 0,40	92,45 \pm 0,79

Les valeurs exprimées sont des moyennes \pm S.D (n=3)

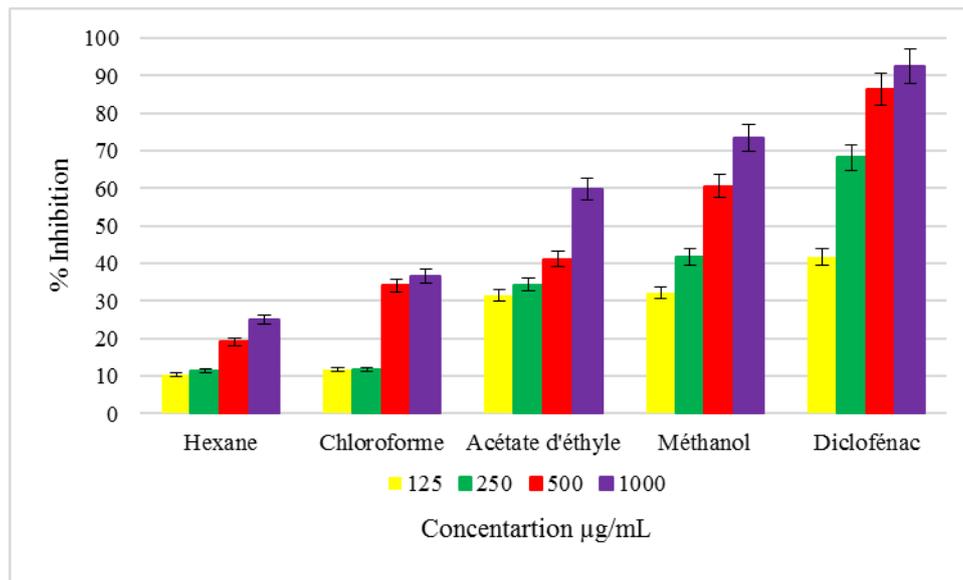


Figure 20. Activité antiinflammatoire *in vitro* des extraits du *Gladiolus segetum*

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Barros et al., 2008 ; Bagad et al., 2011**). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à inhiber l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (**Barros et al., 2008 ; Mizushima et Kobayashi., 1968**).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la phénylbutazone et l'indométacine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (**Sangeetha et al., 2011**).

Les polyphénols sont des produits naturels bien connus pour posséder plusieurs propriétés biologiques notables (**Bhattacharya., 2011**). Dans la présente étude, l'activité anti-inflammatoire *in vitro* peut être attribuée à sa teneur en polyphénols. L'effet peut être dû à l'effet synergique plutôt qu'à un seul constituant.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut-être attribuée à la présence de ces différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les saponosides dans les différents extraits trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur des extraits des plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines (**Adarsh et al., 2011**).

Plusieurs recherches ont rapporté l'effet de quelques molécules appartenant à la famille des flavonoïdes sur l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) et la lipooxygénase (LOX), l'inhibition de TNF- α et de NF- κ B, l'inhibition de la réaction inflammatoire par le contrôle de la MAP kinase et/ou COX-2, l'inhibition de l'activation des STAT-1, NF- κ B et l'expression d'iNOS ainsi que la production des NO. (Xagorari *et al.*, 2001 ; Hämäläinen *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2009).

La richesse de la plante *Gladiolus segetum* en composés phénoliques notamment le kaempferol pourrait contribuer à l'effet anti-inflammatoire *in vitro* prouvé dans cette étude (Park *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2010 ; Kupeli *et al.*, 2007 ; Toker *et al.*, 2004).

Les enzymes cyclo-oxygénases (COX), lipoxygénases (LOX) et oxyde nitrique synthase (iNOS) jouent un rôle important dans l'inflammation en participant à la synthèse des prostaglandines, des leucotriènes et à la production d'espèces réactives. Certains rapports ont montré que le kaempférol peut inhiber la COX-2 (Mahat *et al.*, 2010 ; Mi *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2008), LOX (Nakadate *et al.*, 1984 ; Deng *et al.*, 2007) et iNOS (Rostoka *et al.*, 2010).

On peut conclure que les extraits du *Gladiolus segetum* possèdent un effet anti-inflammatoire marqué *in vitro* contre la dénaturation des protéines.

II.5.3. Activité antidiabétique *in vitro*

Deux enzymes digestives, l' α -amylase et l' α -glucosidase, ont été utilisées afin d'évaluer l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits de la plante *Gladiolus segetum*. Dans cette partie, le potentiel inhibiteur de l'extrait méthanolique a été étudié.

Effet inhibiteur sur l' α -amylase et l' α -glucosidase

Les capacités inhibitrices de l'extrait testé de l' α -amylase et l' α -glucosidase ont été évaluées et les résultats obtenus sont présentés dans les figures 21 et 22.

Il ressort des résultats que l'EMGS a un meilleur pouvoir inhibiteur de l' α -amylase et l' α -glucosidase avec un pourcentage d'inhibition de 72,23% et 88,04% inférieur à celui de l'acarbose (89,88% et 93,21%) respectivement à une concentration de l'extrait égale à 1000 μ g/ml.

Plusieurs études ont montré que les extraits des plantes médicinales peuvent améliorer le taux de la glycémie. Un des mécanismes possibles est l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase

par différents métabolites (Abeysekera et al., 2007 ; Bhutkar et Bhise, 2012 ; El Beshbishy et Bahashwan, 2012).

Plusieurs principes actifs des plantes médicinales, appartenant aux différentes classes des métabolites (composés phénoliques, alcaloïdes, polysaccharides, terpénoïdes, peptides, etc.) ont démontrés bioactives contre l'hyperglycémie (De Sales et al., 2012).

Les différents composés qui sont présents dans nos extraits tels que les polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes, saponosides, phytostérols et anthraquinones qui sont responsables de l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase réduisant ainsi la dégradation de l'amidon et diminuant l'absorption du glucose par conséquent l'élévation de la glycémie postprandiale. Il est possible que ces composés participent en synergie dans l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase.

Ces résultats justifient l'utilisation de cette espèce comme une plante hypoglycémiante. Sa richesse en différents métabolites la rendent prometteuse dans la découverte des nouvelles molécules antidiabétiques.

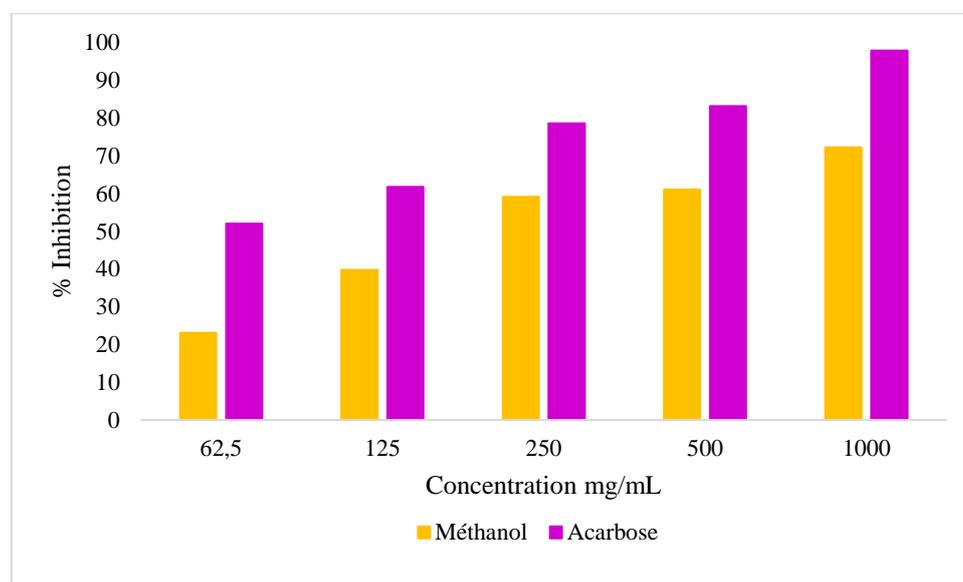


Figure 21. Effet de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* sur l'inhibition de l' α -amylase

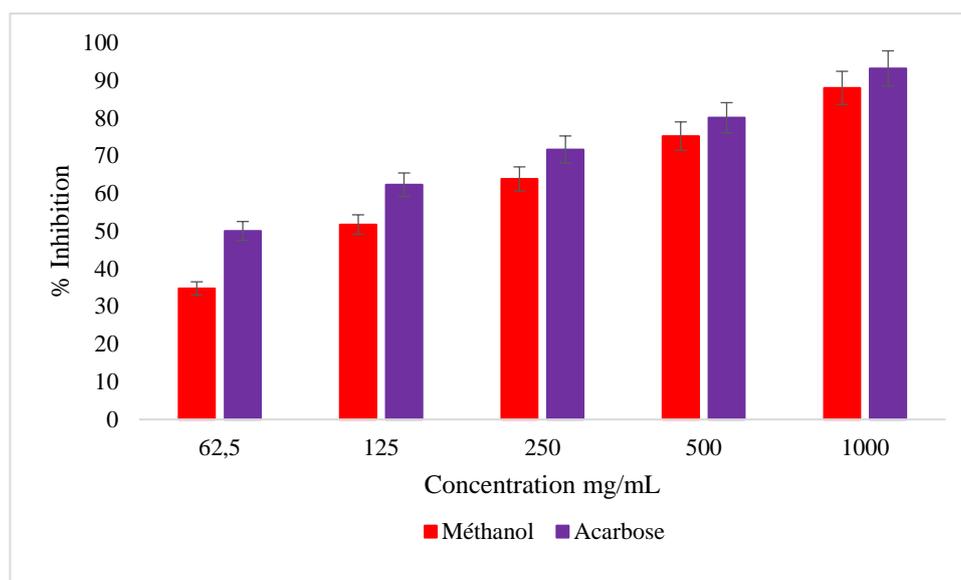


Figure 22. Effet de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* sur l'inhibition de l' α -glucosidase

II.5.4. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia Salina

L'activité de létalité des larves artémia salina est montrée dans le **tableau 20**. Les extraits du *Gladiolus segetum* présentent une mortalité à différentes concentrations. L'EMGS a montré un pourcentage de mortalité de 83,33% à une concentration de 80 μ g/ml et sa valeur DL50 était de 18,89 μ g/ml qui était considérée comme toxique. Le degré de létalité était directement proportionnel à la concentration de l'extrait. Le dichromate de potassium de référence standard présente une valeur DL50 (19,11 μ g/ml).

Odhiambo (2015) a démontré que les extraits du *Gladiolus ukambanensis* n'étaient pas toxiques pour les crevettes. Ainsi, ceux du *Gladiolus newii* et du *Gladiolus goetzenii* avaient une toxicité modérée alors que *Gladiolus watsonoides* était fortement toxiques (**Odhiambo et al.,2014**).

Tableau 20. Cytotoxicité des extraits du *Gladiolus segetum* contre l'Artémia Salina

Extraits	Pourcentage de mortalité (%)					Toxicité
	10 μ g/mL	20 μ g/mL	40 μ g/mL	80 μ g/mL	DL50 μ g/mL	
Hexane	8.33 \pm 7.22	12.50 \pm 2.50	41.67 \pm 4.43	70.83 \pm 7.22	48.89 \pm 5.40	+
Chloroforme	29.17 \pm 7.19	37.50 \pm 4.49	59.58 \pm 7.22	79.17 \pm 4.43	28.99 \pm 2.95	++
Acétate d'éthyle	29.17 \pm 6.09	41.67 \pm 4.34	62.50 \pm 3.11	83.33 \pm 4.43	24.44 \pm 7.70	++
Méthanol	25.00 \pm 0.00	54.17 \pm 7.22	66.67 \pm 7.22	87.50 \pm 2.88	18.89 \pm 1.92	++
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.00 \pm 0.00	53.62 \pm 10.00	81.22 \pm 1.33	100.00 \pm 0.00	19.11 \pm 2.56	++

Les valeurs exprimées sont des moyennes \pm S.D (n=3)

DL ₅₀	Toxicité
DL ₅₀ ≥ 80µg/ml	-
80 µg/ml > DL ₅₀ ≥ 40µg/ml	+
40µg/ml > DL ₅₀ ≥ 10µg/ml	++
DL ₅₀ <10µg/ml	+++

La comparaison des valeurs DL₅₀ des différents extraits indiqués au tableau 20 montre que l'extrait méthanolique est plus puissant (actif) que les autres extraits du *Gladiolus segetum*.

Dans l'évaluation de la toxicité des extraits de plantes par un essai biologique de létalité des larves artémia salina, l'extrait végétal brut est toxique (actif) s'il a une valeur DL₅₀ inférieure à 1000 µg / ml alors qu'il est non toxique (inactif) s'il est supérieur à 1000 µg / ml (**Meyer et al., 1982**).

La létalité observée des extraits de la plante *Gladiolus segetum* dans les larves indique la présence de puissants composants cytotoxiques et probablement antitumoraux dans cette plante. Le criblage phytochimique préliminaire effectué sur la plante *Gladiolus segetum* a révélé la présence des flavonoïdes, saponosides, anthraquinones, stéroïdes et terpénoïdes. Ainsi, l'action cytotoxique observée peut être due à la présence de ces composés.

Les composés phénoliques végétaux se sont révélés être des agents antitumoraux très efficaces, certains d'entre eux étant des flavonoïdes, des polyphénols, des anthraquinones, des coumarines, des alcaloïdes, etc. (**Lee, 1992**).

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques présents chez les plantes qui expliquent leur capacité à prévenir le cancer et la croissance tumorale (**Ren et al., 2003**). Les saponines sont des agents anticancéreux prometteurs qui agissent en stoppant les mutations cellulaires qui pourraient inévitablement conduire au cancer (**Mohammed et al., 2009**).

II.5.5. Evaluation de l'activité anticancéreuse

II.5.5.1. Test Alamar bleu

Le test Alamar bleu révèle un effet dose-dépendant ; en effet lorsque la concentration en extrait méthanolique de *Gladiolus segetum* atteint 800 µg/ml, le pourcentage de viabilité cellulaire des THP-1 chute considérablement et passe de 150% à moins de 10% (**Figure 23**).

Nous pouvons conclure grâce à ce test que l'extrait du *Gladiolus segetum* semble présenter une cytotoxicité vis-à-vis des cellules THP-1, à partir d'une concentration de 400 µg/ml.

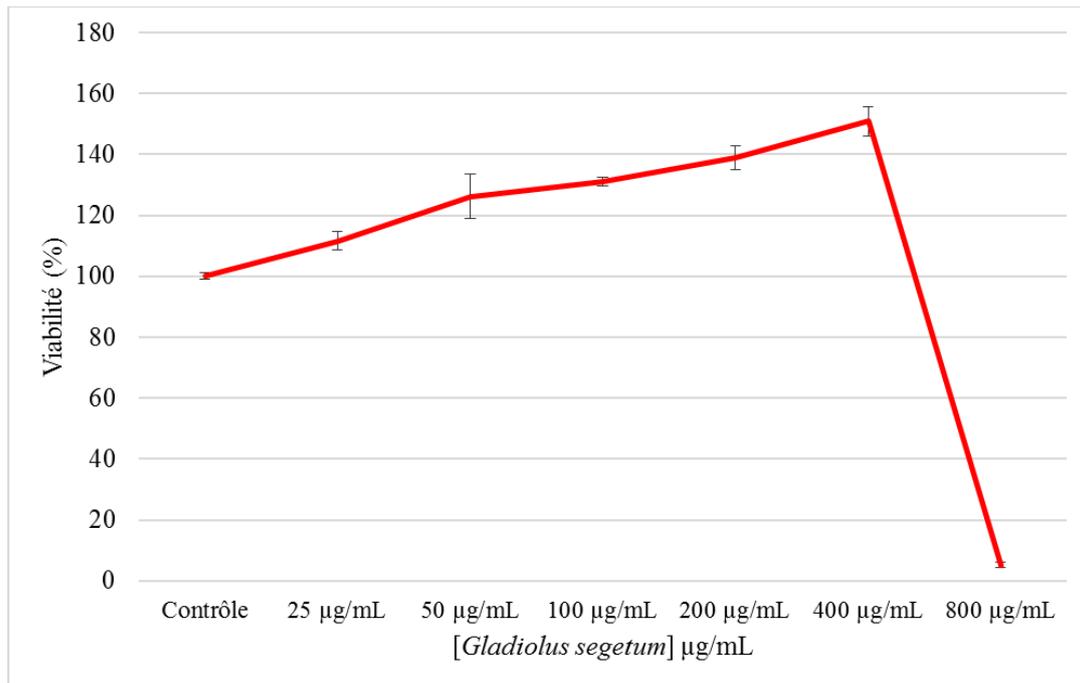


Figure 23. Activité mitochondriale des THP-1 exposées à *Gladiolus segetum* par le test Alamar bleu

II.5.5.2. Test WST-1

La lecture du test WST-1 illustre une hyperstimulation mitochondriale des cellules THP-1. Lorsque celles-ci sont exposées à une concentration située entre 25 et 400 µg/ml en extrait de *Gladiolus segetum*, l'activité mitochondriale est augmentée d'environ 250 %. Puis, à partir d'une concentration de 400 µg/ml, les cellules produisent moins de formazan, ce qui traduit une baisse de la viabilité, voie de la mort cellulaire (**Figure 24**).

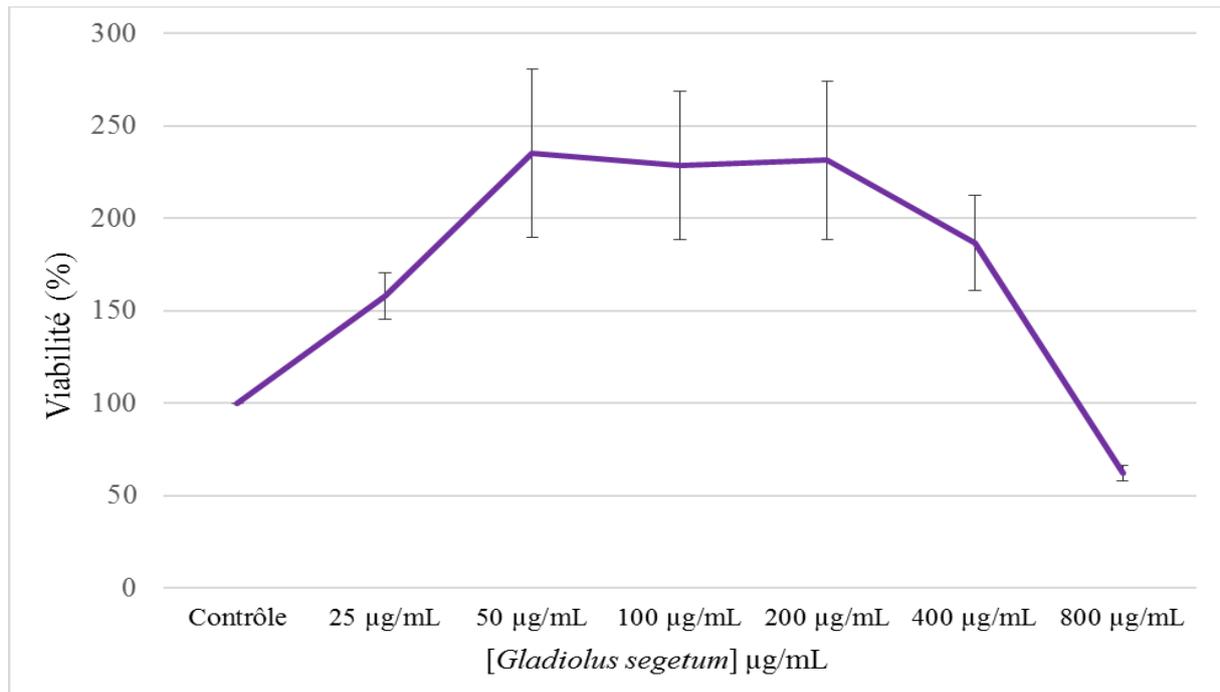


Figure 24. Activité mitochondriale des THP-1 exposées à *Gladiolus segetum* par le test WST-1

II.5.5.3. Test au bleu trypan

Le test au bleu trypan met en évidence un effet dose-dépendant. Notons que le pourcentage de viabilité cellulaire s'effondre lorsque les cellules THP-1 sont exposées à une concentration de 100 µg/ml en extrait du *Gladiolus segetum*, et passe de 100% à près de 0% (**Figure 25**).

Il se pourrait que l'extrait du *Gladiolus segetum* provoque l'apoptose des cellules, tandis que parallèlement, l'activité mitochondriale resterait détectable avec une hyperactivité proche de 250%.

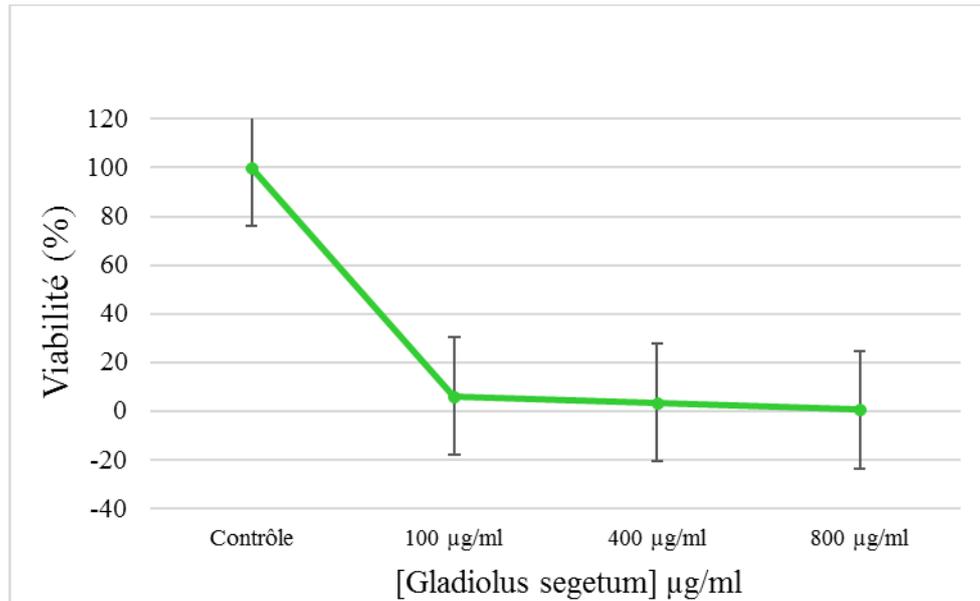


Figure 25. Activité cellulaire des THP-1 exposées à *Gladiolus segetum* par test au bleu trypan

II.5.5.4. Exploration des voies de signalisation de la mort cellulaire

Une surexpression significative du gène OPA1, de même que pour les gènes BCL-2, PDCD4, TNF- α et NCF1, ceci pour une exposition à 25 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait méthanolique. Les gènes CASP8 et SDHA présentent une tendance à la sous-expression, cependant les écarts-types sont trop grands pour conclure à une significativité. Pour une exposition à 100 $\mu\text{g/ml}$, les gènes OPA1, BCL-2 et TNF sont toujours surexprimés, mais de manière moins importante. Notons également que l'expression des gènes NCF1, CASP8, PDCD4 et SDHA n'est pas significative (**Figure 26**).

L'activité de la protéine caspase 3 est exprimée à 140% pour une exposition à 25 $\mu\text{g/ml}$, et 120% pour une exposition à 100 $\mu\text{g/ml}$. Cette surexpression a tendance à diminuer légèrement lorsque les concentrations augmentent (**Figure 27**).

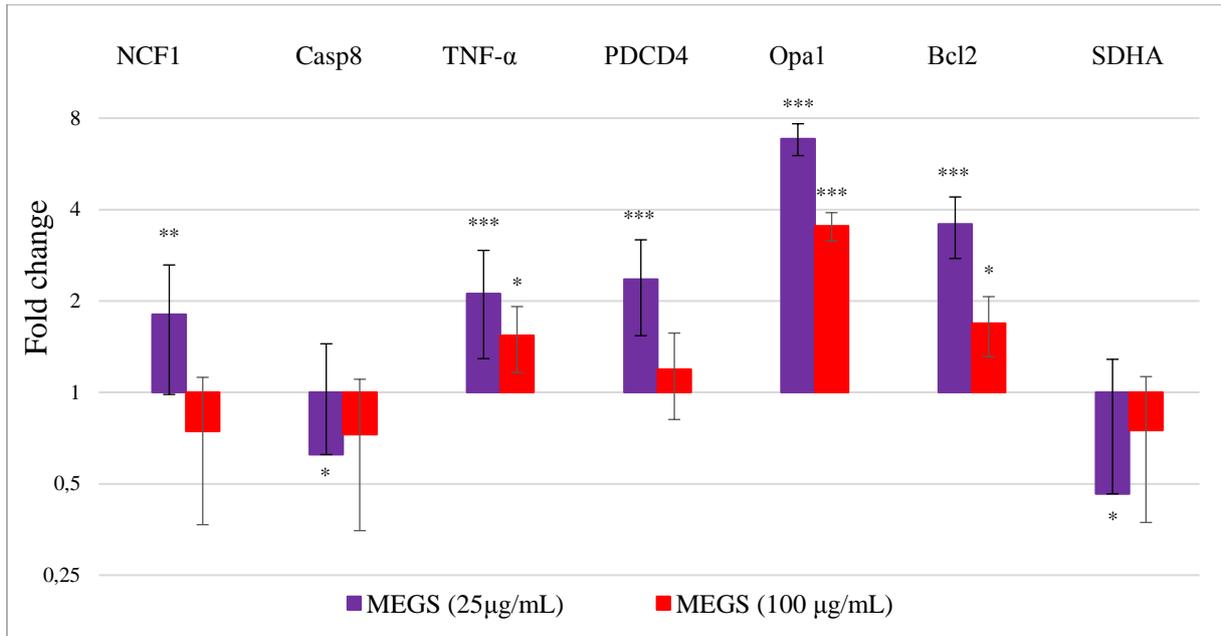


Figure 26. Etude de l'expression des gènes des THP-1 exposées à *Gladiolus segetum* (25 μg/ml/100 μg/ml)

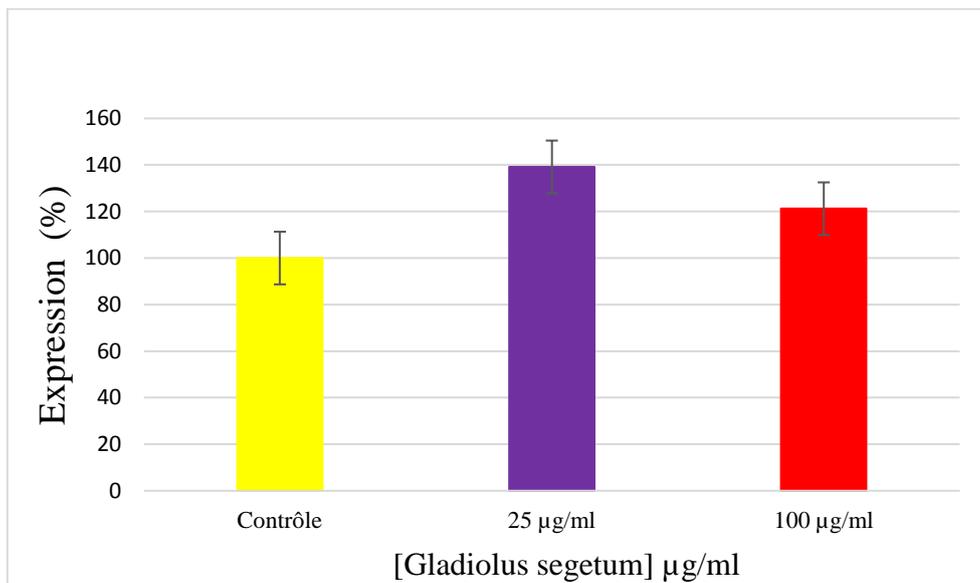


Figure 27. Mesure de l'activité de la protéine caspase 3 des THP-1 exposées à *Gladiolus segetum*

Après 4h, les gènes OPA1, NCF1, BCL2, PDCD4 et TNF-α étaient significativement surexprimés dans les cellules humaines pour une exposition à 25 μg/ml de MEGS. Au contraire, les gènes pro-apoptotiques CASP8 et du stress oxydatif SDHA étaient significativement sous-exprimés.

Pour une exposition à 100 µg/ml, OPA1, Bcl2 et TNF- α étaient significativement surexprimés mais moins importants, alors que l'expression de NCF1, CASP8, PDCD4 et SDHA n'était pas significativement modifiée.

Il y a plusieurs observations que la surexpression de Bcl2 peut ralentir la croissance cellulaire et favoriser la mort cellulaire (**Borner.,1995 ; Shinoura et al.,1999**). L'expression excessive du gène OPA1 peut être liée à l'hyperactivité mitochondriale observée dans les tests de cytotoxicité. De plus, la surexpression de l'OPA1 ne protège pas contre l'apoptose, la toxicité peut être liée à un stress oxydatif induit (**Nel et al.,2006**). L'interaction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec les lipides, les protéines ou l'ADN peut expliquer les effets cytotoxiques de l'EMGS. Un tel stress oxydatif pourrait activer des voies de signalisation spécifiques, notamment des MAP kinases et des facteurs de transcription sensibles au potentiel rédox comme NF- κ B, conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cela peut expliquer l'augmentation de l'expression du TNF- α (**Ronzani et al.,2014**).

La physiologie mitochondriale est étroitement liée aux processus apoptotiques cellulaires (**Kroemer et Reed.,2000**). CASP3 est un régulateur bien connu de l'apoptose induite par les mitochondries, qui clive de nombreuses protéines mitochondriales anti-apoptotiques (**Mancini et al.,1998**).

La caspase-3 est exprimée dans le tissu humain, y compris le foie et dans les lignées cellulaires humaines (**Fernandes-Alnemri et al.,1994 ; Krajewska et al.,1997**). L'expression et la perte d'expression de la caspase-3 ont été rapportées dans diverses lignées cellulaires et malignités (**Kolenko et al.,1999 ; Chhanabhai et al.,1997 ; LI et al.,1997**).

Il a été montré que les composés phénoliques sont connus par leurs différentes activités biologiques telles que la cytotoxicité envers les cellules cancéreuses à savoir les anthraquinones (**Chi-Huang, 2005 ; Kamiya, 2010**), les flavonoïdes (**Brusselmans et al., 2005**) et certaines molécules triterpéniques comme l'acide bétulinique et l'acide ursolique qui ils présentent une activité cytotoxique contre diverses lignées de cellules cancéreuses (MRC-5 et MCF-7) (**Damle et al., 2013**). Une étude présentée par **Abdessemed** en 2014 montre que la plante *Gladiolus segetum* possède une cytotoxicité vis-à-vis de fibroblastes humains MRC-5. L'effet anticancéreux de cette plante contre les THP-1 peut être du à la présence de ces composés bioactifs.

II.6. Evaluation des activités biologiques *in vivo*

II.6.1. Test de toxicité aiguë

La toxicité aiguë est généralement définie comme la réaction indésirable survenant immédiatement ou peu de temps après une exposition unique ou brève à une substance ou à des substances (Rhodes et.,1993).

Les rattes albinos Wistar traitées dans les conditions de la toxicité aiguë n'ont montrés aucun signe de toxicité pendant la période de l'étude en comparaison avec les animaux témoins.

L'administration par voie orale de la dose 2000 mg/Kg p.c. de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* (EMGS) n'induit aucun signe visible de toxicité ou mort instantanée chez les rates testées au cours de la période d'observation. Les animaux n'ont pas montré de changements dans le comportement général ou d'autres activités physiologiques.

Les paramètres hématologiques et biochimiques du groupe traité avec l'EMGS et du groupe contrôle sont présentés dans les **tableaux 21** et **22**. Aucune différence significative n'a été constatée ($P > 0,05$) après le traitement avec la dose thérapeutique (2000 mg /Kg p.c.) par rapport au contrôle. Il n'y avait pas d'effet sur l'évaluation de la fonction rénale et hépatique, les valeurs de l'urée de la créatinine, de l'ALAT et de l'ASAT n'ont connu aucun changement significatif par rapport au groupe témoin.

Concernant le poids relatif des organes de façon globale, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre le groupe traité et le groupe témoin (**Tableau 23**).

Sur le plan histologique nous avons constaté qu'il n'y avait pas de changements histopathologiques après l'administration de l'EMGS a la dose 2000 mg /Kg p.c. après une période de 14 jours en comparant avec le groupe contrôle. En effet, ce qui est conforme avec le bilan biochimique et hématologique (**Figure 28 et 29**).

Tableau 21. Effet de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* sur les paramètres hématologiques chez le rat dans la toxicité aigüe

Paramètres hématologique	Contrôle	EMGS 2000 mg/kg p.c
GR (10 ⁶ xµL)	7.35±0.14	7.59±0.20ns
MCV(fL)	55.68±0.85	55.8±0.69ns
RDW(fL)	13.18±0.26	15.16±1.06ns
HCT (%)	40.92±0.48	42.26±1.61ns
PLT (10 ³ /µL)	614.8±61.76	654.4±81.03ns
MPV(fL)	6.18±0.09	6.78±0.44ns
GB (10 ³ /µL)	6.10±0.69	6.22±0.70ns
HGB(g/dL)	14.5±0.17	14.7±0.41ns
MCH(pg)	19.74±0.25	19.38±0.15ns
MCHC(g/dL)	35.46±0.17	34.84±0.48ns
Lymphocyte no	4.24±0.51	4.64±0.75ns
Lymphocyte %	69.08±2.43	66.2±2.37ns

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM ; n = 5. ns : non significatif par rapport au témoin.

Tableau 22. Effet de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* sur les paramètres biochimiques chez le rat

Paramètres biochimiques	Contrôle	EMGS 2000 mg/kg p.c
Profil Lipidique		
Cholesterol (mmol/L)	0.57±0.04	0.66±0.02ns
Triglycerides (mmol/L)	0.83±0.10	1.5±0.32 ns
HDL-Cholesterol (mmol/L)	0.50±0.03	0.56±0.04ns
LDL-Cholesterol (mmol/L)	0.06±0.01	0.08±0.02ns
Glucose (g/L)	0.67±0.03	0.72±0.01 ns
Profil hépatique		
ASAT (U/L)	131±5.54	112±1.81 ns
ALAT (U/L)	86.2±7.13	83.2±2.67ns
Total bilirubin (mg/dL)	0.76±0.04	0.58±0.03ns
Profil Rénal		
Urée (mg/L)	0.30±0.01	0.31±0.01ns
Créatinine (mg/L)	4±0.01	3±0.00ns

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM ; n = 5. ns : non significatif par rapport au témoin.

Tableau 23. Le poids relatif des organes des rats

Poids relatif des organes (Pr)	Contrôle	EMGS 2000 mg/kg p.c
Foie	3,89±0,35	4,07±0,3 ns
Reins	0,32±0,03	0,36±0,02 ns

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM; n = 5. ns: non significatif par rapport au témoin.

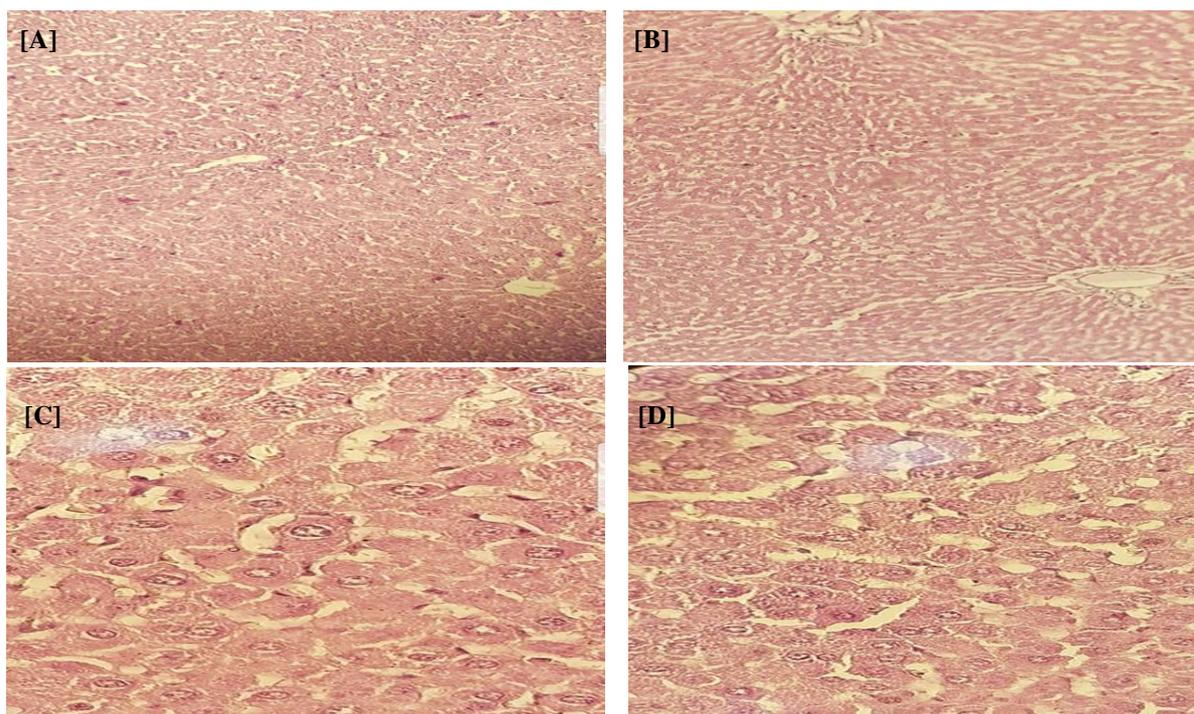


Figure 28. Coupes histologiques des tissus hépatiques du groupe contrôle et du groupe traité avec l'EMGS [2000 mg/kg p.c] [A] groupe contrôle (10X), [B] groupe traité par l'EMGS (10X) [C], groupe contrôle (40X), [D] groupe traité par l'EMGS (40X).

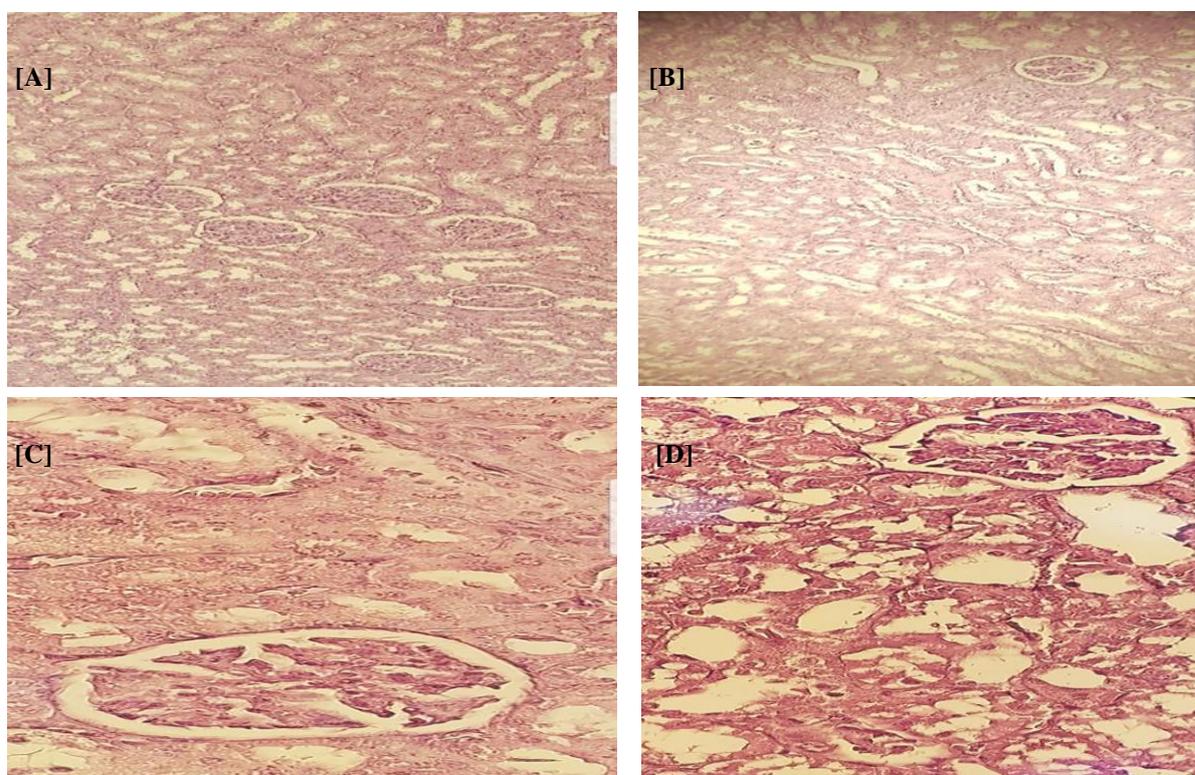


Figure 29. Coupes histologiques des tissus rénales du groupe contrôle et du groupe traité avec l'EMGS [2000 mg/kg p.c] [A] groupe contrôle (10X), [B] groupe traité par l'EMGS (10X) [C], groupe contrôle (40X), [D] groupe traité par l'EMGS (40X).

L'évaluation de la toxicité aigüe est la première étape dans l'investigation toxicologique des substances inconnues. L'index de la toxicité aigüe est la DL50.

La DL50 a été trouvée supérieure à 2000 mg /Kg p.c. pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne du *Gladiolus segetum*, c'est une indication que cet extrait est relativement non toxique par voie orale.

Après l'administration de l'EMGS, les analyses biochimiques ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation significative ($P \geq 0,05$) dans les différents paramètres biochimiques chez les différents groupes d'animaux traités et contrôle. Comme il n'y a pas un changement au niveau du taux de glucose et de cholestérol ceci témoigne qu'il n'y a aucun effet sur le métabolisme des lipides et les hydrates de carbone chez les rats (**Hilaly et al., 2004**).

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

La fonction rénale est évaluée par le dosage sérique ou urinaire de l'urée, créatinine et les électrolytes. L'élévation de la créatinine sérique est un bon indicateur de la fonction rénale (**Atsamo et al., 2011**).

Les analyses hématologiques ont montré qu'il n'y a aucun changement au niveau des paramètres hématologiques ($P > 0,05$) chez les différents groupes d'animaux traité et contrôle. Le système hématopoïétique est très sensible aux substances toxiques et il très important dans la physiologie de l'être animal ainsi que de l'être humain (**Adeneye et Adokiye, 2008**).

II.6.2. Evaluation de l'activité antiulcéreuse

L'étude a permis d'évaluer le degré de protection de la muqueuse gastroduodénale par l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* contre les ulcérations causées par l'éthanol à 90%. Les indices d'ulcères et les pourcentages de protection sont présentés dans le **tableau 24** et la **figure 30**.

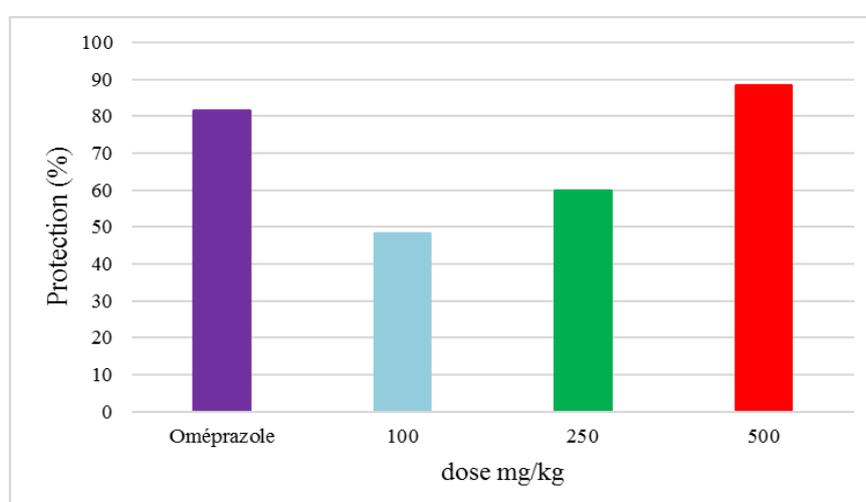
L'administration de différentes doses de l'EMGS (100,250,500mg/kg) a montré une réduction significative ($P < 0,05$) de l'indice d'ulcère avec une augmentation du pourcentage de protection d'une manière dose-dépendante.

L'EMGS a la dose 500mg/kg a montré la plus forte activité de protection de la muqueuse gastrique avec 88,33% supérieur à celui d'oméprazole (81,66%).

Tableau 24. Activité antiulcéreuse de l'EMGS sur l'ulcère induit par l'éthanol chez le rat.

Groupes	Traitement	Dose(mg/kg)	Ulcer Index (UI)
I	Controle	10 (mL/kg)	3.4±0.245
II	EMGS	100 mg	1.8±0.3742**
III	EMGS	250 mg	1.4±0.400***
IV	EMGS	500 mg	0.4±0.2449***
V	Oméprazole	30 mg	0.6±0.2449***

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM ; n = 5 ; * p <0,05, ** p <0,01 et *** p <0,001 par rapport au témoin.

**Figure 30.** Pourcentage de protection du EMGS contre l'ulcère induit par l'éthanol chez le rat.

Les ulcères sont causés par un déséquilibre entre les facteurs agressifs et défensifs de la muqueuse gastrique. Différents agents thérapeutiques, y compris les extraits des plantes, sont utilisés pour inhiber la sécrétion d'acide gastrique ou pour stimuler le mécanisme de défense des muqueuses. Le mécanisme de défense de la muqueuse stimule en augmentant la production de mucus protégeant les cellules épithéliales de surface ou interférant avec la synthèse de prostaglandines (Ghangale et al.,2009).

Les mécanismes impliqués dans les lésions gastriques induites par l'éthanol sont complexes et nombreux, avec vasoconstriction, dilatation artérielle (Oates et Hakkinen.,1988 ; Llesuy et Repetto.,2002). Il a été rapporté que l'éthanol cause des perturbations dans la sécrétion gastrique, des dommages à la muqueuse, des altérations dans la perméabilité, l'épuisement de la muqueuse gastrique et la production de radicaux libres. Ceci est attribué à la libération d'anion superoxyde et de radicaux libres hydroperoxy pendant le métabolisme de l'éthanol, car les

radicaux libres dérivés de l'oxygène sont impliqués dans le mécanisme de l'ulcération aiguë et chronique de la muqueuse gastrique (**Jude et Paul.,2009**).

La formation de lésions gastriques induite par l'éthanol peut être due à la stase dans le flux sanguin gastrique qui contribue au développement de l'hémorragie et aux aspects nécrotiques des lésions tissulaires. L'alcool pénètre rapidement dans la muqueuse gastrique, causant apparemment des dommages aux cellules et à la membrane plasmique, ce qui entraîne une perméabilité accrue de la membrane intracellulaire au sodium et à l'eau. L'accumulation intracellulaire massive de calcium représente une étape majeure dans la pathogenèse des lésions de la muqueuse gastrique. Cela entraîne la mort cellulaire et l'exfoliation de l'épithélium de surface (**Raju et al.,2009**).

L'EMGS protègent la muqueuse gastrique des rats de l'ulcération induite par l'éthanol peut être due à la fois à la réduction de la sécrétion d'acide gastrique et à la cytoprotection gastrique. L'étude phytochimique a permis de déterminer la présence des saponosides et des flavonoïdes. Les saponosides sont utilisés par plusieurs végétaux dans leur système de défense antimicrobienne. Le grand intérêt de ces composés dans l'activité antiulcéreuse gastrique est l'élimination de *Helicobacter pylori*. Certains saponosides également confèrent à la plante des propriétés anti-inflammatoire et antalgique (**Bruneton 1999 ; Fatima et al.,2016**), ce qui est également bénéfique dans le cadre de l'ulcère gastrique.

Les flavonoïdes font partie des matériaux cytoprotecteurs pour lesquels l'efficacité générique anti-ulcéreuse a été largement confirmée. Ils protègent la muqueuse gastrique contre une variété d'agents génériques ulcéreux par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes d'action, principalement des propriétés de piégeage radicalaire, antioxydantes, une production accrue de mucus, une action antisécrétoire, la réduction de l'ulcère par la protection des cellules gastriques et la réduction des dommages gastro-intestinaux, en inhibant la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel (**Lamyaa, 2008**).

Les résultats obtenus avec *Gladiolus segetum* apportent donc une justification à l'utilisation traditionnelle de cette plante dans le traitement de l'ulcère gastrique et la mise au point d'un nouveau phytomédicament contre l'ulcère gastrique à base de *Gladiolus segetum*.

II.6.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les résultats de l'effet de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* et de diclofénac sodium sur l'évolution de l'œdème en fonction du temps sont représentés dans **la figure 31**.

L'œdème de la patte induit par l'injection de l'ovalbumine a été réduit de manière significative à différentes doses de l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum*. L'effet inhibiteur de l'extrait a été dose-dépendant à toutes les heures de la mesure l'épaisseur de la patte (**Tableau 25**).

Tableau 25. Activité anti-inflammatoire d'EMGS sur l'œdème induit par l'ovalbumine chez le rat.

Traitement	Dose (mg/kg)	Δ Oedème de la patte (mm)				
		1h	2h	3h	4h	5h
Contrôle	10ml/kg	5.43±0.10	4.926±0.21	4.642±0.15	4.09±0.17	3.802±0.13
Diclofénac sodium	30	4.96±0.55**	3.81±0.12**	2.71±0.08***	1.946±0.07***	1.24±0.03***
EMGS	100	5.04±0.12 ns	4.396±0.22ns	3.828±0.11***	3.082±0.12***	2.55±0.09***
EMGS	250	5.014±0.10*	4.196±0.18*	3.546±0.10***	2.69±0.11***	2.24±0.07***
EMGS	500	4.87±0.09**	4.06±0.17*	3.38±0.11***	2.18±0.10***	1.8±0.07***

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM ; n = 5 ; * p <0,05, ** p <0,01 et *** p <0,001 par rapport au témoin.

L'inflammation est une réponse biologique complexe de l'invasion des tissus vasculaires par un agent infectieux, une provocation antigénique, chimique, physique ou des dommages traumatiques. Bien que l'inflammation soit un mécanisme de défense, l'inflammation est un mécanisme de défense. Les événements complexes et les médiateurs impliqués dans les réactions inflammatoires peut induire, maintenir ou aggraver de nombreuses maladies (**Ferrero-Miliani et al.,2007**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) possèdent une action anti-inflammatoire pour traiter plusieurs affections inflammatoires, y compris la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose et les troubles musculo-squelettiques, mais l'utilisation prolongée des AINS a certains effets indésirables associés tels que nausées, rétention de liquide, saignements et lésions gastriques (**Abebe.,2007**). Par conséquent, de nouveaux médicaments anti-inflammatoires dépourvus de ces effets secondaires font l'objet de recherches comme solutions de rechange aux AINS.

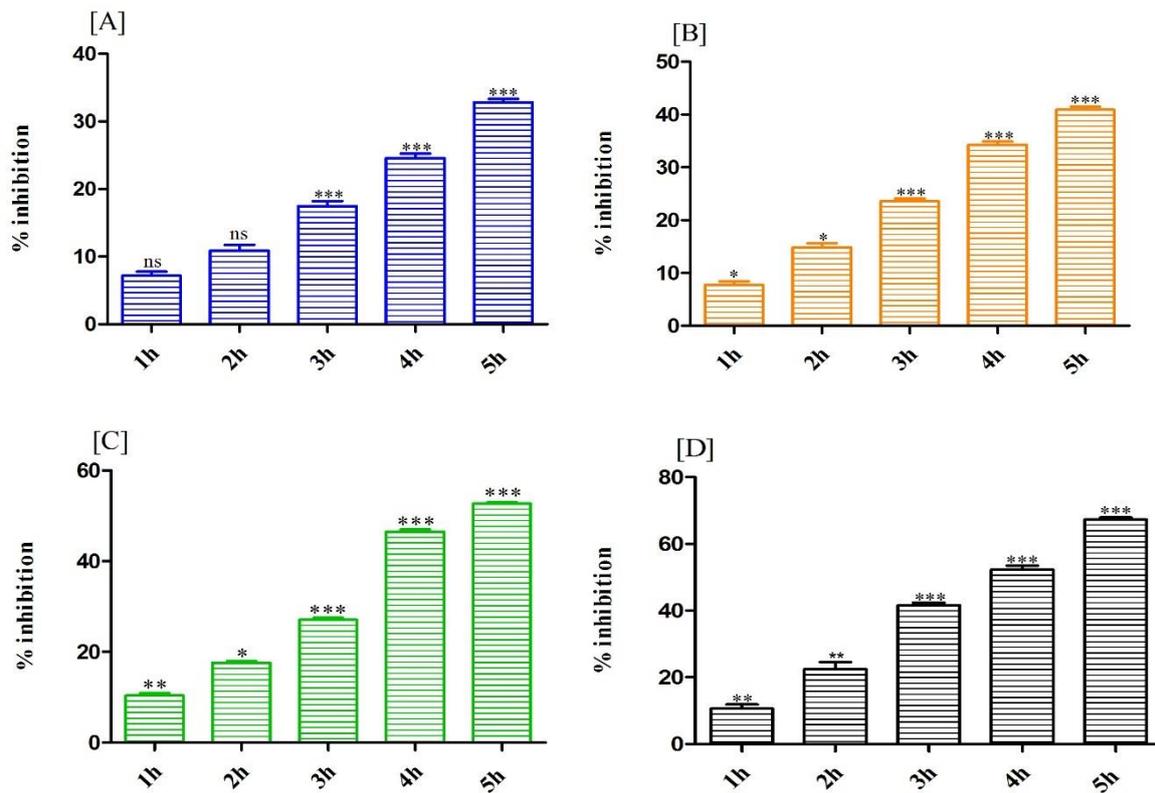


Figure 31. Effet anti-inflammatoire du EMGS sur l'œdème induit par l'ovalbumine chez le rat.; [A] 100, [B] 250, [C] 500 mg / kg de poids corporel. et [D] dichlofénac. Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM (n = 5). * p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001 par rapport au témoin.

Des études antérieures avaient indiqué que l'utilisation de l'ovalbumine comme agent phlogistique provoque l'œdème. Les méthodes d'œdème des pattes induit par la carraghénine et l'ovalbumine conviennent aux agents de dépistage de l'activité anti-inflammatoire, qui sont fréquemment utilisés pour évaluer l'effet antiœdémateux des produits naturels (**Akah et al.,1993 ; Amos et al.,2002**).

Plusieurs médiateurs inflammatoires comme le complément, l'histamine, les kinines, les prostaglandines et les cytokines pro-inflammatoires ont été suggérés pour jouer un rôle dans le mécanisme de l'inflammation (**Rosa et al.,1971 ; Hischelmann et al.,1981**). L'œdème, qui se développe après l'injection d'ovalbumine, est un événement biphasique. La phase précoce est attribuée à la libération d'histamine et de sérotonine jusqu'à 2 h. Alors que la phase ultérieure, de 3 à 5 h après l'injection de l'irritant, est induite par la bradykinine, la protéase, les prostaglandines (**Wallace.,2002**).

L'œdème induit par l'ovalbumine, semble être médié par l'histamine et sérotonine. Des processus inflammatoires dans lesquels les mastocytes sont inhibés par des composés antihistaminiques et anti-sérotoniques.

L'effet anti-œdémateux démontré par l'EMGS a été significatif lors de la première phase de développement de l'œdème et maintenu de manière significative en deuxième phase du développement de l'œdème, ce qui suggère un effet inhibiteur sur la libération de substances douloureuses actives telles que l'histamine, la sérotonine, les polypeptides ou les prostaglandines. On suppose qu'au moins certains de ces médiateurs sont sujets d'inhibition par l'EMGS par l'intermédiaire des métabolites secondaires, les flavonoïdes tels que le kaempférol ont un effet inhibiteur puissant sur les enzymes impliquées dans la production des médiateurs chimiques de l'inflammation et du métabolisme d'acide arachidonique (Oweyele et al., 2005 ; Saleem et al., 2011). L'activité anti-inflammatoire du kaempférol peut être médiée par plusieurs mécanismes d'action. L'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-B) augmente l'expression de cytokines, chimiokines et enzymes pro-inflammatoires (par exemple, TNF- α , IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS) et plusieurs autres. Des travaux ont montré que le kaempférol inhibe l'activité de NF-B (Garcia-Mediavilla et al., 2007 ; Jung et al., 2007 ; Hamalainen et al., 2007 ; Lin et al., 2010). Plusieurs études ont également montré que le kaempférol peut inhiber l'activité du TNF et l'expression de l'IL-1 et de l'IL-8 (Kowalski et al., 2005 ; Takano-Ishikawa et al., 2003 ; Kempuraj et al., 2005 ; Rao et al., 2008 ; Lee et al., 2009).

II.6.4. Evaluation de l'activité Antipyrétique

Le **tableau 26** montre l'effet antipyrétique de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* sur l'hyperthermie induite par l'injection d'une solution de la levure de bière (20 %) chez le rat.

L'injection de la suspension de levure de bière a provoqué une élévation de température rectale après 18 heures. L'EMGS (500 mg/kg) antagonise significativement l'hyperthermie induite par la levure de bière après une heure et persiste jusqu'à la 5^{ème} heure qui suivent l'injection de la levure de bière. Ces effets sont surtout significatifs à la 3^e et à la 4^e heures qui suivent l'injection de la levure de bière. La dose de 100 mg/kg de l'EMGS est inefficace.

Tableau 26. Activité antipyrétique de l'EMGS sur la pyrexie induite par la levure de bière chez le rat.

Traitement	Dose(mg/kg)	La température rectale (% d'inhibition)						
		T0	18 h	19h	20h	21h	22h	23h
Contrôle	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
EMGS	100	36.16±0.14	38.56±0.09	38.2±0.08 (7,58%)	38.1±0.07 (14,91%)	37.86±0.08 (30,02%)	37.96±0.08 (24,37%)	38±0.03 (21,49%)
	250	36.32±0.41	39.36±0.24	38.76±0.06 (10,63%)	38.62±0.10 (19,91%)	38.2±0.08** (43,79%)	38.34±0.13*** (38,14%)	38.58±0.06*** (31,81%)
	500	36.68±0.10	38.44±0.13	37.44±0.11*** (20,71%)	37.32±0.10* (25,85%)	37.48±0.09*** (58,89%)	37.8±0.07*** (39,42%)	37.9±0.07*** (32,33%)
Paracétamol	150	35.96±0.23	38.58±0.15	37.36±0.14*** (46,49%)	37.3±0.15*** (48,66%)	37.15±0.09*** (54,11%)	36.70±0.22*** (71,99%)	36.44±0.22*** (81,36%)

Valeurs exprimées en moyenne ±SEM. (n=5). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

L'injection intrapéritonéale de la levure de bière a 20% a provoqué une élévation de la température chez les rats, cette élévation est liée à la libération des cytokines (TNF- α , IL-1, IL6...) qui ayant atteint les vaisseaux sanguins stimulent la biosynthèse des prostaglandines aux environs du centre hypothalamique thermorégulateur (**Ouédraogo et al.,2012**).

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

L'hyperthermie induite par l'injection de la levure est liée à la libération des cytokines (TNF α , IL1 β , IL6) qui ayant atteint les vaisseaux sanguins stimulent la biosynthèse des prostaglandines (PGE2) aux environs du centre hypothalamique thermorégulateur.

L'EMGS peut en partie réduire la pyrexie en réduisant la concentration cérébrale de prostaglandine E2 en particulier dans l'hypothalamus grâce à son l'action sur COX-2 ou en améliorant la production des substances antipyrétiques du corps telles que la vasopressine et l'arginine (**Chandrasekharan, 2002**).

Les propriétés antipyrétiques des extraits peuvent être dues aux saponosides, qui selon (**Gepdiremen et al. 2004**) sont de puissants inhibiteurs des prostaglandines et aux flavonoïdes qui exercent un effet antipyrétique en supprimant le TNF- α (**Chang et al., 2007**).

La régulation de la température corporelle exige un équilibre sensible entre la production et la perte de la chaleur et l'hypothalamus règle le point de réglage pour rendre la température à sa valeur normale (Ushikubi et al., 1998).

II.6.4. Evaluation de l'activité diabétique

II.6.4.1. Test de tolérance orale au glucose

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose effectué chez des rats normaux par l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* à la dose 250mg/kg et 500mg/kg sont illustrés dans le **tableau 27**.

Il est bien clair que notre extrait a diminué le taux de glucose à la dose de 500 mg/kg d'une manière significative ($P \leq 0.001$) durant les 120 premières minutes qui suivent la prise d'une dose de glucose de 4g/kg, ce qui veut dire que l'extrait EMGS a amélioré le taux de la glycémie post-prandiale et ils l'ont rendu inférieure à sa valeur normale.

Tableau 27. Tolérance au glucose pour le groupe contrôle et les groupes traités par *Gladiolus segetum*.

Traitement	Dose (mg/kg)	% Inhibition		
		T60	T90	T120
Contrôle	10ml/kg	48,90±2,74	59,19±5,38	69,70±5,55
EMGS	250	51,93±5,16ns	60,29±5,35ns	70,25±7,58ns
EMGS	500	88,01±4,50***	103,0±4,19***	112,6±6,07***

Valeurs exprimées en moyenne ±SEM. (n=5). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

II.6.4.2. Effet antidiabétique aigüe

Les résultats de l'activité antidiabétique après administration sous-cutanée d'une dose unique d'alloxane (150mg/kg) sont représentés dans le **tableau 28**.

L'EMGS a un effet hypoglycémique significatif à 3 doses du traitement. L'administration de l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* à la dose 500 mg/kg entraîne une baisse de la glycémie (42,75%) au terme des 2 premières heures suivant le traitement. L'effet hypoglycémiant de l'extrait EMGS étant plus significatif.

Tableau 28. Activité antidiabétique d'EMGS sur le diabète induit par l'alloxane chez le rat.

Traitement	Dose (mg/kg)	% Reduction			
		T30	T60	T90	T120
Contrôle	10ml/kg	1,72±0,29	2,57±0,38	-0,18±0,38	-2,69±0,44
Glibenclamide	2.5mg/kg	35,04±0,45***	39,33±1,01***	45,08±0,95***	56,20±0,71***
EMGS	100	4,96±0,55**	8,87±0,55***	15,85±1,26***	19,26±1,28***
EMGS	250	6,26±0,83***	14,12±1,10***	26,10±0,76***	30,34±1,14***
EMGS	500	14,21±0,86***	21,87±0,92***	26,90±0,96***	42,75±0,34***

Valeurs exprimées en moyenne ±SEM. (n=5). Les résultats sont comparés par rapport au contrôle *P≤0.05, ** P≤0.01,*** P≤0.001.

L'EMGS est doué d'une activité antihyperglycémiant remarquable. L'amélioration de la glycémie postprandiale est due à l'utilisation de glucose par les tissus périphériques d'où l'augmentation de la tolérance au glucose (**Islam et al., 2009**).

Les enzymes α -amylase et α -glucosidase sont les enzymes clés responsables de la digestion des glucides alimentaires en glucose, le glucose libéré est absorbé par les entérocytes intestinaux via des transporteurs spécifiques.

L'inhibition des enzymes digestives ou les transporteurs de glucose par les polyphénols permettrait de réduire le taux de libération de glucose et son absorption au niveau de l'intestin grêle et par conséquent l'inhibition de l'hyperglycémie postprandiale (**Hanhineva et al., 2010**). D'une part, L'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum* agit significativement sur la réponse des rats à la charge du glucose en améliorant la pénétration du glucose dans les cellules périphériques ou bien en stimulant la sécrétion d'insuline. 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-dependent insulintropic peptide (GIP). Ces hormones intestinales provoquent la sécrétion de l'insuline glucose-dépendante et inhibent la sécrétion du glucagon (**Baggio et Drucker, 2004**). Cet éventuel mécanisme est proche de celui des sulfamides hypoglycémiant qui se fixent sur un récepteur spécifique au niveau des cellules β et stimulent directement la sécrétion d'insuline (**Bloomgarden, 2004 ; Malher et Alder, 1998**). La metformine, un agent antidiabétique, diminue l'hyperglycémie en potentialisant l'effet insulinosécrétagogue du GLP-1 (**Bloomgarden, 2004**).

Le mécanisme possible par lequel l'extrait méthanolique apporte son action anti hyperglycémique peut être par l'induction de la sécrétion d'insuline pancréatique à partir de cellules- β d'îlots de Langerhans ou grâce au transport accru du glucose sanguin vers les tissus périphériques (**Pari et Latha ., 2002**).

L'effet de l'extrait EMGS sur la réduction de la glycémie des rats soumis à une hyperglycémie permanente pourrait être lié à la présence des flavonoïdes comme il a été souligné par certains auteurs (**N'Diaye et al. 2008 ; Olagbende-Dada et al. 2011**).

Les composés phénoliques s'avèrent être des agents anti hyperglycémiques efficaces (**Abdelmoaty et al., 2010; Hossam et al., 2011**). Il a été rapporté que les flavonoïdes, les acides phénoliques empêchent les enzymes α -amylase et β -glucosidase qui sont des enzymes clés dans le métabolisme des glucides (**Hanhineva et al., 2010**) et la réduction du diabète en inhibant l'enzyme aldose réductase (**Chaudhary, 1983 ; Ong and Khoo., 1997 ; Ong and Khoo.,2000**).

En plus, 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 (**Lean et al. 1999 ; Ford et al. 1999**).p

Dans l'extrait méthanolique du *Gladiolus segetum*, en plus des flavonoïdes, on a noté la présence des saponines qui sont connues pour déclencher une activité hypoglycémiant directe contrairement aux agents indirects tels que les sulfonyles qui agissent en stimulant les cellules bêta pancréatiques à libérer plus d'insuline (**Chang-yong et al., 2010; Abdel-Hassan et al., 2000**).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Les ressources naturelles du règne végétal restent la source fiable et capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. La recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation comme alternative des molécules de synthèse.

L'analyse qualitative a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tritérpènes, des saponines et des anthraquinones.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols que les autres extraits.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a révélé aussi que l'extrait méthanolique est plus riche en flavonoïdes que les autres extraits.

Le pouvoir antioxydant des différents extraits du *Gladiolus Segetum* est confirmé par six méthodes : DPPH, ABTS, la chélation des ions métalliques, β -carotène, CUPRAC, FRAP.

En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de l'acétate d'éthyle et de méthanol.

Les extraits testés du *Gladiolus segetum in vitro* ont montrés un effet anti-inflammatoire par rapport à la dénaturation de sérum bovin albumine (BSA) ainsi une activité antidiabétique par l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase.

La létalité observée des extraits de la plante *Gladiolus segetum* dans les larves indique la présence de puissants composants cytotoxiques et probablement antitumoraux dans cette plante.

A propos de l'activité anticancéreuse, l'extrait méthanolique semble présenter une toxicité vis-à-vis des cellules THP-1, notamment en ce qui concerne les processus d'apoptose. En effet, il provoque des dérégulations génétiques dont les répercussions sont observables à l'échelle cellulaire. Nous notons également une altération des fonctions mitochondriales ; celles-ci étant hyperstimulées, les conséquences sur les cellules ne peuvent être que néfaste.

L'évaluation des activités biologiques *in vivo* de l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* en utilisant des rats de type wistar vis-à-vis aux pathologies très répandues telles que l'ulcère,

l'inflammation, la fièvre et le diabète a montré qu'il peut l'exploiter dans le domaine pharmaceutique.

Selon les résultats obtenus, on peut conclure que les extraits de la partie aérienne de cette plante ont montré des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* : antioxydante, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique et anticancéreuse.

Les résultats obtenus constituent une justification scientifique de l'usage traditionnel du *Gladiolus Segetum* et confirment la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreuses maladies. Cependant d'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- La séparation et la purification des molécules responsables de différentes activités biologiques afin d'identifier leurs structures chimiques en vue d'étudier la possibilité de leurs synthèse chimique d'une part et leurs modes d'action d'autre part.
- Faire une cytométrie en flux est nécessaire pour déterminer le mode de la mort cellulaire.
- L'étude de l'activité anti-cancéreuse *in vivo*.

Références Bibliographiques

1. **Abdel-Hassan I.A., Abdel-Barry J.A., Mohammeda S.T.(2000).** The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J.Ethnopharmacol.*, 71: 325–330.
2. **Abdelmoaty M.A., Ibrahim M.A., Ahmed N.S., Abdelaziz M.A .(2010).**Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of Quercetin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.*, 25 (2): 188-192.
3. **Abdessemed D., Dibi A.(2013).** Secondary metabolite from *Gladiolus segetum*. *J Chem Pharm Res*;5(12):939-41.
4. **Abdessemed D., Fontanay S., Duval R.E., Mattar D.L., Dibi A.(2011).** Two New Anthraquinone Glycosides from *Gladiolus segetum*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 36(1) (2011) 57-62.
5. **Abebe W.(2002).** Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther*;27(6):391-401.
6. **Abeysekera W.K.S.M., Chandrasekara A., Liyanage P.K.(2007).** Amylase and glucosidase enzyme inhibitory activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) an in vitro study. *Tropical Agriculture Research*, 19:128-135.
7. **Adarsh VM., Ajay KP., Kavitha D., Anurag KB. (2011).** Anti denaturation and antioxidant activities of annona cherimola in-vitro. *International Journal of Ppharma and Bio Sciences*;2(2):0975-6299.
8. **Adeneye A.A. et Adokiye S.B. (2008).** Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen- induced nephrotoxic rats, *J Ethnopharmacol*, 118:318–332.
9. **Agarwal S.K et al., (2000).** *Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*.72(1-2): p. 43-46.
10. **Akah P.A., Okogun J.I., Ekpendu T.O.(1993).** Antioedema and analgesic activity of *Diodia scandans* extract in rats and mice. *Phytother Res*;7(4):317-9.
11. **Akao T et al., (1996).** *A purgative action of barbaloin is induced by Eubacterium sp. strain BAR, a human intestinal anaerobe, capable of transforming barbaloin to aloemod in anthrone*. *Biol Pharm Bull*,19(1): p. 136-138.
12. **Albericio F.(2010).** De la conception du médicament à son développement : l'indispensable chimie. In : Bach, J.-F., Blanchard-Desce, M., Couvreur, P., Darel, F. *La chimie et la santé, au service de l'homme*. EDP Sciences, pp. 77-90.
13. **Al-Gabbiesh A., Kleinwächter M. and Selmar D.(2015).** Influencing the Contents of Secondary Metabolites in Spice and Medicinal Plants by Deliberately Applying Drought Stress during their Cultivation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8 (1) : 1 – 10.
14. **Ali A. A., Abdallah O. M.W.(1989).** Steglich, anthraquinone derivatives from *Gladiolus segetum*, *Phytochemistry*,28, 1,281-282.

15. **Ali A.M et al., (2000).** *Antiviral, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Anthraquinones Isolated from the Roots of Morinda elliptica.* Pharm. Biol.38: p. 298-301.
16. **Alves D.S et al., (2004).***Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin.* Biochemical Pharmacology.68: p. 549-561.
17. **Amos S., Chindo B., Edmond I., Akah P., Wambebe C., Gamaniel K.(2002).** Anti-inflammatory And anti-nociceptive effects of *Ficus platyphylla* extracts in mice and rats. J Herbs Spices Med;9(1):47-53.
18. **Anosike C.A, Obidoa O., Ezeanyika LUS.(2012).**The anti—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.
19. **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.
20. **Arnold H.J., & Gulumian M. (1984).** Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda.*Journal of Ethnopharmacology* 12: 35-74.
21. **Atsamo A.D., Nguenefacka T. B., Dattéb J. Y., Kamanyia A.(2011).** Acute and **Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W.(2002).** The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem Biophys.397(2):342-4.
22. **Bagad Y.M., Umarmkar A.R., Tatia A.U., Surana S.J. (2011).**Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *brideliaaairyshawii* (Euphorbiaceae). J pharm Res;4(5):1326-1332.
23. **Baggio L.L., Drucker DJ.(2004).** Glucagon-like paptide-1 and glucagon-like peptide-2. Best practice and research clinical endocrinology and metabolism; 18 (4):531-554.
24. **Baltz R.H.(2008).**Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Current Opinion in Pharmacology, 2008, vol. 8, n° 5, pp. 557-563.127.
25. **Barata L.E. S., Santos L. S., Ferri P. H., Phillipson J. D., Paine A., Croft S. L. (2000).** Antileishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. Phytochemistry 55, 589–595.
26. **Barnard D.L et al., (1992).** *Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus.* Antiviral Research.17(1): p. 63-77.
27. **Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira I.C.F.R.(2008).**Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem. 111, 61–66.

28. **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 (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*, 4(2) : 217- 225.
29. **Beniston N.T., Beniston W.S.(1984).** Fleurs d'Algérie (Entreprise nationale du livre, Alger.
30. **Benkhnigue O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. et Douira1 A.(2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.*, Vol. 53, pp.191-216 .
31. **Bertille B.(2011).** *Les Rubiacées : botanique, biochimie et plantes utiles*. Université de Lille II: Lille.
32. **Bhattacharya S.(2011).** Are we in the polyphenols era? *Pharmacognosy Res* 2011, 3: 147.
33. **Bhattacharyya S., Dudeja P.K., Tobacman J.K.(2010).** Tumor necrosis factor alpha-induced inflammation is increased but apoptosis is inhibited by common food additive carrageenan. *J. Biol. Chem.* 285, 39511–39522.
34. **Bhutkar M.A. & Bhise S.B.(2012).** In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Int. J. Chem. Sci.*, 10(1): 457-462.
35. **Blois M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
36. **Bloomgarden ZT.(2004).** Glycemic treatment, Control of glycemia. *Diabetes care*; 27(5) :1227-1234.
37. **Bonanno J. B., Edo C., Eswar N., Pieper U., Romanowski M. J., Ilyn V., Gerchman S. E., Studier F. W., Sali A., Burley S. K. (2001).** Structural genomics of enzymes involved in sterol/ isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 12896–12901.
38. **Bonnier G. (1911).** Flore complète de France Suisse et Belgique, Tome onzième (Orlhac Ed.,Paris).
39. **Borner C.(1996).** Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem.* 272;12695-98.
40. **Borsato M. L. C., Graef C. F. F., Souza G. E. P., Lopes N. P.(2000).** Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 55, 809–813.
41. **Bougandoura N et Bendimerad N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.
42. **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Edition. Lavoisier, Paris, 1288 p.

43. **Bruneton J.(1999).** *Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinales* (3^{ème} édition). Edition Technique et Documentation, Lavoisier: Paris.
44. **Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G., Swinnen J.V.(2005).** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.*,280, 5636-45.
45. **Bulduk S. (2004).** *Food Technology. 2nd edition, Detay Publishing, Ankara, Turkey.*
46. **Capectka E., Mareczek A and Leja M.(2005).** Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93, 223-226.
47. **Chandrasekharan NV. (2002).** COX-3, A Cyclooxygenase-1 Variant Inhibited by Acetaminophen and other Analgesic/Anti-pyretic Drugs: Cloning, Structure and Expression. *Proceeding of National Academy of Science*; 99:13926-13931.
48. **Chang C.P., Huang W.T., Cheng B.C., Hsu C.C., Lin M.T. (2007).** The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke. *Neuropharmacology*. 52(3): 1024-1033.
49. **Chang W., Yu C. Y., Lin T. W., Wang P. H., Tsai Y. C.(2006).** Soyasaponin I decreases the expression of alpha 2, 3- linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 614–619.
50. **Chang-yong Y., Jing W., Yuan Z., Li S., Xing J., Zhen-guo X., Nan L., Liu Z,Zhong-hua C .(2010).** Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components. *J.Ethnopharmacol.*, 130: 231–236.
51. **Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., Varma S.D. (1983).** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol*, 32:1995.
52. **Chhanabhai M., Krajewski S., Krajewska M.(1997).** Immunohistochemical analysis of interleukin-1b-converting enzyme/Ced-3 family protease, CPP32/Yama/Caspase-3, in Hodgkin's disease. *Blood*.90;2451–2455.
53. **Chi-Huang T., Shen-Jeu W. and Chun-Nan L. (2005).** “Design, synthesis and cytotoxic effect of hydroxy- and 3-alkylaminopropoxy-9, 10-anthraquinone derivatives *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, 3439.
54. **Choi H. J., Kim J.H., Lee C.H., Ahn Y. J., Song J.H., Baek S.H., Kwon D.H.(2009).** Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res.* 81, 77–81.
55. **Comini L.R et al.,(2011).** *Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from Heterophyllaea pustulata (Rubiaceae).* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011. 102(2): p. 108-114.

56. **Corcoran O., Spraul M .(2003).** LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discovery Today*, vol.8, n° 14, pp. 624-631.129.
57. **Damle A.A., Pawar Y.P., Narkar A.A.(2013).** Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. *Indian J Exp Biol.*Jul;51(7):485-91.
58. **Damle A.A., Pawar Y.P., Narkar A.A.(2013).** Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. *Indian J Exp Biol.*Jul;51(7):485-91.
59. **De Barros M. P., Lemos M., Maistro E.L., Leite M.F., Sousa J. P.B., Bastos J. K., De Andraded S.F. (2008).** Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J. Ethnopharmacol.* 120, 372–377.
60. **De Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T. (2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31–63.
61. **De Rouw A. (1991).** *The invasion of Chromolaena odorata and competition with the native flora in a rain forest zone, South-west Côte d'Ivoire.* *J. Biogeogr.*18: p. 13-23.
62. **De Sales P.M., de Souza P.M., Simeoni L.A., de Oliveira Magalhães., Silveira D., (2012).** α - amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 15(1): 141-183.
63. **Decker E.A., Welch.B.(1990).** Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.*, 38, 674–677.
64. **Delmas F., Di Giorgio C., Elias R., Gasquet M., Azas N., Mshvildadze V., Dekanosidze G., Kemertelidze E., Timon-David P. (2000).** Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med.* 66, 343–347.
65. **Deng S., Palu K., West B.J., Su C.X., Zhou B.N., Jensen J.C.(2007).**Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *J. Nat. Prod.*, 70, 859-62.
66. **Dewick P.M. (1999).** The biosynthesis of C5-C25 terpenoid coumpound. *Nat. Prod. Rep.* 16, 97–130.
67. **Dewick P.M. (2002).** Medicinal naturral products A biosynthetic approach. 2ème Ed.wiley.
68. **Dey P.M., Harborne J.B. (1991).** Methods in plant biochemistry. Volume 7. Terpenoids. Academic press.
69. **Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A. (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie* , 7:1073-1080.

70. **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*;92:229–232.
71. **Dieudonne N., Maurice D. A., Pierre T., Merhatibeb B., Berhanu M. A. (2007).** Two new anthraquinones from *Gladiolus psittascinus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35,709-713.
72. **Ding-Yong W., QI Y.E., Bo-Gang L., and Guo-Lin Z. (2003).** A new anthraquinone from from *Gladiolus Gandavensis*. *Natural product research*. 17. 365-8.
73. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocke P.,Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97, 654-660 .
74. **Djoukeng J.D., Abou-Mansour E., Tabacchi R., Tapondjou A. L., Bouda H., Lontsi D. (2005).** Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 101, 283–286.
75. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Hassani L.M.I., A. Bodoc, Gmira N., (2003).** Screening phytochimique d'une endemique Ibero-marocain, *Thymelaea lytroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61- 78.
76. **Doronicheva N., Yasui H., Sakurai H. (2007).** Chemical structuredependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method *Biol. Pharm. Bull.*,30, 213-7.
77. **Park M.J., Lee E.K., Heo H.S., Kim M.S., Sung B.; Kim M.K., Lee J., Kim N.D., Anton S., Choi J.S., Yu B.P., Chung H.Y. (2009).** The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factorinducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Med. Food.*, 2009, 12, 351-8.
78. **Drissi A., Bennani H., Giton F., Charrouf Z., Fiet J., Adlouni A. (2006).** Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer invest.* 24, 588–592.
79. **Duraisankar M., Ravichandran V. (2012).** Antipyretic Potential of Polyherbal Ayurvedic Products. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2):146-150.
80. **Dykes L, Rooney L.W.(2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants, *Rev. J. Cereal. Sci.*,44, 236–251.
81. **El Beshbishy H.A. & Bahashwan S.A.(2012).** Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilium*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an in vitro study. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1): 42-50.

82. **Ellington A.A., Berhow M., Singletary K. W.(2006).** Inhibitions of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 298–306.
83. **El-Shanawany M.A., Hassanean H.A., Mohamed M.H., Nafady A.M.(2009).** A new oleanene triterpene from *Gladiolus segetum* Ker-Gawl, *Natural Product Research*, 23,7, 613-616.
84. **Epifano F.,Genovese S.,Menghini L.,Curini M. (2007).**Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.
85. **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.
86. **Farag R.S., Daw F.M., Hewed and El- Baroty A. (1989).** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52: 665-667.
87. **Fatima S., Heena S.T., Qureshi A.S.(2016).** Evaluation of Anti-Ulcer Activity of 70 % Hydro-Ethanollic leaf extract of *Argemone mexicana* Linn . In Experimental Rats. *Journal of Pharmacy*;6(4):41-50.
88. **Felippe L. G., Baldoqui D. C., Kato M. J., Bolzani V.S., Guimaraes E. F., Cicarelli R. M. B., Furlan M. (2008).** Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* 69, 445–450.
89. **Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S.(1994).** CPP32,a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J Biol Chem* .269;30761–30764.
90. **Fernandez M.A., De las Heras B., Garcia M. D., Sáenz M. T., Villar A.(2001).** New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene Iupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1533–1539.
91. **Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M. L. M., Araujo M. E. M. (2006).** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108, pp. 31-37.81.
92. **Ferrero-Miliani L., Nielson OH., Andersen P.S., Girardin S.E. (2007).** Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exper Immunol*; 147(2):227-35.
93. **Filho A. A. S., Costa E. S., Cunha W. R., da Silva M. L. A., Nanayakkara N. P. D., Bastos J.K.(2008).** In vitro Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.* 22, 1307–1310.

94. **Fiuza S. M., Gomes C., Teixeira L. G., Girao da Cruz M. T., Cordeiro M. N., Milhazes N., Borges F., Marques M.P.M. (2004).** Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 3581–3589.
95. **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J. J.(2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, 121–216.
96. **Ford Es., Will Jr., Bowman Ba., Narayan Km. (1999).** Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the third national health and nutrition examination survey. *American Journal Epidemiology* 149:168-176.
97. **Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K.(2002).** The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* 88, 587–605.
98. **Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M. (1997).** Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 57, 4956–4964.
99. **Ganapaty S., Pannakal S. T., Srilakshmi G. V. K., Lakshmi P., Waterman P. G., Brun R., (2008).** Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochem. Lett.* 1, 175–178.
100. **Garcia-Mediavilla V., Crespo I., Collado P.S., Esteller A., Sanchez-Campos S., Tunon M.J., Gonzalez-Gallego J. (2007).** The antiinflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* 557, 221- 9.
101. **Georges K et al. (2008).** *Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from Cassia nigricans from Burkina Faso.* *Bioresource Technology.*99(6): p. 2037-2045.
102. **Gepdiremen A., Mshvildadze V., Suleyman H., Elias R . (2004).** Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol* 94:191-5.
103. **Germano M.P., De Pasquale R., Iauk L., Galati E.M., Keita A., Sanogo R. (1996).** Antiulcer activity of *Vernoniakotschyana* Sch. Bip. *Phytomed.*, 2(3): 229-233.
104. **Gevrenova R., Joubert O., Mandova M.Tsv . (2014).** Effects of four Caryophyllaceae species extracts on macrophage cell lines. *Pharm.Biol* 52(7):919-25.
105. **Ghangale G.R., Tushar M., Jadhav N.D. (2009).** Evaluation of antiulcer activity of *ocimum sanctum* in rats. *Vet World*;2(12):465-6.
106. **Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S., Yahia M.(2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie.*Vol. (12). 15-24. *Gladiolus Gandavensis, Natural Product Research*,17,5, 365–368.

107. **Gosse B., Gnabre J., Bates R. B., Dicus C. W., Nakkiew P., Huang R. C. (2002).** Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. *J. Nat. Prod.* 65, 1942–1944.
108. **Graham L. P., Depovere P. (2002).** *Chimie pharmaceutique*. ed. De Boeck, p. 154.
109. **Groom Q.J. and Reynolds.T.(1986).** *Barbaloin in aloe species*. *Planta Med.* 52: p. 345-348.
110. **Gulcin I., Huyut Z., Elmastas M and Aboul-Enein H.Y (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.
111. **Gulcin I., Mshvildadze V., Gepdiremen A., Elias R. (2004).** Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70, 561–563.
112. **Gurbuz I., Yesilada E., Ito S. (2009).** An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *J. Ethnopharmacol.* 121, 360–365.
113. **GURIB-FAKIM A. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. Vol. (27): 1-93.
114. **Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M., Moilanen E (2007).** Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*.
115. **Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman R. M.(1998).** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, vol. 5, n° 10, pp. R245-R249.
116. **Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H and Poutanen K. (2010).** Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J.Mol. Sci.*, 11: 1365-1402.
117. **Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osborn, A. E., 2002.** *Biothecnology* 75, 31–49.
118. **HEIGNEN C.G.M., HAENON G.R.M.M., VEKEMANS J.A.J.M. et BAST A. (2001).** Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship; *Environ. Toxicol. Pharmacol* 10; p: 199-206.
119. **Heijnen C.G., Haenen G.R., van Acker F.A., van der Vijgh W.J., Bast A.(2001).** Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. In vitro.*, 15, 3-6.
120. **Heim K.E., Tagliaferro A.R., et Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship; *Journal. Nutr. Biochem.* 13; p: 572-584.

121. **Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyouss B. (2004):** Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals. *J Ethnopharmacol*, 91:43–50.
122. **Hirata T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D. (2009).** Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 25–28.
123. **Hischelmann R., Bekemeier H. (1981).** Effect of catalase, peroxidase, superoxide dismutase and 10 scavengers of oxygen radicals in Carrageenin oedema and in adjuvant arthritis of rats. *Experientia*;37(12):1313-4.
124. **Hong J.T., Yen J.H., Wang L., Lo Y.H., Chen Z.T., Wu M.J.(2009).** Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*,237,59-68.
125. **Hossam M., Abdallah Maha., Salama M., Enas H., Abd-elrahman Shohda A El-Maraghy (2011).** Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytochem. Letters*, 4: 337–341.
126. **Hostettman K. A., Marston A. (1995).** Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University, Press, Cambridge, UK.
127. **Huang H.C., Liao S.C., Chang F.R., Kuo Y.H., Wu Y.C. (2003).** Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4916–4919. *IACSIT Press, Singapore*, 20:3-12.
128. **Idriss H.T., Naismith J.H. (2000).** TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.*50(3):184-95.
129. **Iranshahi M., Arfa P., Ramezani M., Jaafari M. R., Sadeghian H., Bassarello C., Piacente S., Pizza C. (2007).** Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry* 68, 554–561.
130. **Isbell J., Xu R., Cai Z., Kassel D. B. (2002).** Realities of high-throughput liquid chromatography/mass spectrometry purification of large combinatorial libraries: a report on overall sample throughput using parallel purification. *Journal of Combinatorial Chemistry*, vol. 4, n° 6, pp. 600-611.111.
131. **Islam M. A., Afia Akhtar M., Khan M. R. I., Hossain M. S., Alam M. K., Wahed M. I. I., Rahman B. M., Anisuzzaman A. S. M., Shaheen S. M., and Maruf A. (2009)** . Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Different Fractions of *Catharanthus Roseus* (Linn.) on Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J. Sci. Res.*, 1 (2):334-344.
132. **Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H. (2005).** Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66, 567–572.

133. **Jang S. M., Yee S. T., Choi J., Choi M. S., Do G. M., Jeon S. M., Yeo J., Kim M. J., Seo K. I., Lee M. K. (2009).** Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic b-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *Int. immunopharmacol.* 9, 113–119.
134. **Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., et Lee S.C. (2004)** .Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 52, 3389–3393.
135. **Jude EO., Paul A. (2009).** Antiulcer and Anticonvulsant Activity of Croton Zambesicus. *J Pharm Sci.* ;22(4):384-90.
136. **Jung C.H., Kim J.H., Hong M.H., Seog H.M., Oh S.H., Lee P.J., Kim G.J., Kim H.M., Um J.Y., Ko S.G. (2007).** Phenolic-rich fraction from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) suppress inflammatory response via NF-kappaB and JNK pathway in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.*,110, 490-7.
137. **Just M. J., Recio M. C., Giner R. M., Cuellar M. J., Manez S., Bilia A. R., Rios J. L.(1998).** Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.* 64, 404–407.
138. **Kadri A., Zarai Z., Chobba B., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. and Gadoura R. (2011).** Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from south-western of Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 5(29): 6502-6508.
139. **Kalkhambar R. G., Kulkarni G. M., Shivkumar H., Rao R. N. (2007).** Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti inflammatory and analgesic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 1272–1276.
140. **Kamiya K., Hamabe W., Tokuyama S., Hirano K., Satake T., Kumamoto-Yonezawa Y., Yoshida H and Mizushina Y.(2010).** Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-,B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation.*Food Chemistry.* 118, 3, 725-730.
141. **Kampkotter A., Gombitang N.C., Zurawski R.F., Timpel C., Chovolou Y.,Watjen W., Kahl, R.(2007).** Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Toxicol.*, 81, 849-58.
142. **Kang J., Sung M. K., Kawada T., Yoo H., Kim Y. K., Kim J. S., Yu R. (2005).** Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer lett.* 230, 219–227.
143. **Kanokmedhakul K., Kanokmedhakul S., and Phatchana R.(2005)** .*Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from Prismatomeris fragrans.* *Journal of Ethnopharmacology.*100(3): p. 284-288.

144. **Kawaii S., Lansky E. P. (2004).** Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Med. Food* 7, 13–18.
145. **Kazmi M.H et al. (1994).** *An anthraquinone derivative from Cassia italica.* *Phytochemistry.* 36(3): p. 761-763.
146. **Kempuraj D., Madhappan B., Christodoulou S., Boucher W., Cao J., apadopoulos N., Cetrulo C.L., Theoharides T.C. (2005).** Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2005,145, 934-44.
147. **Kim J. Y., Lim H. J., Lee D. Y., Kim J. S., Kim D. H., Lee H. J., Kim H. D., Jeon R., Ryu J. H. (2009).** In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*19, 937–940.
148. **Kim J.M., Lee E.K., Kim D.H., Yu B.P., Chung H.Y.(2010).** Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. *Age (Dordr.)*, 32, 197-208.
149. **Kim S.K., Kim H.J., Choi S.E., Park K.H., Choi H.K., Lee M.W. (2008).**Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. *Arch. Pharm.Res.*, 31, 424- 8.
150. **Kim Y.M., Jeong Y.K., Wang M.H., Lee W.Y, Rhee H.I. (2005).** Inhibitory effects of pine bark extract on alphaglucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*; 21: 756-761.
151. **Kingston D. G. I. (2011).** Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*, vol. 74, n° 3, pp. 496–511.
152. **Kinjo J., Yokomizo K., Hirakawa T., Shii Y., Nohara T., Uyeda M. (2000).** Antiherpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 887–889.
153. **Klaunig J.E. and Kamendulis L.M.(2004).** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 239-67.
154. **Kluger M.J.(1991).** Fever. Role of pyrogensand cryogens.*Physiol Rev.*,71:93-127.
155. **Ko W. G., Kang T. H., Lee S. J., Kim N. Y., Kim Y. C., Sohn D. H., Lee B. H.(2000).** Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem. Toxicol.* 38, 861–865.
156. **Koehn F. E., Carter G. T. (2005).** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*,vol. 4, n° 3, pp. 206-220.124.

157. **Koffi N., Beugré K., Guédé N., Dossahoua T., et Laurent A. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature. Vol. 6, N°2.pp 1 – 15.*
158. **Kolenko V., Uzzo R.G., Bukowski R. (1999).** Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res.*59;2838–2842.
159. **Konkon N.G., Simaga D. et Adjoungova A.L. (2006).** Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2006, Vol. 14, pp. 73-80 .
160. **Koumaglo K et al. (1992).** *Effects of three compounds extracted from Morinda lucida on Plasmodium falciparum.* *Planta Med.,* 1992. 58: p. 533-535.
161. **Kowalski J., Samojedny A., Paul M., Pietsz G., Wilczok T. (2005).** Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol. Rep.,*57,390-4.
162. **Krajewska M., Wang H.G., Krajewski.S.(1997).** Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.*57;1605–1613.
163. **Kroemer G and Reed J.C.(2000).** Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6;513–519.
164. **Kubata B.K., Nagamune K., Murakami N., Merkel P., Kabututua Z., Martin S. K., Kalulug T. M., Mustakuk H., Yoshida M., Ohnishi-Kameyama M., Kinoshita T., Duszenko M., Uradea Y. (2005).** Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol.* 35, 91–103.
165. **Kumaran A et Karunakaran R.J. (2007)** .In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 40, 344–352.
166. **Küpeli E., Erdemoğlu N., Yeşilada E., Şener B. (2003).** Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J. Ethnopharmacol.* 89, 265–270.
167. **Kupeli E., Tatli I.I., Akdemir Z.S., Yesilada E.(2007).** Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity on *Geranium pratense* subsp.finitimum and its phenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 114, 234-40.
168. **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 I. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* mai ;Appendix 3:Appendix 3B.
169. **Ladaniya M. (2008).** *Citrus Fruit: biology, technology and evaluation;* Ed 1: ACADEMIC PRESS, ELSEVIER; p: 157-165.

170. **Lai H.Y. et Lim Y.Y.(2011).** Antioxidant Properties of Some Malaysian Ferns.
171. **Lamyaa F. Ibrahim, Salwa A. Kawashty, Ali M. El-Hagrassy, Mahmoud I.Nassar and Tom J. Mabry.(2008).**A new kaempferol triglycoside from *Fagonia taekholmiana*: cytotoxic activity of its extracts *Carbohydrate Research*.343, Issue 1,155-158.
172. **Landes T.(2010).** OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol*, 21(6): p. 593-8.
173. **Le K, Chiu F and Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363.
174. **Lean Me., Moroozu M., Kelly I., Burns J., Taluar D., Sattar N., Crozier A. (1999).** Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes* 48:176-181.
175. **Lee S., Kim Y.J., Kwon S., Lee Y., Choi S.Y., Park J., Kwon H.J.(2009).**Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB. Rep.*, 42, 265-70.
176. **Lee, K.H.(1992).** Plant phenolic compounds as cytotoxic antitumor agents. In: *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*.American Chemical Society Symposium Series Vol. 507 pp. 367-379. ISBN 9780841224766.
177. **Leistner O.A. (Ed). (2000).** Seed plants of southern Africa: families and genera. *Strelitzia* 10. NBI. Pretoria.
178. **Lenta B.N., et al. (2007).** *Anthraquinones from the stem bark of Stereospermum zenkeri with antimicrobial activity*. *Phytochemistry*. 68(11): p. 1595-1599.
179. **Leong L. P. and Shui G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76: 69-75.
180. **Li F., Srinivasan A., Wang Y., Armstrong R.C. (1997).** Cell specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c: Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem*. 272;30299–30305.
181. **Lin C.W., Shen S.C., Chien C.C., Yang L.Y., Shia L.T., Chen Y.C. (2010).** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKCalpha/ERK/NF-kappaB-dependent MMP-9 expression. *J. Cell Physiol.*, 225, 472-81.
182. **Liyana-Pathirana C. M., and Shahidi F. (2006).** Antioxydantproprieties of commercial soft and hard winterwheats (*Triticumaestivium*L.) and their milling fractions. *J. Sci. of Food and Agriculture*. 86: 477-485.
183. **Llesuy S.F., Repetto M.G.(2002).** *Brazil J Med Biol Res*;35(5):523-34.

184. **Mahat M.Y., Kulkarni N.M., Vishwakarma S.L., Khan F.R., Thippeswamy B.S., Hebbali V., Adhyapak A.A., Benade V.S., Ashfaque S.M., Tubachi S., Patil B.M.(2010).** Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. *Eur. J.Pharmacol.*,642, 169-76.
185. **Malher R.J., Alder M.L. (1998).** Type 2 Diabetes mellitus : update on diagnosis,pathophysiology, and treatment. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*; 84(4) :1165-1171.
186. **Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A., Rosen A.(1998).** The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J. Cell Biol.* 140;1485–1495.
187. **Manitto P. (1981).** Biosynthesis of natural products. John Willey et sons. New York.
188. **Manitto P. and Sammes P.G. (1981).** *Biosynthesis of Natural Products*.New York: John Wiley .
189. **Manojlović N.T., et al. (2000).** *Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus Xanthoria.* *J. Serb. Chem. Soc.*65(8): p. 555-560.
190. **Marques-Martin A., De La Puerta R., Fernandez-Arche A., Ruiz-Gutierrez V., Yaqoob, P. (2006).** Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* 36, 211–217 .
191. **Martins R. C. C., Lago J. H. G., Albuquerque S., Kato, M. J. (2003).** Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 64, 667–670.
192. **Math P., Mishra D.K., Prajapati P.K., Roshy J., Jha P.K.(2011).** Antipyretic activity of Madhukadi and Madhukadi Ghana-An Experimental study. *International Journal of Pharmaceutical & biological Archieve.* ; 2(1):572-6.
193. **Maurya R., Gupta P., Chand K., Kumar M., Dixit P., Singh N., Dube A.(2009).** Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani*. *Nat. Prod. Res.* 23, 1134–1143.
194. **Mayer A.M. (2004).**Resistance to herbivores and fungal pathogens: Variations on a common theme? A review comparing the effect of secondary metabolites, induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. *Israel Journal Of Plant Sciences* . Vol. (52): 279-292.
195. **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.
196. **Melagraki G., Afantitis A., Igglessi- Markopoulou O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D.J. (2009).** Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3020–3026.

197. **Merzoug B. (2009).** Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des *Apiaceae* : *Carum montanum* Coss. & Dur. et *Bupleurum montanum* Coss. Thèse de doctorat. "Phytochimie". Université Mentouri-Constantine. P1.
198. **Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., and McLaughlin J.L.(1982).** Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Plant Med*, 45, 31-34.
199. **Mi L.K., Lee K.W., Jung S.K., Lee E.J., Heo Y.S., Bode A.M., Lubet R.A., Lee H.J., Dong Z. (2010).** Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, 80,2042-9.
200. **Middleton E., Kandaswami C., AND Theoharides T. C.(2000).** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological reviews*, 52:673–751.
201. **Miladi S et Damak M.(2008)** .*In vitro* antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*; 10: 101-109.
202. **Milcent R., Chau F.(2003).** Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels, EDP sciences.
203. **Miller.H.M.(1971).** A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.
204. **Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R. (2002).** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.*,36, 1199-208.
205. **Mizushima Y and Kobayashi M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20 (1)169-173.
206. **Mocali S. (2010).** Benedetti, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, vol. 161, n° 6, pp. 497-505.
207. **Mohammed, A., Faruqi, F.B., and Mustafa, J.(2009).** Edible compounds as antitumor agents. *Indian Journal of Science and Technology*; 2(5):62-74.
208. **Muzychkina R.A. (1998).** *Natural Anthraquinones: Biological and Physiological Properties*. Moscow: G. A. Tolstikov ed. Publishing House PHASIS p. 27-45.
209. **N'diaye M., Diatta W., Sy G. Y., Fall A. D., Faye B., Bassene E.(2008).** Activite Antihyperglycemiant De l'extrait Ethanolique De Feuilles *D'icacina Senegalensis* Juss (Icacinaceae). *Medecine D'afrique Noire* 55 : 441-445.
210. **Nagao A., Seki M., Kobayashi H. (1999).** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,63, 1787-90.

211. **Nakadate T., Yamamoto S., Aizu E., Kato R. (1984).** Effects of flavonoids and antioxidants on 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13- acetate-caused epidermal ornithine decarboxylase induction and tumor promotion in relation to lipoxygenase inhibition by these compounds. *Gann.*,75, 214-22.
212. **Nel A., Xia T., Mädler L., Li N.(2006).**Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.*311(5761);622-627.
213. **Nirmal K.P., Subhasish G., Indrani C. (2013).** *Jussiaea repens L.* is a nontoxic antigonadal herb – a dose dependent study on male rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 4 (2):131–143.
214. **Nirmal S. A., Pal S. C., Mandal S. C., Patil A. N. (2012).** Analgesic and anti inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology* 20, 219–224.
215. **Oates P.J., Hakkinen P.J.(1988).** *Gastroenterology*;94(1):10-21.
216. **Odhiambo J., Dossaji ., Lukhoba ., Yenesew Abiy.(2014).** Antifungal activity, brine shrimp cytotoxicity and phytochemical screening of *Gladiolus watsonoides* Baker (Iridaceae). *Journal of Pharmacy Research.*8(9),1218-1222.
217. **Odhiambo J.A. (2015).** Antifungal activity, toxicity and phytochemical composition of *gladiolus* and *dierama* species (iridaceae) in kenya.
218. **OCDE.(2013).** Ligne directrice de l'ocde pour les essais de produits chimiques ocde 301;(1):9.
219. **Oh Y., Sung M. K. (2001).** Soybean Saponins Inhibit Cell Proliferation by Suppressing PKC Activation and induce Differentiation of HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Nutr. Cancer* 39, 132 – 138.
220. **Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M., Takahara Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33, 557–561.
221. **Olagbende-Dada S.O., Ogonnia S.O., Coker H. A. B., Ukpo G.E. (2011).** Blood glucose lowering effect of Aqueous extract Of *Gratophyllum Pictum (Linn) Griff* on alloxan induced diabetic rats and its acute toxicity in mice.*African Journal Of Biotechnology* 10 (6):1039-1043.
222. **Oliveira L.C.P., Don L.C., Rochae Silva L.F.R., Henrique M.C., Santos M., Callery E. (1998).** Le grand livre des herbes : Le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes. Cologne : Könemann Verlag.
223. **Oloyede OI. (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pak J Nutr ;* 4 : 379 – 381.
224. **Onegi B et al. (2002).** *Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from Stereospermum kunthianum.* *Phytochemistry.* 60(1): p. 39-44.
225. **Ong K.C and Khoo, H.E. (1997).** Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.*29:121-126.196.

226. **Ong K.C and Khoo, H.E.(2000).** Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 67: 1695-1705.
227. **Ouédraogo N., Lompo M., Sawadogo R. W., Tibiri A., Hay A. E., Koudou J & Guissou I. P. (2012).** Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus Poir.* (*Fabaceae*). *Phytothérapie*. pp. 1-7.
228. **Oweyele V.B., Oloriegbe Y.Y., Balaogun E.A., Soladoye A.O. (2005).** Analgesis and anti-inflammatory properties of *Nelsonia canescens* leaf extract. *J Ethnopharmacol*;99(1):153-6.
229. **Oyaizu M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine *Japanese Journal of Nutrition*, 44, p. 307.
230. **Ozyurek M., Bektasoglu B., Guclu K., Apak R.(2009).** Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal.Chim. Acta.*, 636, 42-50.
231. **Pan L., Carcache E.J de Blanco et Kinghorn A.D.(2009).** Plant-Derived Natural Products as Leads for Drug Discovery. In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application*. London New York : Springer ;p. 547 – 551.
232. **Par B.S et al.(2006).** *Antibacterial activity of Tabebuia impetiginosa Martius ex DC (Tahebo) against Helicobacter pylori.* *Journal of Ethnopharmacology*.105(1-2): p. 255-262.
233. **Pari L. et Latha M. (2002).** Effect of *Cassia auriculata* flowers in blood sugar levels , serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats .*Singapore Med.J.*,43:617-621.
234. **Park J.S., Rho H.S., Kim D.H.,Chang I.S. (2006).** Enzymatic Preparation of Kaempferol from Green Tea Seed and Its Antioxidant Activity *J. Agric. Food Chem.*54, 8, 2951-2956 .
235. **Patocka J. (2003).** Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 1, 7–12.
236. **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeurs, Poumons*, 4(5), 7pages.
237. **Pinto P.S., Silva S.G. (2004).** Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. *Pharmaceutical Biology*, 42(3): 253-257.
238. **Plasket L.G.(1996).** *The nature of the plant and its background In: The health and medical use of Aloe vera.* Cornwall, UK: Biomedical Information Service Ltd. p. 10-7.

239. **Plohmann B., Bader G., Hiller K., Franz G. (1997).** Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie* 52, 953–957.
240. **Poitras E., Houde A. (2002).** La PCR en temps réel: principes et applications.2(2):2-11.
241. **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4 : 25- 39.
242. **Portet B., Fabre N., Roumy V., Gornitzka H., Bourdy G., Chevalley S., Sauvain M., Valentin A., Moulis C. (2007).** Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68, 1312–1320.
243. **Pratt D.E. et Hudson B.J.F. (1990).** Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants; Ed: ELSEVIER APPLIED SCIENCE, London; p: 171–192.
244. **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.* 2011;8:10.
245. **Quetin-Leclercq J. (2002).** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal de Pharmacie de Belgique*, vol. 57, HS 2, pp. 11-20.186.
246. **Quignard E.L.Q., Nunomura S.M., Pohlit A.M., Alecrim A.M., Pinto A.C.S., Portela Raja R., Sreenivasulu R. M. (2015).** Medicinal plants secondary metabolites used in pharmaceutical importance-an overview *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(4) : 436-447.
247. **Raju D. et al.(2009).** Evaluation of Anti-ulcer activity of methanolic extract of *Terminalia chebula* fruits in experimental rats. *J Pharm Sci Res* ;1(3):101-7.
248. **Rampersad SN. (2012).** Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*.12(9):12347-60.
249. **Rao Y. K., Fang S. H., Hsieh S. C., Yeh T. H., Tzeng Y. M. (2009).** The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *J. Ethnopharmacol.* 121, 292–296.
250. **Rao Y.K., Fang S.H., Tzeng Y.M.(2008).** Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother. Res.*,22, 957-62.
251. **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.

252. **Ren J., Meng S., Lekka C., Kaxiras E.(2008).** Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J. Phys. Chem. B.*, 112, 1845-50.
253. **Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L.(2003).** Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*; 23(4):519-534.
254. **Rhodes C., Thomas M., Athis J. (1993).** Principles of testing for acute toxic effects. In *General and Applied Toxicology*, Ballantyne B, Marrs T, Turner P, Eds.; Stockton Press: New York, USA; Volume 1: pp 49-87.
255. **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.
256. **Ronzani C., Safar R., Diab R., Chevrier J., Paoli J., Abdel-Wahhab.M.A., Joubert O.(2014).** Viability and gene expression responses to polymeric nanoparticles in human and rat cells. *Cell biology and toxicology*, 30(3);137-146.
257. **Rosa D.M., Giroud J.P., Willoughby D.A.(1971).** Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and Turpentine. *J Pathol.*104(1):15-29.
258. **Rostoka E., Baumane L., Isajevs S., Line A., Dzintare M., Svirina D., Sharipova J., Silina K., Kalvinsh I., Sjakste N.(2010).** Effects of Kaempferol and Myricetin on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production in Rats.*Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*,106, 461-6.
259. **Roudsari M., Chang P., Pegg R., Robert T. (2009).** Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*, 114:717–726.
260. **Rufino M.M., Alves R.E., Brito E.S., Jiménez J.P., Calixto F.S., Filho J.M.(2010).** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 10: 996–1002.
261. **Safayhi H., Sailer E.-R. (1997).** Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.* 63, 487–493.
262. **Saleem T.M., Azeem A.K., Dilip C., Sankar C., Prasanth N.V., Duraisami R.(2011).** Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. *Asian Pac J Trop Biomed*;1(2):147-9.
263. **Sangeetha M.,Kousalya K., Lavanya R., Cherukuru S., Chamundeeswari D., Uma Maheswara R.(2011).** *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of Leaves of *CleodendronInerme*.*RJPBCS* Volume 2 (1): 822-827.
264. **Sangita C., Priyanka C. (2012).**Evaluation of in-vitro ant-inflammatory; 2(suppl1):s178- s180.

265. **Sannomiya M., Fonseca V.B., da Silva M.A., Rocha L.R.M., dos Santos L.C., Hiruma-Lima C.A., Britoc A.R.M. S., Vilegas W. (2005).** Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.* 97, 1–6.
266. **Santi R., Rapizzi E., Canu L.(2017).**Potential Pitfalls of SDH Immunohistochemical Detection in Paragangliomas and Pheochromocytomas Harboursing Germline SDHx Gene Mutation.*Anticancer Res.* 2017; 37(2):805-812.
267. **Schmidt M. L., Kuzmanoff K. L., Ling-Indeck L., Pezzuto J. M.(1997).** Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* 33, 2007–2010.
268. **Schulte A. E., Van Der Heijden R., Verpoorte R. (1999).** Microplate enzyme coupled assays of mevalonate and phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* suspension cultured cells. *Anal. Biochem.* 269, 245–254.
269. **Scimeca D., Tétau M. (2005).** Votre santé par les plantes : Le guide familial pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. Monaco : Alpen,212.
270. **Seeman P., Cheng D., Iles G. H. (1973).** Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell. Biol.* 56, 519–527.
271. **SHAHIDI F et NACZK M.(2004).** Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A* 1054; Ed: ELSEVIER; p: 95-111.
272. **Shapiro M. J., Gounarides J. S. (1999).** NMR methods utilized in combinatorial chemistry research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vo. 35, n° 2, pp. 153-200.
273. **Sharma R., Singh S., Singh G. D., Khajuria A., Sidiq T., Singh S.K., Chashoo G., Pagoch S.S., Kaul A., Saxena A. K., Johri R. K., Taneja S. C.(2009).** In vivo genotoxicity evaluation of a plant based antiarthritic and anticancer therapeutic agent Boswellic acids in rodents. *Phytomedicine* 16, 1112–1118.
274. **Shinoura H.,Yoshida Y., Nishinura M., Muramatsu Y., Asai A., Kirino T., Hamada.H.(1999).** Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res.*59;4119-28.
275. **Shon H. Y., Son K. H., Kwon C. S., Kang S. S. (2004).** Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedecine* 11, 666–672.
276. **Siddhuraju P et Becker K. (2007)** .The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry.* 101(1), 10-19.
277. **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.(1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu Reagent. *Met. Enzym.*, 299, 152-178.

278. **Smyth T., Ramachandran V. N., Smyth W. F. (2009).** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 33, 421–426.
279. **Sofowora A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique. Académie suisse des sciences naturelles : Karthala.
280. **Sofowora E.A. (1982).** Medicinal plants and traditional medicine in Africa. John Wiley and Sons, New York, 256P.
281. **Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J. (2004).** Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219–243.
282. **Speroni E., Cervellati R., Innocenti G., Costa S., Guerra M.C., Dall’ Acqua S., Govoni P., (2005).** Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *J. Ethnopharmacol.* 98, 117–125.
283. **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.
284. **Stalikas C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295. subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 697–702.
285. **Sumner M. D., Elliott-Eller M., Weidner G., Daubenmier J. J., Chew M. H., Marlin R., Raisin C. J., Ornish D. (2005).** Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 96, 810–814.
286. **Susunaga G. S., Siani A. C., Pizzolatti M. G., Yunesb R. A., Delle Monache F.(2001).** Triterpenes from the Resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia* 72, 709–711.
287. **Sutradhar R. K., Rahman A. K. M. M., Ahmad M. U., Bachar S. C.(2008).** Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochem. Lett.* 1, 179–182.
288. **Takano-Ishikawa Y., Goto M., Yamaki, K.(2003).** Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytother. Res.*, 17, 1224-7.
289. **Tétou, M. (2005).** Articulations : Votre ordonnance naturelle. Monaco : Alpen.
290. **Toker G., Kupeli, E., Memisoglu M., Yesilada E.(2004).** Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.*, 95, 393-7.
291. **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.

292. **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.
293. **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.
294. **URI N. (1961).** Mechanism of antioxidation; Ed: SCIENCE PUBLISHERS, New York; p: 133-169.
295. **Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murata T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S .(1998)** Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395:281–284.9.
296. **Verma A.R., Vijayakumar M., Mathela C.S., Rao C.V. (2009).** In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem. Toxicol.*,47, 2196-201.
297. **VERPOORTE R., ALFERMANN A.W. (2000).** Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Ed. Kluwer Academic, Dordrecht. Netherlands.286p.
298. **Verpoorte R., Choi Y. H., Kim H. K. (2007).** NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, vol. 6, n° 1, pp. 3-14.248.
299. **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.
300. **Vincken J. P., Heng L., De Groot A., Gruppen H. (2007).** Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275–297.
301. **Wallace JM. (2002).** Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade: Eicosanoids, cyclooxygenase and lipoxygenase-as an adjunct in cancer therapy. *Integr Cancer Ther*;1(1):7-37.
302. **Walter S. J., Christopher S.C., Elizabeth A.K., Peter S. (2002).** Botanique systématique, 1ere edition, De Boeck Université s.a. Paris.
303. **Wang L., Tu Y.C., Lian T.W., Hung J.T., Yen J.H. ,Wu M.J. (2006).** Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54,9798-804.
304. **Westphal D., Dewson G., Czabotar P.E., Kluck RM.(2011).** Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.*1813(4):521-31.
305. **Wichtl M., Anton R.(1999).** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3ème ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier.

306. **Win N. N., Awale S., Esumi H., Tezuka Y., Kadota S. (2008).** Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 8653–8660.
307. **Winkel-Shirley B.(2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485–493.
308. **Wong N.C.(2001).** The beneficial effect of plant sterols on serum cholesterol. *Can. J. Cardiol.*17, 715–721.
309. **Xagorari A., Papapetropoulos A., Mauromatis A., Economou M., Fotsis T., Roussos C. (2001).** Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296 (1), 181-187.
310. **Xiang W et al. (2008).** *Antimicrobial anthraquinones from Morinda angustifolia.* *Fitoterapia.* 79: p. 501-504.
311. **Yang J., Guo J., Yuan J.(2008).** *In vitro* antioxidant properties of rutin *.LWT*,41:1060-1066.
312. **Yineger H., Kelbessa E., Bekele T., Lulekal E. (2008).** Plants used in traditional management of human ailments at Bale Mountains National Park, Southeastern Ethiopia.*Journal of Medicinal Plant Research.* 2 (6): 132-153.
313. **Yu B., Tao H.(2002).** Glycosyl trifluoroacetimidates. 2. Synthesis of dioscin and Xiebai saponin I. *J. Org. Chem.* 67, 9099–9102.
314. **Zachariade C et al. (2009).** *Chromolaena odorata (L.) King and Robinson (Asteraceae).* *Biological Control of Tropical Weeds using Arthropods.* Cambridge: Ed. R. Muniappan, G. V. P. Reddy, and A. Raman, Cambridge University Press p. 130-162 .
315. **Zhang Y.S., Tu Y.-Y., Gao X.-C., Yuan J., Li G., Wang L., Deng J.-P., Wang Q., Ma R.M. (2012).** Strong Inhibition of Celastrol Towards UDP Glucuronosyl Transferase (UGT) 1A6 and 2B7 Indicating Potential Risk of UGT-Based Herb-Drug Interaction. *Molecules* 17, 6832–6839.
316. **Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.(2002).** Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175, 17–25.

Annexes

Liste 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

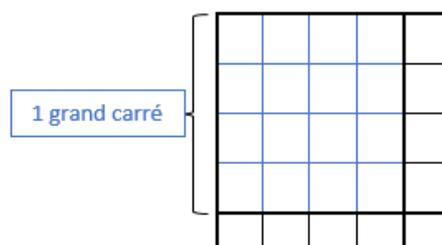
Annexe 1 : Protocole pour le passage des cellules THP-1

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 :
 - Cliquer sur « *New experiment* »
 - Cliquer sur « *File → open protocole → WST-1* »
 - Insérer la plaque dans l'appareil en cliquant sur « *Open/Close* »
 - 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 boites 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 boite, et 3 boites 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 boites de pétri correspondantes :
 - o 4 boites avec du milieu = contrôle
 - o 4 boites exposées à 25 µg/ml
 - o 4 boites exposées à 100 µg/ml
- Incuber 4 heures à 37°C
- Transférer les 20 ml de chaque boite 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 µl 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 µl de gel et 1 µl 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 µl 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 µl 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 µl de gel + 9 µl de solution dye dans les deux puits G restant.
- Ajouter 5 µl de marqueur dans tous les puits sauf les trois G.
- Ajouter 1 µl de chaque échantillon d'ARN dans tous les puits sauf la dernière colonne de droite.
- Ajouter 1 µl 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 boites de pétri

- Préparer pour chaque réplica une suspension de 52 ml à 5.10^4 cellules par ml
- Ensemencer 10 ml de suspension par boite, et 5 boites 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 boites de pétri correspondantes :
 - o 4 boites avec du milieu = contrôle
 - o 4 boites exposées à 25 µg/ml de l'extrait méthanolique
 - o 4 boites exposées à 100 µg/ml de l'extrait méthanolique
 - o 4 boites exposées à 25 µg/ml de l'extrait butanolique
 - o 4 boites 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 μ l de DMSO directement dans la fiole de Z-DEVD-AMC substrate ; après utilisation cette solution se conserve à -20°C , à l'abri de la lumière.
- **Solution à 1 M DTT** : Ajouter 650 μ l de dH_2O 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 μ l de la solution 20X Cell Lysis Buffer (composant C) à 950 μ l de dH_2O .
- Resuspendre le culot cellulaire de chaque échantillon par 50 μ l de la solution 1X Cell Lysis Buffer, puis incubé dans de la glace pendant 30 minutes
- Pendant ce temps, préparer une solution **2X Reaction Buffer** : ajouter 400 μ l de la solution 5X Reaction Buffer (composant D) et 10 μ l de la solution 1 M DTT à 590 μ l de dH_2O .
- Centrifuger les cellules lysées 5 minutes à 5 000 rpm
- Transférer 50 μ l du surnageant des échantillons dans les puits d'une microplaque
- Préparer une solution **2X substrate working** : mélanger 20 μ l de la solution 10 mM Z-DEVD-AMC substrate avec 980 μ l de la solution 2X Reaction Buffer
- Ajouter 50 μ l de la solution 2X substrate working dans les puits
- Couvrir la microplaque et incubé 30 minutes à température ambiante
- Mesurer la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre à 342/441 nm

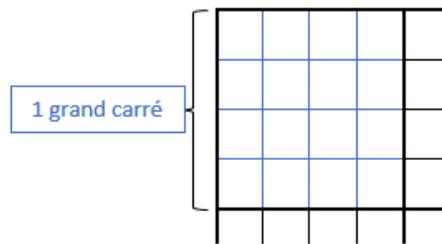
Annexe 1 : Protocole pour le passage des cellules THP-1

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.



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 puits) x 100 µl = 2600 µl = 2,6 ml → pour chaque concentration nous avons besoin de 3 ml de solution.
- 3 ml x 6 concentrations = 18 ml de solution, que nous arrondissons à 20 ml.

Notre plus grande concentration sera de 800 µg/ml (tube initial de la cascade de dilution = T1). Nous avons donc besoin du double, soit 1,6 mg/ml, soit 9,6 mg/6ml.

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

110 mg → 1 ml

9,6 mg → X ml

$X = (9,6 \text{ mg} \times 1) / 110 \text{ mg} = \mathbf{87 \mu l}$. Il nous faut prélever 87 µl 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 µg/ml	800	400	200	100	50	25	0

Annexe 3 : Protocole du test Alamar bleu

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 « *Parameters* → *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 $5 \cdot 10^4$ cellules par ml.
- Sur une plaque de 6 puits :
 - o Dans 3 puits, déposer 4 ml de suspension correspondant au réplica X.
 - o Dans 3 autres puits, déposer 4 ml de suspension correspondant au réplica Y.
 - o 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 :
 - o 100 µg/ml → peser 2 mg d'extrait et diluer dans 20 ml de milieu.
 - o 600 µg/ml → peser 12 mg d'extrait et diluer dans 20 ml de milieu.
- Par réplica, déposer :
 - o 4 ml de solution à 100 µg/ml dans un puits.
 - o 4 ml de solution à 600 µg/ml dans un autre puits.
 - o 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®

Utilisation du kit Bio-Analyzer system, qui contient plusieurs réactifs :

- Solution dye
- Gel
- Marqueur

Etape 1 : préparation des échantillons et du bio-analyzer

- Prélever 2 µl 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 µl de gel et 1 µl 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 µl 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 µl 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 µl de gel + 9 µl de solution dye dans les deux puits G restant
- Ajouter 5 µl de marqueur dans tous les puits sauf les trois G
- Ajouter 1 µl de chaque échantillon d'ARN dans tous les puits sauf la dernière colonne de droite
- Ajouter 1 µl de solution ladder dans le puits (#)

- Placer la microplaque RNA Nano chip dans l'homogénéisateur pendant 2 minutes à 2400 rpm

Étape 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 02. 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 méthanol 25μg/ml (1)	289,89	2,12	1,99	10
Extrait méthanol 25μg/ml (2)	886,68	2,21	2,07	10
Extrait méthanol 25μg/ml (3)	371,30	2,11	1,89	10
Extrait méthanol 100μg/ml (1)	373,96	2,07	1,92	10
Extrait méthanol 100μg/ml (2)	906,47	2,22	2,08	9,10
Extrait méthanol 100μg/ml (3)	636,56	2,18	1,87	8,90

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 5).

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.

Etape 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.

Etape 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 $5 \cdot 10^4$ 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 μ l de DMSO directement dans la fiole de Z-DEVD-AMC substrate ; après utilisation cette solution se conserve à -20°C, à l'abri de la lumière.
 - **Solution à 1 M DTT** : Ajouter 650 μ l 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 μ l de la solution 20X Cell Lysis Buffer (composant C) à 950 μ l de dH₂O.
 - Resuspendre le culot cellulaire de chaque échantillon par 50 μ l de la solution 1X Cell Lysis Buffer, puis incubé dans de la glace pendant 30 minutes.
 - Pendant ce temps, préparer une solution **2X Reaction Buffer** : ajouter 400 μ l de la solution 5X Reaction Buffer (composant D) et 10 μ l de la solution 1 M DTT à 590 μ l de dH₂O.
 - Centrifuger les cellules lysées 5 minutes à 5 000 rpm.
 - Transférer 50 μ l du surnageant des échantillons dans les puits d'une microplaque.
 - Préparer une solution **2X substrate working** : mélanger 20 μ l de la solution 10 mM Z-DEVD-AMC substrate avec 980 μ l de la solution 2X Reaction Buffer.
 - Ajouter 50 μ l de la solution 2X substrate working dans les puits.
 - Couvrir la microplaque et incubé 30 minutes à température ambiante.
 - Mesurer la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre à 342/441 nm.

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules bioactives, dotées de nombreuses activités. La présente étude s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation d'une plante de la région de Batna : *Gladiolus segetum*, est une plante médicinale appartenant à la famille des Iridacées, cette espèce connue sous le nom de « Thagastourth » en chaoui et « Sif er rorab » en arabe.

Les extraits de la partie aérienne de cette plante ont été obtenus par macération en utilisant des solvants à polarité croissante : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol.

Le criblage phytochimique de la poudre de notre plante a révélé la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides, des anthraquinones, des stéroïdes, des terpènes et l'absence des alcaloïdes. L'analyse quantitative a montré que les extraits méthanolique et acétate d'éthyle du *Gladiolus Segetum* sont riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec une teneur de $64,96 \pm 1,08$; $64,43 \pm 2,58$ μg EAG/mg et $39,79 \pm 2,36$; $27,96 \pm 1,97$ μg EQ/mg d'extrait respectivement.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant six méthodes différentes : DPPH, ABTS, chélation des ions métalliques, β -carotène, CUPRAC et FRAP. La meilleure activité est obtenue avec l'extrait méthanolique avec des valeurs d'IC50 égales à $118,29 \pm 0,64$ $\mu\text{g}/\text{ml}$; $23,76 \pm 2,02$; $40,80 \pm 1,71$; $29,67 \pm 1,99$; $47,34 \pm 4,50$ et $55,34 \pm 0,69$ respectivement. Les autres extraits testés possèdent un pouvoir antioxydant mais de façon moins importante.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits du *Gladiolus segetum* a montré que l'extrait méthanolique possède l'effet anti-inflammatoire le plus important de la dénaturation de sérum bovin albumine (BSA). De plus, les extraits de cette plante présentent une cytotoxicité vis-à-vis les larves artémia Salina. En outre, l'EMGS a révélé une activité antidiabétique intéressante par l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase.

Les tests de la cytotoxicité Alamar bleu, WST-1 et le bleu trypan ont montré que l'EMGS présente une cytotoxicité vis-à-vis les cellules THP-1 après exposition de 24h. En effet, l'analyse des ARN messagers et l'exploration des voies de signalisation de la mort cellulaire ont été évalués par l'expression des gènes OPA1, NCF1, BCL2, PDCD4, TNF- α , CASP8, SDHA et la mesure de l'activité de la protéine caspase 3 qui est un régulateur bien connu de l'apoptose induite par les mitochondries.

La détermination de la toxicité aiguë par voie orale de l'extrait méthanolique du *Gladiolus Segetum* a permis d'obtenir une DL50 supérieure à 2000 mg/Kg p.c.

A l'issue de l'évaluation des activités biologiques *in vivo*, l'extrait EMGS possède un effet puissant antiulcéreux contre l'ulcère induit par l'éthanol. De plus, les résultats obtenus ont montré l'efficacité de notre extrait contre l'inflammation, la fièvre et le diabète.

Les résultats obtenus apportent donc une justification à l'utilisation traditionnelle de cette plante et la mise au point d'un nouveau phytomédicament contre diverses pathologies à base du *Gladiolus segetum*. Les principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

Mots clés : *Gladiolus segetum*, extrait méthanolique, cytotoxicité, THP-1, activités biologiques, apoptose .

Abstract

Medicinal plants are a huge source of bioactive molecules with many activities. This study is part of the contribution to the recovery of a plant from Batna: *Gladiolus segetum*, is a medicinal plant belonging to the Iridaceae family, this species known as "Thagastourth" in Chaoui and "Sif er rorab" in Arabic.

The extracts of the aerial part of this plant were obtained by maceration using solvents with increasing polarity: hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol.

Phytochemical screening of our plant powder revealed the presence of polyphenols, flavonoids, saponosides, anthraquinones, steroids, terpenes and the absence of alkaloids. Quantitative analysis showed that the methanolic and ethyl acetate extracts of *Gladiolus Segetum* are rich in total polyphenols and flavonoids with a content of 64.96 ± 1.08 ; 64.43 ± 2.58 μg EAG/mg and 39.79 ± 2.36 ; 27.96 ± 1.97 μg EQ/mg extract respectively.

The antioxidant activity of the various extracts was evaluated using six different methods: DPPH, ABTS, metal ion chelation, β -carotene, CUPRAC and FRAP. The best activity is obtained with the methanolic extract with IC₅₀ values equal to 118.29 ± 0.64 μg / ml; 23.76 ± 2.02 ; 40.80 ± 1.71 ; 29.67 ± 1.99 ; 47.34 ± 4.50 and 55.34 ± 0.69 respectively. The other extracts tested have an antioxidant but less important.

The evaluation of the in vitro anti-inflammatory activity of *Gladiolus Segetum* extracts showed that methanolic extract has the most important anti-inflammatory effect of bovine serum albumin denaturation (BSA). Furthermore, the extracts of this plant are cytotoxic to the artemia Salina larvae. In addition, MEGS showed interesting anti-diabetic activity by inhibition of α -amylase and α -glucosidase.

Alamar blue, WST-1 and trypan blue cytotoxicity tests showed that MEGS is cytotoxic to THP1 cells after 24h exposure. Indeed, the RNA analysis and exploration of signaling pathways for cell death were evaluated by the expression of OPA1, NCF1, BCL2, PDCD4, TNF- α , CASP8 and SDHA genes and the measurement of caspase 3 protein activity which is a well-known regulator of apoptosis induced by mitochondrial.

The determination of the acute oral toxicity of methanolic extract of *Gladiolus segetum* showed an LD₅₀ greater than 2000 mg/Kg b.w.

Following the evaluation of biological activities in vivo, MEGS extract has a powerful anti-ulcer effect against ethanol-induced ulcers. Moreover, the results obtained showed the effectiveness of our extract against inflammation, fever and diabetes.

The results obtained provide a justification for the traditional use of this plant and the development of a new phytodrug against various diseases based on *Gladiolus segetum*. Major active ingredients possess various biological activities and play a recognized role in maintaining good health.

Keywords: *Gladiolus segetum*, methanolic extract, cytotoxicity, THP-1, biological activities, apoptosis.

ملخص

النباتات الطبية هي مصدر ضخم من الجزيئات النشطة بيولوجيا مع العديد من الأنشطة، الدراسة الحالية جزء من المساهمة في تمييز نبتة من منطقة باتنة *Gladiolus segetum* هو نبات طبي تابع لعائلة Iridacées وهي نوع معروف تحت إسم "تقستورث" بالشاوية و " سيف الغراب" باللغة العربية.

تم الحصول على مستخلصات الجزء الهوائي من هذه النبتة بواسطة النقع باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة : هكسان، كلوروفورم، أسيتات إيثيل وميثانول.

كشف الفحص الكيميائي النباتي لمسحوق نباتنا عن وجود البوليفينولات، الفلافونويدات، الصابونين، الأنتراكوينون، الاستيرويد، التربينات وغياب القلويدات، وأظهر التحليل الكمي ان مستخلصات الميثانوليك وأسيئات الايثيل لـ *Gladiolus segetum* غنية بإجمالي البوليفينولات والفلافونويدات مع محتوى $1,08 \pm 64,96$ ، $2,58 \pm 64,43$ ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ و $2,36 \pm 39,79$ ، $1,97 \pm 27,96$ ميكروغرام مكافئ الكيرسيتين /مغ من المستخلص على التوالي .

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المختلفة باستخدام ستة طرق مختلفة: DPPH، ABTS، إزالة شوارد المعادن، β -carotène، CURRAC وFRAP. يتم الحصول على أفضل نشاط مع مستخلص الميثانول مع قيم IC50 تساوي $0,64 \pm 118,29$ ميكروغرام /مل، $2,02 \pm 23,76$ ، $1,71 \pm 40,80$ ، $1,99 \pm 29,67$ ، $4,50 \pm 47,34$ و $55,34 \pm 0,69$ على التوالي، المستخلصات الأخرى المختبرة لها قدرة مضادة للأكسدة ولكنها أقل أهمية .

أظهر تقييم النشاط المضاد للالتهابات في المختبر (*in vitro*) لمستخلصات *Gladiolus segetum* أن المستخلص الميثانولي له أهم تأثير مضاد للالتهاب في تمسخ الالبومين المصلي البقري (BSA).بالإضافة الى ذلك، فإن مستخلصات هذه النبتة تظهر السمية الخلوية ليرقات ساليانا ارتيميا .كشف EMGS عن نشاط مثير لمرض السكر عن طريق تثبيط α -amylase و α -glucosidase.

أظهرت إختبارات السمية الخلوية *Alama bleu*، WST-1، *bleu trypan* ان EMGS يظهر سمية خلوية لخلايا THP1 بعد التعرض على مدار 24 ساعة. في الواقع، تحليل الحمض النووي الريبي واستكشاف مسارات التأشير لموت الخلايا من خلال التعبير عن الجينات OPA1، NCF1، BCL 2، CASP3 وهو منظم معروف جيدا لموت الخلايا المبرمج الناجم عن الميتوكوندريا.

أدى تحديد السمية الحادة لمستخلص الميثانول لـ *Gladiolus segetum* الى الحصول على DL50 أكبر من 2000مغ/كغ من وزن الجسم.

في نهاية تقييم الأنشطة البيولوجية في الجسم الحي، مستخلص EMGS له تأثير قوي مضاد للقرحة الناجمة عن الايثانول بالإضافة الى ذلك، أظهرت النتائج المتحصل عليها فعالية مستخلصنا ضد الالتهاب، الحمى والسكري.

النتائج التي تم الحصول عليها توفر تبريرا للاستخدام التقليدي لهذه النبتة وتطوير دواء نباتي جديد ضد مختلف الامراض على أساس *Gladiolus segetum*. تمتلك المكونات الرئيسية النشطة عدة أنشطة بيولوجية مختلفة وتلعب دورا معترفا به في الحفاظ على الحالة الصحية الجيدة.

الكلمات المفتاحية: *Gladiolus segetum* ، مستخلص ميثانولي، السمية الخلوية، THP-1، أنشطة بيولوجية، الموت الخلوي المبرمج.

