

UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Laboratoire de Bioconversion, Génie-microbiologie et Sécurité Sanitaire



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
En Sciences Biologiques

Option : Science, Technologie et Santé

Potentiel du contenu Polyphénolique et Huiles Essentielles de Quelques Plantes Médicinales à Activités Anticartilagineuse et Biologiques

Présentée par
M^{elle} SIDE LARBI Khadidja

Devant le Jury :

M^r BELABID Lakhdar	Pr	Université de Mascara	Président
M^{me} DJAFRI Ayada	Pr	Université d'Oran 1	Examinatrice
M^r SLIMANI Miloud	Pr	Université de Saida	Examinateur
M^{me} CHOUITAH Ourida	MCA	Université de Mascara	Examinatrice
M^r HARIRI Ahmed	MCA	Université de Mascara	Examinateur
M^r MEDDAH Boumediene	Pr	Université de Mascara	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2015-2016

« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité, le flambeau qui éclaire le monde »

Cité par Henri Mondor dans Pasteur (1945).
Citations de Louis Pasteur

Remerciements

*Ce travail de thèse a été réalisé au niveau du laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire, Faculté SNV, Université de Mascara, sous la direction de Monsieur le Professeur **MEDDAH Boumediène** (Université de Mascara).*

Monsieur, je tiens à vous remercier vivement d'avoir accepté la direction scientifique de ma thèse de doctorat, de m'avoir soutenue et aidée à réaliser ce travail avec rigueur et patience.

Malgré vos obligations professionnelles, vous avez été omniprésent. J'ai bénéficié de votre grande compétence, de votre rigueur intellectuelle, de votre dynamisme et de votre efficacité certaine. Soyez assuré de mon attachement et de ma profonde gratitude

Je suis très honorée à remercier de la présence à mon jury de thèse :

Monsieur le Professeur **BELABID L.** (Université Mustapha Stambouli de Mascara),
J'ai le grand privilège que vous présidiez mon jury de soutenance de thèse.
Je vous remercie pour l'importance que vous attachiez à mes travaux.
Veillez agréer l'expression de mon profond respect.

Madame la Professeur **DJAFRI A.** (Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella),
Tous mes remerciements pour votre participation à mes travaux de soutenance de thèse. Votre expérience scientifique et vos conseils me seront très utiles. Acceptez ma très haute considération.

Monsieur le Professeur **SLIMANI M.** (Université Taher Moulay de Saida),
Je suis très ravie de votre présence au sein du jury. Je vous remercie pour les commentaires que vous tenterez d'avancer et qui me seront bénéfiques. Je vous exprime ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur **CHOUITAH O.** (Université Mustapha Stambouli de Mascara),
C'est un grand honneur pour moi que vous soyez présente à ma soutenance de thèse. Votre possible intervention me sera d'une grande utilité.
Veillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon respect.

Monsieur le Docteur **HARIRI A.** (Université Mustapha Stambouli de Mascara),
Je vous remercie fortement d'avoir accepté de porter un jugement à mon travail scientifique. Je tiens personnellement à vous assurer de ma profonde gratitude.

A notre Maître, Madame la Professeur MEDDAH T.T.A. (Université de Mascara),
Je tiens à vous remercier du soutien inconditionnel que vous m'avez accordé durant tous mes travaux. Votre disponibilité et votre présence m'ont apporté un réconfort. Acceptez mes sincères salutations.

A Messieurs les Professeurs : SONNET P. (Laboratoire des glucides, Amiens/France) et GABALDON J.A.H. (Laboratoire d'encapsulation et reconnaissance moléculaires, Murcie/Espagne),
Remerciements pour votre accueil au sein de votre laboratoire, votre gentillesse et vos conseils scientifiques ont été un grand atout.

Aux enseignants et au personnel des laboratoires de la faculté SNV, Université de Mascara,
Merci pour votre aide, votre gentillesse, vos conseils et surtout vos encouragements

Au personnel de l'animalerie de la faculté SNV, Université de Mascara,
Vous m'avez initiée et formée à l'expérimentation animale et je vous en suis très reconnaissante. J'ai toujours été accueillie avec bienveillance et bien conseillée. Acceptez nos sincères salutations

A Messieurs les Docteurs ELAGAG H., SLIMANI K. et FEDDAG H.,
Merci pour votre gentillesse et votre aide pour les images et les interprétations radiographiques.

A Madame SAHNOUNI F. (Université de Mascara),
Vous m'avez écouté et conseillé longuement. Je vous en remercie chaleureusement.

A Mes deux partenaires ASMAA et HAMZA, avec qui j'ai partagé les joies de la paillasse et de l'animalerie, vous étiez toujours présents pour m'écouter, me conseiller et m'aider.
Merci pour votre soutien moral.

A mes collègues de la promotion de Sciences, Technologie et Santé,
Merci pour le temps que vous avez partagé avec moi

A tous mes proches et mes amis,

A ma famille,

A mes très chers parents,

*Merci pour votre présence à mes côtés, votre soutien au cours
de mes études et pour tout ce que vous m'avez offert pour en arriver là.*

Je ne pourrais jamais vous récompenser.

Je vous adore

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale	01
<i>Partie I : Rappel bibliographique</i>	
Chapitre I : Lésions du cartilage articulaire : la Polyarthrite Rhumatoïde	
I. Tissu cartilagineux	03
I.1. Classification	03
I.2. Cartilage hyalin articulaire	03
II. La polyarthrite rhumatoïde	06
II.1. Généralités	06
II.2. Epidémiologie	07
II.3. Etiologie	07
II.4. Physiopathologie	08
II.5. Diagnostic	10
II.5.1. Signes cliniques	10
II.5.2. Examens biologiques	10
II.5.3. Examens radiologiques	12
III. Prise en charge et stratégie thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde	12
III.1. Traitements médicamenteux	12
III.1.1. Traitements symptomatiques	12
III.1.2. Traitements de fond hors biothérapies	15
III.1.3. Traitement de fond par les biothérapies	15
III.2. Traitements médicamenteux par voie locale	16
III.3. Traitement chirurgical	16
III.4. Traitements physiques : réadaptation et rééducation	16
IV. Place des produits naturels dans le traitement de la PR	16
IV.1. Huiles de poisson	17
IV.2. Probiotiques	17
IV.2. Plantes	17
 Chapitre II : Métabolites secondaires des plantes médicinales : Polyphénols et Huiles essentielles	
I. Plantes médicinales	18

I.1. Terminologie	18
II. Métabolites secondaires	18
II.1. Polyphénols	18
II.1.1. Classification des polyphénols	19
II.1.1.1. Composés phénolique simples	19
II.1.1.2. Composés phénoliques complexes	22
II.1.2. Procédés d'extraction	23
II.1.2.1. Extraction solide-liquide et Macération	23
II.1.2.2. Extraction au Soxhlet	23
II.1.2.3. Extraction au CO2 supercritique	24
II.1.2.4. Extraction par ultrasons	24
II.1.3. Rôle des composés phénoliques	24
II.2. Huiles essentielles	25
II.2.1. Définitions	25
II.2.2. Caractères physicochimiques des huiles essentielles	26
II.2.3. Composition chimique des huiles essentielles	27
II.2.3.1. Composés terpéniques	27
II.2.3.2. Composés aromatiques	28
II.2.4. Procédés d'extraction des huiles essentielles	28
II.2.4.1. Entraînement à la vapeur	29
II.2.4.2. Hydrodistillation	29
II.2.4.3. Distillation à vapeur saturée	29
II.2.4.4. Hydro-diffusion	29
II.2.4.5. Extraction par CO2 super critique	30
II.2.4.6. Extraction assistée par microondes	30
II.2.5. Intérêts écologique, économique et thérapeutique des huiles essentielles	30
III. Notion de toxicité	32
Chapitre III : Monographie des plantes choisies	
I. Rappel sur la famille des <i>Asteraceae</i>	33
II. <i>Inula viscosa</i> L.	33
II.1. Classification taxonomique et répartition géographique	33
II.2. Aspects botaniques	34
II.3. Aspects phytochimiques	35
II.4. Aspects pharmacologiques	35

III. <i>Anacyclus valentinus</i> L.	36
III.1. Classification taxonomique et répartition géographique	36
III. 2. Aspects botaniques	37
III.3. Aspects phytochimiques	37
III.4. Aspects pharmacologiques	38

Partie II : Partie pratique

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Objectifs	39
II. Matériel biologique	40
II.1. Matériel végétal	40
II.2. Animaux d'expérimentation	41
II.3. Souches bactériennes	41
II.4. Produits	42
III. Méthodes	43
III.1. Extraction des polyphénols	43
III.2. Extraction des huiles essentielles	43
III.3. Rendements d'extraction	44
III.4. Dosage des composés phénoliques	46
III.4.1. Polyphénols totaux	46
III.4.2. Flavonoïdes totaux	46
III.5. Identification phytochimique des polyphénols et des huiles essentielles	47
III.5.1. Analyse chimique des extraits méthanoliques par LC-MS	47
III.5.2. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS	48
III.6. Evaluation de la toxicité orale aigue des extraits végétaux chez les rats <i>Wistar</i>	49
III.7. Etude de l'effet des extraits végétaux sur l'arthrite rhumatoïde <i>in vivo</i>	51
III.7.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde	51
III.7.2. Traitement des animaux	51
III.7.3. Répartition des lots	51
III.7.4. Suivi des paramètres cliniques	52
III.7.4.1. Evolution pondérale	52
III.7.4.2. Suivi de l'œdème	52
III.7.4.3. Indice arthritique	53
III.7.5. Suivi des paramètres biologiques	53

III.7.5.1. Masse relative des organes	53
III.7.5.2. Détermination des indices du thymus et de la rate	54
III.7.5.3. Prélèvement et analyses du sang	54
III.7.6. Radiographie	56
III.8. Etude de l'action analgésique centrale des extraits végétaux <i>in vivo</i>	58
III.8.1. Préparation des lots	60
III.8.2. Application de test	60
III.9. Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux <i>in vitro</i>	61
III.9.1. Préparation des extraits	61
III.9.2. Préparation de l'inoculum bactérien	61
III.9.3. Diffusion des disques sur gélose	61
III.9.4. Détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide	62
III.9.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	62
III.10. Etude des interactions entre les extraits et les antibiotiques (test de FIC)	63
III.10.1. Test de synergie sur gélose	63
III.10.2. Détermination des concentrations fractionnaires inhibitrices	63
III.11. Analyses statistiques	64
Chapitre II : Résultats et discussion	
I. Etude phytochimique des extraits méthanoliques et des huiles essentielles	66
I.1. Rendements d'extraction et caractères organoleptiques	66
I.1.1. Extraits méthanoliques	66
I.1.2. Huiles essentielles	66
I.2. Dosage des composés phénoliques	67
I.2.1. Polyphénols totaux	67
I.2.2. Flavonoïdes totaux	68
I.3. Identification phytochimique des polyphénols et des huiles essentielles	69
I.3.1. Analyse chimique des extraits méthanoliques par LC-MS	69
I.3.2. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS	72
II. Evaluation de la toxicité orale aiguë des extraits végétaux chez les rats	76
III. Etude de l'effet des extraits végétaux sur l'arthrite rhumatoïde <i>in vivo</i>	78
III.1. Evolution pondérale chez les rats	78
III.2. Suivi de l'œdème	80
III. 3. Indice arthritique	82
III. 4. Masse relative des organes	84

III.5. Indices du thymus et de la rate	86
III.6. Paramètres sanguins	88
III.6.1. Facteur rhumatoïde	88
III.6.2. Protéine Réactive C	89
III.6.3. Phosphatase alcaline	90
III.6.4. Aspartate aminotransférase	91
III.6.5. Alanine aminotransférase	92
III.7. Radiographie	93
IV. Etude de l'action analgésique centrale des extraits végétaux <i>in vivo</i>	96
IV.1. Evaluation de l'action analgésique des extraits méthanoliques	96
IV.2. Evaluation de l'action analgésique des huiles essentielles	97
IV.3. Pourcentage d'analgésie des extraits méthanolique et des huiles essentielles	97
V. Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux <i>in vitro</i>	99
V.1. Détermination de la CMI	102
V.2. Détermination de la CMB et le rapport CMB/CMI	103
VI. Etude des interactions entre les extraits et les antibiotiques (test de FIC)	104
VI.1. Test de synergie	104
VI.2. Détermination des concentrations fractionnaires inhibitrices	106
Conclusion générale et perspectives	109
Références bibliographiques	111

Liste des tableaux

Tab.1. Gènes associés à la polyarthrite rhumatoïde et leurs rôles probables dans sa pathogénie	07
Tab 2. Principaux types des acides phénoliques	20
Tab 3. Principales classes des flavonoïdes	22
Tab.4. Profil d'antibiorésistance des souches bactériennes testées	42
Tab.5. Volumes recommandés d'adjuvant complet de Freund selon la voie d'administration	42
Tab.6. Les différents scores de l'indice arthritique	53
Tab.7. Principales caractéristiques des extraits méthanoliques et des huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	66
Tab.8. Taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques d' <i>I. viscosa</i> et <i>A. valentinus</i>	67
Tab.09. Identification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique IVM	70
Tab.10. Identification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique AVM	71
Tab.11. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>I. viscosa</i> (IVH)	73
Tab.12. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>A. valentinus</i> (AVH)	75
Tab.13. Pourcentage d'analgésie des standards, des extraits végétaux	98
Tab.14. Concentrations minimales inhibitrices des extraits végétaux	102
Tab.15. Concentrations minimales bactéricides des extraits végétaux et rapport CMB/CMI	103
Tab.16a. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur <i>E. coli</i>	107
Tab.16b. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur <i>B. subtilis</i>	107
Tab.16c. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur <i>S. aureus</i>	108

Liste des figures

Fig 1. (a) Représentation du cartilage hyalin au niveau de l'articulation, (b) Organisation en zones du cartilage articulaire	05
Fig 2. Schéma d'une articulation saine (a) et après inflammation (b)	06
Fig 3. Concept de la genèse et de l'évolution d'une arthrite rhumatoïde	10
Fig.4. Squelette de base des flavonoïdes	20
Fig.5. Structure de l'isoprène (C ₅ H ₈)	27
Fig.6. Exemples de composés aromatiques	28
Fig.7. Planche d' <i>I. viscosa</i>	34
Fig.8. Planche d' <i>Anacyclus valentinus</i>	37
Fig.9. Carte géographique des sites de récolte des deux plantes	40
Fig.10. Parties aériennes du matériel végétal étudié	41
Fig.11. Schéma explicatif de l'extraction et des analyses phytochimiques des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (<i>I.viscosa</i> , <i>A. valentinus</i>)	45
Fig.12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	46
Fig.13. Courbe d'étalonnage de la quercétine	47
Fig.14. Schéma explicatif de l'évaluation de l'effet des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (<i>I.viscosa</i> , <i>A. valentinus</i>) sur l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant Complet de Freund chez les rats Wistar	57
Fig.15. Schéma récapitulatif de l'étude de l'action analgésique centrale des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (<i>I.viscosa</i> , <i>A. valentinus</i>) chez les rats Wistar	59
Fig.16. Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité antibactérienne des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes <i>in vitro</i> et de leur association avec les antibiotiques	65
Fig.17. Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle d' <i>I. viscosa</i> (IVH) par GC-MS	72
Fig.18. Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle d' <i>A. valentinus</i> (AVH) par GC-MS	74
Fig.19a. Poids initiaux et finaux des rats témoins et prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	78
Fig.19b. Poids initiaux et finaux des rats témoins et traités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	79
Fig.20a. Evolution de l'œdème chez les rats arthritiques et les rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	80
Fig.20b. Evolution de l'œdème chez les rats arthritiques et les rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	81

Fig.21a. Indice arthritique chez les rats témoins et les rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	83
Fig.21b. Indice arthritique chez les rats témoins et les rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	83
Fig.22a. Masse relative des organes des rats témoins et des rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	85
Fig.22b. Masse relative des organes des rats témoins et des rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	86
Fig.23a. Indices de la rate et du thymus des rats témoins et des rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	87
Fig.23b. Indices de la rate et du thymus des rats témoins et des rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	87
Fig.24. Valeurs de FR chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	89
Fig.25. Valeurs de la CRP chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	90
Fig.26. Valeurs de la PAL chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	91
Fig.27. Valeurs de l'ASAT chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	91
Fig.28. Valeurs de l'ALAT chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> et d' <i>A. valentinus</i>	92
Fig.29. Images radiographiques des pattes injectées par CFA	95
Fig.30a. Action analgésique centrale des extraits méthanoliques à 300 et 500mg/Kg	96
Fig.30b. Action analgésique centrale des huiles essentielles à 0.06 et 0.1 ml/Kg	97
Fig.31a. cinétique de croissance des bactéries testées en présence d'IVM et d'AVM	100
Fig.31b. cinétique de croissance des bactéries testées en présence d'IVH et d'AVH	101
Fig.32. Zones d'inhibition (mm) des agents antibactériens seuls et en combinaison (A): extraits méthanoliques, (B): huiles essentielles	105
Fig.33. Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des agents antibactériens seuls et en combinaison (a): extraits méthanoliques, (b): huiles essentielles	105

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µL	Microlitres
ALAT	Alanine aminotransférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATB	Antibiotiques
AVH	Huile essentielle d'A. valentinus
AVM	Extrait méthanolique d'A. valentinus
CFA	Adjuvant complet de Freund
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRP	Protéine réactive C
DO	Densité optique
EAG	Equivalent acide gallique
EM	Extrait méthanolique
Equ	Equivalent quercétine
FIC	Concentration inhibitrice fractionnaire
FICI	Indice de concentration inhibitrice fractionnaire
FR	Facteur rhumatoïde
g	Grammes
H	Heure
HE	Huile essentielle
IVH	Huile essentielle d'I. viscosa
IVM	Extrait méthanolique d'I. viscosa
Kg	Kilogramme
L	Litre
Log	Logarithme
ml	Millilitre
mn	Minute
PAL	Phosphatase alcaline
p.c	Poids corporel
pH	Potentiel d'hydrogène
PR	Polyarthrite rhumatoïde
TGO	Transaminase Glutamo-oxalo-acétique
TGP	Transaminase glutamopyruvique
UI	Unité internationale

Résumé

Les plantes médicinales sont largement utilisées par les populations et sont source de nouveaux composants actifs. *Inula viscosa* L., *Anacyclus valentinus* L., sont des plantes annuelles communes en Algérie. Elles sont connues pour leurs divers effets thérapeutiques. En outre *A. valentinus* est utilisée comme condiment alimentaire. L'objectif de cette thèse est de valoriser ces plantes par l'évaluation de leur pouvoir anti-cartilagineux, analgésique et antibactérien.

L'extraction des polyphénols par macération au méthanol (80%) a donné des rendements de 12.46% en IVM et de 17.82% en AVM, alors que l'extraction des huiles essentielles par hydro-distillation a donné des rendements plus faibles. L'identification par LC-MS et les dosages colorimétriques ont révélé la richesse des extraits méthanoliques en composés phénoliques notamment les flavonoïdes (49.19, 52.15mg Equ/g sec) et les lactones pour IVM. Quant aux huiles essentielles, la GC-MS a montré une prédominance des composés terpéniques.

La DL₅₀ a été évaluée supérieure à 2500mg/Kg pour les extraits méthanoliques et à 3ml/Kg pour les huiles essentielles. Concernant le pouvoir antiarthritique, l'AVM produit l'effet le plus important avec un gain pondéral, un score arthritique, des indices thymus ; rate et des paramètres sériques proches de ceux du témoin. L'extrait a également inhibé l'œdème et rétabli la structure du cartilage. IVM, IVH et AVH possèdent également des effets intéressants sur l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant de Freund chez les rats.

L'action analgésique centrale testée par le stimulus thermique (Tail-Flick) a décelé un fort pouvoir antinocicepteur des quatre extraits dépassant celui des traitements de référence avec des pourcentages d'analgésie s'étendant entre 58.58 et 83%.

L'étude antibactérienne des substances sur *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sp.*, *B. subtilis*, *Clostridium sp.*, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis* a montré une spécificité d'action d'*I. viscosa* sur les bactéries à Gram +. Les CMI s'étendant entre 3.125 – 50 mg/ml pour les extraits méthanoliques et entre 31.25 – 125 µl/ml pour les huiles essentielles. Pour la plupart des bactéries, l'action de l'ensemble des extraits est bactéricide.

L'effet des combinaisons substance/antibiotique sur la croissance d'*E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus* a été évalué par la méthode d'échiquier. Le calcul de l'index des concentrations fractionnaires inhibitrices a donné des interactions principalement synergiques. Cependant, l'association extrait/extrait n'a donné aucun effet bénéfique, alors que la combinaison huile/huile était synergique sur *E. coli* et *S. aureus*.

Ces travaux, qui méritent d'être approfondis, ouvrent de nouvelles perspectives d'évaluation de ces extraits sur d'autres affections.

Mots clés :

Plantes médicinales, polyphénols, huiles essentielles, cartilage, activité biologique, *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus*.

Abstract

Medicinal plants are widely used by people and are a source of new active components. *Inula viscosa* L., *Anacyclus valentinus* L., are common annual plants in Algeria. They are known for their various therapeutic effects. In addition, *A. valentinus* is used as a food condiment. The objective of this thesis is to develop these plants by assessing their anti-cartilaginous, antibacterial and analgesic power.

The polyphenol extraction by maceration with methanol (80%) gave yields of 12.46% for IVM and 17.82% for AVM, while the extraction of essential oils by hydro-distillation gave lower yields. The identification by LC-MS and colorimetric assays revealed the wealth of methanol extracts of phenolic compounds including flavonoids (49.19, 52.15 mg Equ / g dry) and lactones for IVM. As for essential oils, GC-MS showed a predominance of terpene compounds.

LD50 was assessed greater than 2500 mg / Kg for the methanolic extracts and 3 ml / kg for essential oils. Regarding the anti-arthritic power, AVM presented the largest effect with weight gain, an arthritic score, thymus indices; spleen and serum parameters close to those of the control. The extract also inhibited edema and restored cartilage structure. IVM, IVH and AVH also have interesting effects on rheumatoid arthritis induced by Freund's adjuvant in rats.

The central analgesic tested by thermal stimulus (Tail-Flick) detected a strong antinocicepteur power of four extracts exceeding the reference treatment with analgesia percentages ranging between 58.58 and 83%.

The study of the antibacterial activity of the substances against *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sp.*, *B. subtilis*, *Clostridium sp.*, *S. aureus* and *Enterococcus faecalis* showed a specificity of action of *I. viscosa* on Gram + bacteria. The IMC extending between 3.125-50 mg / ml for the methanol extracts and between 31.25 - 125 µl / ml for essential oils. For most bacteria, the action of the extracts is bactericidal.

The effect of combinations of substance / antibiotic on the growth of *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus* was assessed by the checkerboard method. The calculation of the index of fractional inhibitory concentrations gave mainly synergistic interactions. However, the association of extract / extract returned with no benefit, while the combination oil / oil was synergistic against *E. coli* and *S. aureus*.

This work, which deserve further examination, offer new opportunities for evaluating these extracts on other diseases.

Keywords:

Medicinal plants, polyphenols, essential oils, cartilage, biological activity, *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus*.

ملخص

تستخدم النباتات الطبية على نطاق واسع من قبل الناس كما انها تمثل مصدرا للمكونات النشطة الجديدة. تعتبر نبتة المكرمان والقرطوفة من النباتات السنوية الشائعة في الجزائر كما انها معروفة بآثارها العلاجية المتعددة. بالإضافة الى ان القرطوفة تستخدم كبهار في الغذاء. فالهدف من هذه الأطروحة هو استغلال هذه النباتات من خلال تقييم دورها في مكافحة هشاشة العضروف، كمضاد للجراثيم ومسكن للألام.

اعطى استخلاص البوليفينول بواسطة الميثانول مردودا يقدر ب 12.46% لنبتة المكرمان و 17.82% لنبتة القرطوفة في حين ان استخلاص الزيوت العطرية أعطى مردودا اقل. كشفت الدراسة بالكروماتوغرافيا السائلة والقياس اللوني على ان المستخلص الميثانولي غني بالمركبات الفينولية خصوصا الفلافونويد (49.19 و 52.15 مغ/غ جاف) واللاكتون بالنسبة لنبتة المكرمان. اما بالنسبة للزيوت العطرية فالدراسة بالكروماتوغرافيا الغازية أظهرت سيادة للمركبات التربينية.

قدرت الجرعة القاتلة بقيمة تفوق 2500 مغ/كغ بالنسبة للمستخلص الميثانولي و 3مغ/كغ بالنسبة للزيوت العطرية. اما بالنسبة للمفعول ضد التهاب المفاصل فقد قدمت نبتة القرطوفة تأثيرا مهما مع زيادة في الوزن، الرقم الغضروفي، مقياس التيموس والطحال والمقاييس البلازمية قريبة من الحالة العادية. ثبت المستخلص الانتفاخ وساهم في إعادة تشكيل العضروف. قدمت الزيوت العطرية والمستخلصات الميثانولينبتة لنبتة المكرمان ونبتة القرطوفة تأثيرا مهما ضد التهاب المفاصل المسبب بمادة فروند عند الفئران.

كشفت المفعول المسكن عن طريق التحفيز الحراري تأثيرا مهما للمستخلصات الأربعة حيث فاقت العلاج المرجعي بنسب تتراوح ما بين 58.58 و 83%.

أظهرت دراسة التأثير ضد البكتيريا خصوصية لمفعول نبتة المكرمان ضد البكتيريا الموجبة. التراكيز المثبطة الدنيا تتراوح ما بين 3.125 و 50 مغ/مغ/ملل بالنسبة للمستخلص الميثانولي و 31.25 و 125 مغل/ملل بالنسبة للزيوت العطرية. بالنسبة لمعظم البكتيريا فالمفعول قاتل.

تم تقييم التأثير المشترك للمستخلص/المضاد الحيوي ضد بكتريا الكولاي، العسوية الرقيقة والمكورات العنقودية الذهبية. أظهرت التراكيز المثبطة تعاون بين المادتين. في حين لم يعطى اشتراك مستخلص/مستخلص أي نتيجة. اما اتحاد زيت/زيت فقد أبدى تأثيرا تعاونيا ضد بكتريا كولاي والمكورات العنقودية الذهبية.

هذا العمل الذي يحتاج الى تعمق قد يفتح أبواب جديدة لتقييم هذه المستخلصات ضد امراض أخرى.

كلمات البحث:

النباتات الطبية، البوليفينول، الزيوت العطرية، العضروف، النشاط البيولوجي، نبتة المكرمان ونبتة القرطوفة.

Introduction générale

Introduction générale

Le cartilage articulaire est le plus abondant des cartilages dans l'organisme humain. Il représente l'un des tissus conjonctifs qui constituent l'architecture squelettique. Ce tissu maintient la stabilité des articulations avec un potentiel de réparation très limité (Vanwanseele *et al.*, 2002). Les lésions du cartilage évoluent de ce fait vers des pathologies dégénératives (Goldring, 2012). L'une d'entre elles est la polyarthrite rhumatoïde (PR). Cette atteinte inflammatoire se caractérise par sa capacité à détruire à la fois le cartilage et l'os. Plusieurs facteurs aussi bien environnementaux (agents infectieux, protéines de chocs thermiques...) qu'intrinsèques au patient (facteurs génétiques, hormonaux...) en sont les responsables (Sany, 2003).

La prise en charge de la PR est multidisciplinaire. Elle a pour objectif de limiter et/ou de retarder les déformations articulaires, d'atténuer l'inflammation et de réduire l'intensité de la douleur. Elle englobe des traitements de fonds, mais aussi des traitements symptomatiques tels que les antalgiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens qui sont largement prescrits (Trèves et Perrot, 2006). Cependant, ces médicaments pris en association et à long terme peuvent entraîner des effets indésirables parfois graves à ne pas négliger (Gettigan et Henry, 2004).

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques réalisèrent de grandes avancées en thérapeutique. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle de la dissémination des bactéries pathogènes a contribué à l'éradication des maladies infectieuses. Malheureusement, l'usage abusif et irrationnel de quelques antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme. On assiste aujourd'hui à l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ce phénomène constitue une véritable catastrophe sanitaire. En devenant insensibles, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles et conduisent à une impasse thérapeutique (Pulcini *et al.*, 2010).

En effet, les médicaments chimiques prennent de plus en plus une image défavorable par l'apparition des effets indésirables et par leur efficacité parfois insuffisante. La découverte de nouveaux agents thérapeutiques est devenue donc indispensable. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme l'une des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Lardry et Haberkorn, 2007).

Les plantes ont fait éloges dans toutes les cultures pour leurs vertus médicinales (Muthu *et al.*, 2006). De nos jours, l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2013) estime que 80% de la population mondiale s'oriente vers de la médecine traditionnelle pour des soins primaires.

De par ses différents étages climatiques et compte tenu de sa position biogéographique, l'Algérie possède un ensemble considérable d'espèces naturelles qui représentent un patrimoine phyto-génétique de très grande importance vue leur mode de répartition spatiale et leur rôle dans l'équilibre écologique. Ces ressources méritent donc d'être valorisées (Snoussi *et al.*, 2003).

Notre travail s'inscrit dans cette perspective afin de valoriser certaines plantes médicinales et aromatiques en Algérie telles que *Inula viscosa* L. et *Anacyclus valentinus* L., et de promouvoir l'utilisation de la médecine traditionnelle.

Notre étude est scindée en deux parties :

- Une synthèse bibliographique en relation avec la thèse ;
- Des travaux personnels, dont l'objectif général est d'évaluer quelques activités biologiques des composés phénoliques et des huiles essentielles issus des deux plantes *Inula viscosa* L. et *Anacyclus valentinus* L. à savoir leurs effets sur les lésions du cartilage articulaire (effet anti-arthritique), sur la douleur (effet antalgique) et sur les bactéries (effet antibactérien).

Première Partie
Rappel bibliographique

Chapitre I

Lésions du cartilage articulaire : La polyarthrite rhumatoïde

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé, non vascularisé et non innervé. Il est formé d'un seul type de cellules ; les chondrocytes, et de matrice extracellulaire riche en eau, lui conférant des propriétés mécaniques très particulières. Le cartilage joue un rôle important dans la squelettogénèse pendant le développement (Vanwanseele *et al.*, 2002). Dans cette étude, nous chercherons des substances naturelles à la place des médicaments destinés à guérir les lésions du cartilage.

I. Tissu cartilagineux

Le cartilage est un tissu mou. Sa composition varie selon sa teneur en fibres de collagènes et en fibres élastiques. Nous retrouvons ainsi, trois classes de tissus cartilagineux chez l'adulte (Buckwalter et Mankin, 1997) :

I.1. Cartilage hyalin

Le cartilage hyalin est le plus abondant dans l'organisme. Il s'agit du tissu qui recouvre l'ensemble des articulations. Il se trouve également au niveau des voies respiratoires supérieures, des côtes et du septum nasal.

I.2 Cartilage élastique

D'après son nom, ce type est riche en fibres élastiques. Cette richesse confère au cartilage une grande flexibilité. Le tissu conjonctif fibreux est présent au niveau du conduit auditif, du pavillon de l'oreille externe, de la trompe d'Eustache, de l'épiglotte et du cartilage aryténoïde du larynx.

I.3. Fibrocartilage

C'est le type le moins abondant chez l'homme. Caractérisé par une grande quantité de collagène de type I, le fibrocartilage possède une forte résistance aux tractions. Il est situé au niveau des disques intervertébraux, des ménisques, de la symphyse pubienne ou à l'insertion de certains tendons.

II. Cartilage hyalin articulaire

Le squelette est l'organe de soutien et de la motilité de l'organisme. Les deux tissus essentiels de cet organe sont l'os et le cartilage.

Nous focalisons notre étude sur ce type de cartilage qui est présent au niveau des articulations synoviales. Ces dernières se caractérisent par la présence de deux pièces osseuses recouvertes de cartilage articulaire et séparées par une cavité contenant du liquide synovial.

II.1. Constitution

Le cartilage est constitué de trois principaux éléments :

- Les chondrocytes qui sont des cellules hautement différenciées, constituent l'unique type cellulaire composant le cartilage. Elles assurent, en élaborant une substance fondamentale solide mais poreuse, le transport des éléments du métabolisme cellulaire depuis et vers le liquide synovial (Mayan *et al.*, 2013). Ces cellules sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire (une sorte de gel hydraté composé de 80% d'eau et 20% de macromolécules) (Deschner *et al.*, 2003) ;
- Les fibres de collagène, du type II constituent 90% de l'ensemble de ces fibres. Sécrété par les chondrocytes, le collagène permet de garder les protéoglycanes en place (Bobic *et al.*, 1998 ; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) ;
- Les protéoglycanes qui d'après leur nom sont formées par une protéine liée à des chaînes de glycosaminoglycanes. Comme étant chargées négativement, ces molécules se caractérisent par une très forte hydrophilie (Knudson and Knudson, 2001 ; Heinegard, 2009). Leur métabolisme au sein du cartilage articulaire dépend des facteurs biomécaniques. Une diminution de la synthèse des protéoglycanes avec un amincissement du cartilage sont ainsi observés, lors d'une immobilisation. En revanche, lors d'un exercice intensif, leur taille diminue (Hangody *et al.*, 1996).

Il existe en effet, un autre élément : l'acide hyaluronique qui joue le rôle de support des protéoglycanes (Schulz and Bader, 2007).

II.2. Structure

Le cartilage hyalin articulaire se divise en 4 zones de compositions différentes : une zone superficielle constituant 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage et recouverte de la synoviale articulaire, une zone de transition recouvrant 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage, une zone profonde (40 à 45 %) et une zone calcifiée constituant 5 à 10% de l'épaisseur du tissu.

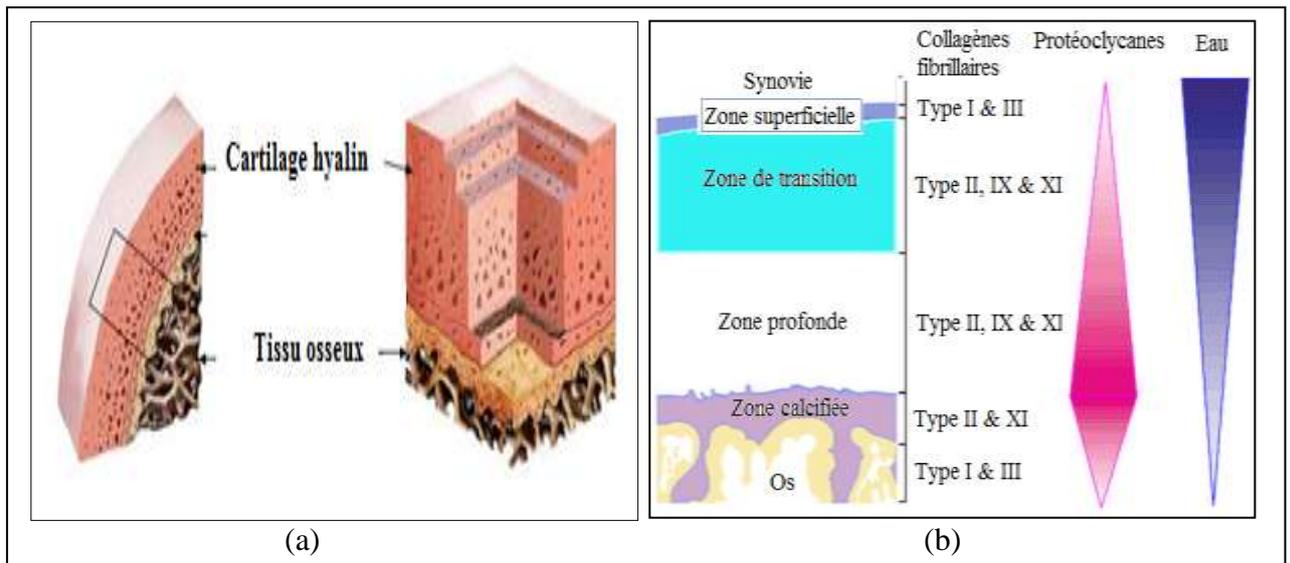


Fig.1. (a) Représentation du cartilage hyalin au niveau de l'articulation, (b) Organisation en zones du cartilage articulaire (Pujol, 1995 ; Facca, 2012)

II.3. Fonction

En association avec la capsule synoviale, le cartilage articulaire joue un rôle protecteur permettant le glissement d'une partie de l'articulation sur l'autre, et évitant ainsi les contacts directs des os entre eux. En effet, l'architecture de ce tissu conjonctif y compris la matrice extracellulaire ordonne sa fonction. Le réseau de fibres de collagènes assure la résistance aux étirements et la cohésion du tissu. Ce réseau est combiné à des complexes de protéoglycanes avec l'acide hyaluronique qui, grâce à leur grande capacité de rétention d'eau, permettent la résistance à la compression (Allabouch, 2006).

II.4. Lésions du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire et globalement les articulations, sont soumis à de nombreuses contraintes et sont par conséquent sujets à diverses détériorations. Les lésions de ce tissu possèdent en effet, un fort impact sur la vie du patient. Elles peuvent causer une douleur importante, une incapacité de mouvement et une perte d'indépendance. Ces lésions peuvent être regroupées en trois catégories principales : les lésions traumatiques, pathologiques et dégénératives, dont les plus fréquentes sont l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde (Goldring, 2012).

III. La polyarthrite rhumatoïde

III.1. Généralités

Une articulation est composée de deux os recouverts de cartilage et délimitée par une capsule articulaire sécrétant le liquide synovial lubrifiant l'articulation. Des ligaments et des muscles entourent l'articulation, pour la maintenir et la rendre mobile (SFR, 2006).

Le terme rhumatisme désigne les maladies touchant l'appareil locomoteur (affections osseuses, articulaires ou péri-articulaires). Si le rhumatisme affecte précisément le cartilage ou la membrane synoviale, nous parlons alors d'une maladie articulaire ou arthropathie.

L'arthrite est une atteinte inflammatoire d'une ou de plusieurs articulations. C'est une synovite où la membrane synoviale sécrète anormalement du liquide synovial. L'accumulation de ce liquide crée un épanchement et provoque par conséquent un gonflement de l'articulation. Cette inflammation peut être aiguë ou chronique (Guillemin *et al* ; 1994).

Le terme de polyarthrite rhumatoïde (PR) signifie « plusieurs (poly-) articulations touchées par une inflammation (-arthrite) et liée au facteur rhumatoïde ». Elle est appelée aussi polyarthrite chronique évolutive. Cette connectivite se caractérise par sa capacité à détruire à la fois le cartilage et l'os. La PR fait partie des maladies systémiques, car plusieurs organes en plus des articulations sont susceptibles d'être touchés. Elle fait également partie des maladies auto-immunes. Un dérèglement du système immunitaire du patient avec formation d'auto-anticorps, intervient donc dans l'étiologie et la physiopathologie de cette maladie (Sany, 2003).

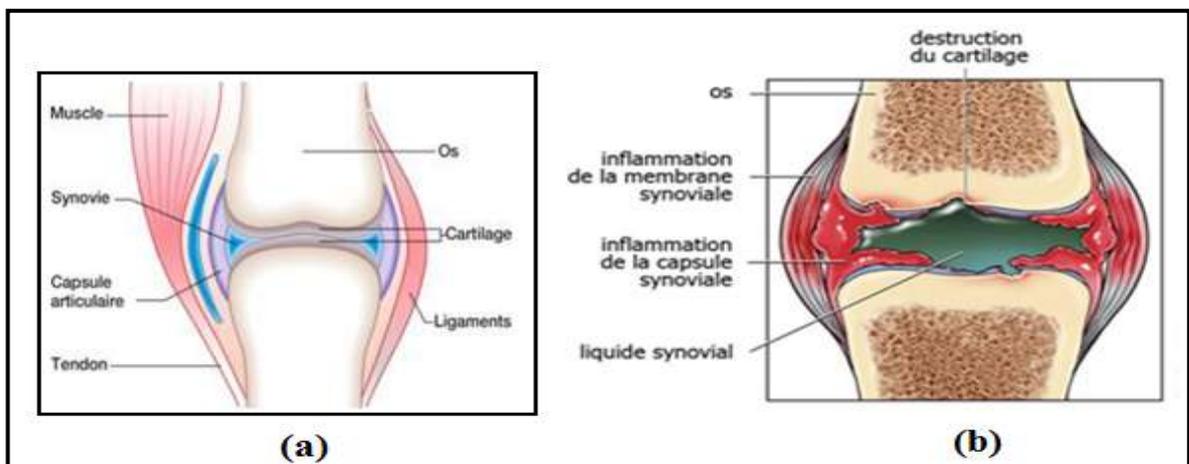


Fig.2. Schéma d'une articulation saine (a) et après inflammation (b) (SFR, 2012)

III.2. Epidémiologie

La PR est de façon certaine le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Sa prévalence dans le monde est évaluée à 1% de la population adulte (Menkès *et al.*, 2004). En Afrique et en Asie, elle est classiquement estimée entre 0,1 et 0,3%. Selon une enquête menée en 2014 par Slimani et Ladjouze-Rezig, la prévalence de la PR en Algérie est estimée à 0,15%.

Les premiers signes de la pathologie apparaissent généralement entre 45 et 55 ans pour les femmes et entre 55 et 65 ans pour les hommes bien qu'il existe de rares formes juvéniles. La pathologie est trois fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, mais cette différence diminue progressivement au-delà de 70 ans (Dougados *et al.*, 2005).

III.3. Etiologie

La PR est une pathologie multifactorielle. Il semblerait que le processus pathologique est la conséquence de plusieurs facteurs aussi bien environnementaux qu'intrinsèques au patient (facteurs génétiques, hormonaux, psychologiques...). Le ou les antigènes responsables du déclenchement de la PR restent inconnus. Le dysfonctionnement immunitaire pourrait être dû à des antigènes endogènes (le collagène, la glycoprotéine 39 du cartilage, les facteurs rhumatoïdes) ou exogènes (agents infectieux, protéines de chocs thermiques...) (Sanny, 2003).

III.3.1. Facteurs génétiques

Dans un terrain particulier, les gènes HLA de classe II en association avec d'autres gènes commandent probablement la réponse à un agent extérieur mal défini. En plus des gènes HLA, il existe d'autres facteurs génétiques qui ne sont pas encore identifiés. Globalement, ces facteurs connus et méconnus représentent 30 % du risque de développer une PR (Andersson *et al.*, 2008).

Tab.1. Gènes associés à la polyarthrite rhumatoïde et leurs rôles probables dans sa pathogénie (Boki *et al.*, 1993 ; Bengana *et al.*, 2014).

Locus	Rôle possible
HLA-DRB1 (75% des personnes atteintes)	Présentation d'antigène
PTPN22 (30% des personnes atteintes)	Activation des lymphocytes T
STAT4	Différenciation des lymphocytes T
TRAF1-C5	Signal du TNF (TRAF) et activation du complément
6q23 (TNFAIP3)	Signal et production du TNF
CD40	Production d'auto-anticorps
CTLA4	Activation des lymphocytes T
PADI4	Citrullination et production d'auto-anticorps

III.3.2. Facteurs hormonaux

Comme étant une maladie plus fréquente chez les femmes, la genèse de la PR peut être influencée par les hormones féminines. Il existe une rémission pendant la grossesse et souvent une poussée après l'accouchement. En période de ménopause, le risque est plus élevé. Ceci peut être expliqué par le fait que les récepteurs oestrogéniques sont présents à la surface des *fibroblast like synoviocytes* (FLS), leur activation entraîne la sécrétion de métalloprotéases dans la synoviale induisant ainsi la destruction cartilagineuse. (Masi *et al.*, 1995 ; Cutolo *et al.*, 2002)

III.3.3. Facteurs environnementaux

Certains facteurs environnementaux participent à la contraction de la maladie émanant en quelque sorte du mode de vie et du régime alimentaire. L'état psychologique constitue également un facteur de risque. Le tabagisme est fortement incriminé dans le déclenchement de la PR. En effet, le tabac favorise la citrullination des protéines ce qui stimule la production d'auto-anticorps anti peptides citrullinés chez certains individus (Bang *et al.*, 2010 ; Prete *et al.*, 2011).

Des agents infectieux viraux (Epstein Barr), bactériens (*Escherichia Coli*) et mycobactériens sur un terrain génétiquement prédisposé peuvent être responsables de l'apparition de la pathologie par une activation de l'immunité innée (Saber *et al.*, 2011). En effet, le traitement habituel pour les infections bactériennes est l'antibiothérapie. Qu'elle soit bactériostatique ou bactéricide ; l'antibiotique peut agir sur la synthèse du peptidoglycane, sur la membrane cytoplasmique, sur le métabolisme intermédiaire, sur la synthèse des protéines ou encore sur la synthèse de l'acide nucléique. Malheureusement, on assiste aujourd'hui à l'émergence des résistances bactériennes où la bactérie peut échapper à l'action des antibiotiques par la réduction de sa perméabilité membranaire, la production d'enzymes inactivant les antibiotiques ou par la modification de la cible de liaison de ces substances (Pulcini *et al.*, 2010). Le phénomène de l'antibiorésistance pourrait donc augmenter le risque de déclencher une PR.

III.4. Physiopathologie

La lésion élémentaire de la polyarthrite rhumatoïde est l'atteinte inflammatoire de la membrane synoviale, donnant naissance au pannus : tissu synovial inflammatoire et prolifératif, qui recouvre le cartilage articulaire et produit des enzymes responsables des destructions osseuses et cartilagineuses. D'une manière générale, on distingue 3 phases dans l'établissement de cette pathologie.

III.4.1. Phase d'initiation

Le processus de déclenchement de la PR reste inconnu. Les facteurs, à l'origine de la pathologie, impliquent essentiellement l'immunité innée. Les peptides antigéniques responsables de l'apparition de la PR peuvent être d'origine endogène (collagène type2, protéoglycanes, protéines de la matrice) ou exogène, issus de bactéries ou de virus (Yeo *et al.*, 2011).

III.4.2. Phase inflammatoire

Au cours de cette phase, l'immunité acquise occupe un rôle central en impliquant un complexe tri-cellulaire : les cellules présentant l'antigène (CPA), les cellules dendritiques et les synoviocytes. En effet, la stimulation des lymphocytes T, B et la différenciation en plasmocytes provoquent entre autre la sécrétion de facteurs rhumatoïdes et d'anticorps anti-CCP. Les cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1 et le TNF- α interviennent en tant que médiateurs à la réponse inflammatoire et sont à l'origine des destructions cartilagineuses et osseuses.

Suite à cette réaction inflammatoire excessive, il se produit un pannus synovial. C'est un épanchement synovial s'accompagnant d'une prolifération anormale des cellules de cette membrane. Les chondrocytes eux-aussi sont des acteurs de ce processus puisque la dégradation du cartilage peut se dérouler même en l'absence de pannus (HAS, 2007 ; Combe, 2007).

III.4.3. Phase de destruction articulaire

Cette phase est secondaire à l'action des cytokines, et à la prolifération pseudo tumorale des synoviocytes. Il existe un défaut d'apoptose et une production de métalloprotéinases, de cathepsine et de collagénases (Saber *et al.*, 2011).

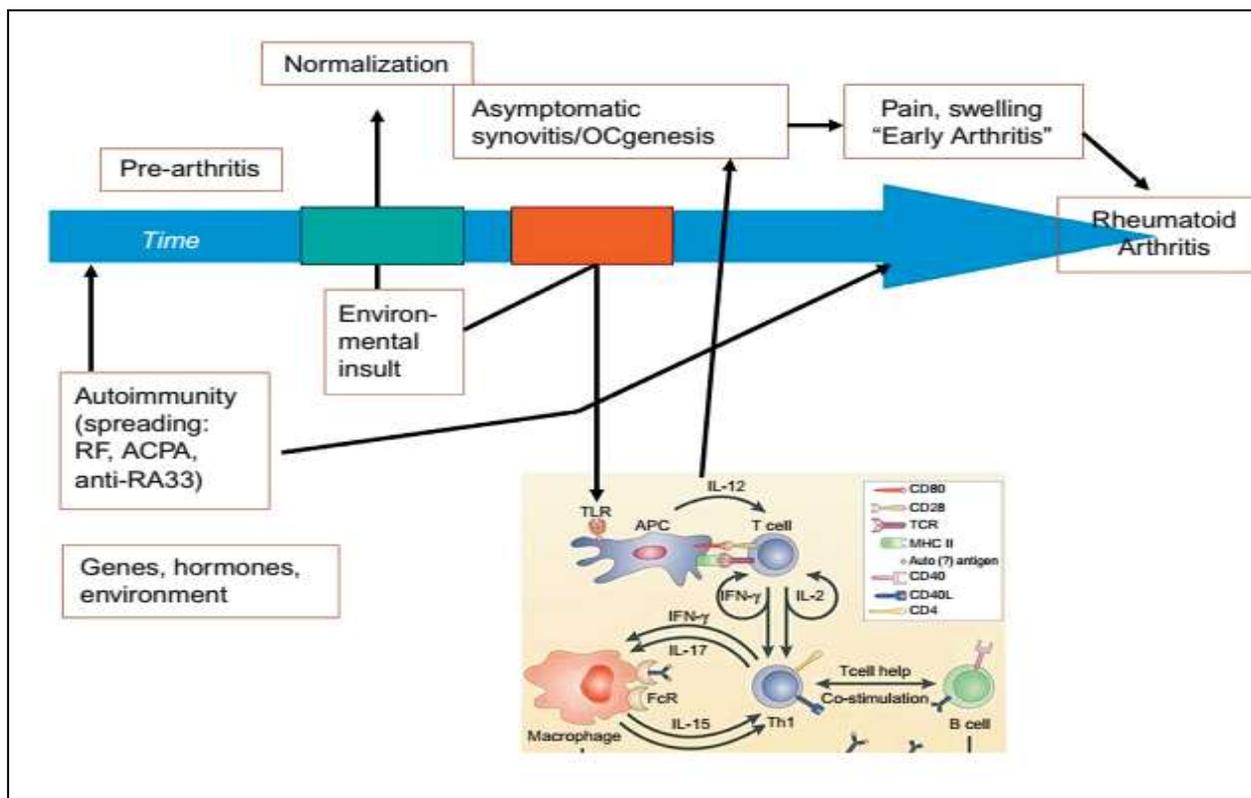


Fig.3. Concept de la genèse et de l'évolution d'une arthrite rhumatoïde (Rose & Mackey, 2014).

Une interaction environnement-hôte pourrait déclencher l'évolution d'une réponse auto-immune non pathogène qui, contrairement à de nombreuses réactions similaires, dans un hôte génétiquement prédisposé peut persister. La survenue d'une autre agression environnementale pourrait déclencher une synovite asymptomatique qui, en présence d'auto-anticorps, provoque la production anormale des ostéoclastes et donc le déclenchement d'une arthrite rhumatoïde.

III.5. Diagnostic

La démarche diagnostique repose sur trois objectifs majeurs (Gerhard, 2014) :

- Identification du rhumatisme inflammatoire débutant pouvant correspondre à une PR ;
- Elimination d'un autre rhumatisme inflammatoire défini ;
- Recherche des éléments permettant de prédire l'évolution vers une PR destructive.

Dans la phase initiale de la maladie, l'inflammation est réversible, mais le diagnostic est plus difficile contrairement à la phase d'état où les déformations sont caractéristiques. Selon l'HAS (2007), il est important de diagnostiquer la PR le plus précocement possible, afin de prévenir son évolution vers une forme érosive, et ce, par la mise en œuvre des examens cliniques, biologiques et radiologiques. L'interrogatoire du patient, notamment ses antécédents et les circonstances d'apparition des symptômes, peut également orienter le praticien.

III.5.1. Signes cliniques

Le tableau clinique au début de la PR est très variable, les signes les plus fréquents sont la douleur poly-articulaire, la tuméfaction, la chaleur, la rougeur, la raideur matinale et la sensibilisation de certaines articulations. L'inflammation réduit la mobilité et peut se manifester de manière brutale en forme de crises aiguës, puis de périodes de rémission.

En effet, pour la confirmation du diagnostic, l'HAS recommande que la rigidité matinale doit être supérieure à 30 minutes et que l'arthrite affecte au moins 3 articulations.

Il est à noter que l'absence de signes cliniques articulaires ne suffit pas pour autant à éliminer le diagnostic de PR. Certaines formes de la maladie ont une initiation purement biologique.

III.5.2. Examens biologiques

Devant une suspicion d'une PR, certains examens biologiques sont exigés, à savoir un bilan sanguin, des analyses immunologiques et un examen du liquide synovial. Cependant, certains patients présentent tout au long du développement de leur maladie des bilans normaux. Les variations sont donc inconstantes.

III.5.2.1. Bilan sanguin

Le bilan sanguin comprend : la recherche du syndrome inflammatoire (vitesse de sédimentation VS), le dosage de la protéine C réactive (CRP), l'examen de la numération de la formule sanguine (NFS) et la recherche d'une élévation des transaminases afin d'éliminer tout risque d'une atteinte hépatique.

L'existence d'une inflammation, se traduit par une VS dépassant 20mm à la première heure et une CRP supérieure à 10 mg/L. les résultats de la NFS peuvent révéler une thrombocytose inflammatoire et une leucocytose.

III.5.2.2. Analyses immunologiques

Les marqueurs immunologiques recherchés habituellement devant une PR sont le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (anti-CCP). Ces marqueurs ne sont détectables qu'à partir du sixième mois voire un an d'évolution de la pathologie.

Les facteurs rhumatoïdes qui sont des immunoglobulines M et A sont synthétisés au niveau de la synovie. En cas d'une PR, les FR jouent un rôle dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, leur présence ne confirme pas forcément le diagnostic, ils peuvent être également présents chez des personnes saines (Sanny, 2003 ; Combe, 2007).

Les anti-CCP qui appartiennent à la famille des anticorps antifilagrines s'attaquent à la fibrine présente au niveau de la synoviale rhumatoïde. Ils sont détectés par la technique ELISA (Syversen *et al.*, 2010).

III.5.2.3. Analyse du liquide synovial

Cette analyse permet de bien mener le diagnostic. Au cours de la PR, la synovie est inflammatoire et présente donc des quantités importantes de polynucléaires neutrophiles. Cependant, si l'arthrite est d'origine virale, le liquide sera plus riche en lymphocytes (Marc, 2012).

II.5.3. Examens radiologiques

Les examens radiographiques permettent de mettre en évidence les premières déminéralisations ou œdèmes dans la phase initiale de la PR, et des érosions dans des stades plus avancés. Un bilan radiographique normal ne permet pas en effet, d'écarter le diagnostic de la PR. Il serait sollicité d'avoir recours à l'échographie articulaire ou à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Gerhad, 2014).

- Les différents examens à réaliser pour l'établissement du diagnostic ne sont pas spécifiques à la PR. Les manifestations cliniques et biologiques peuvent être confrontées aux diagnostics différentiels. Il est donc primordial, d'écarter les autres types d'arthrite. Une fois le diagnostic confirmé, le traitement approprié doit être instauré rapidement afin de prévenir le développement de la pathologie et des lésions qu'elle induit (HAS, 2007).

IV. Prise en charge et stratégie thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde

Quelque soit la stratégie suivie, le traitement de la PR a pour objectif : de réduire l'intensité de la douleur par des traitements symptomatiques, de limiter ou de retarder les déformations articulaires par des traitements de fond et de maintenir la qualité de vie par l'insertion socioprofessionnelle du patient.

IV.1. Traitements médicamenteux

Les traitements médicamenteux restent le principal outil de la prise en charge de la PR. L'arsenal thérapeutique comprend des traitements approfondis et symptomatiques (HAS, 2011).

IV.1.1. Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques visent uniquement à réduire la douleur et l'inflammation liées à la pathologie sans chercher la cause. Ils agissent généralement de façon rapide et comportent des antalgiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et des corticoïdes.

IV.1.1.1. Antalgiques

Ce sont des médicaments qui atténuent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations. Deux grandes familles thérapeutiques composent cette classe pharmacologique. Nous trouvons en premier lieu les antalgiques périphériques qui agissent localement au niveau du stimulus douloureux par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. Ces dernières contribuent à la douleur par la sensibilisation des terminaisons nerveuses.

La seconde famille concerne les antalgiques centraux ou morphiniques dérivés de la plante *Papaver somniferum* L. qui agissent sur des récepteurs spécifiques présents dans différentes régions du système nerveux central. Les médicaments appropriés à cette famille participent à l'analgésie. En effet, un analgésique diffère d'un antalgique par sa capacité à supprimer la sensibilité à la douleur. Toutefois cette différence est négligée en pratique courante et les termes antalgiques et analgésiques sont utilisés indifféremment (Bannwarth et Pehourcq, 2003).

Les antalgiques sont généralement bien tolérés et sont relativement dépourvus d'effets indésirables dans les conditions normales d'utilisation. Ils sont souvent utilisés dans la prise en charge du patient polyarthritique. Selon leur puissance et selon le degré de douleur, trois paliers d'antalgiques peuvent être définis (Bannwarth et Pehourcq, 2003; Brandin *et al.*, 2007).

- Dans le premier palier, le paracétamol est l'acteur majeur. Il est administré à une dose maximale de 4 grammes/jour. Malgré sa bonne tolérance, il peut être à l'origine d'une hépto-toxicité. Parmi ses formes commerciales : Efferalgan® et Doliprane®.
- Le palier II comporte les opiacés (dérivés morphiniques) faibles destinés pour des douleurs modérées à sévères ne cédant pas au paracétamol. Ils peuvent provoquer plus d'effets

indésirables tels que les vertiges, la somnolence et les troubles gastriques. Ces médicaments peuvent être utilisés seuls comme le cas du tramadol (Supramadol®, Contramal ®) ou associés aux antalgiques de palier I. Citant comme exemple la combinaison codéine paracétamol (Codoliprane®) ou l'association tramadol paracétamol (HAS, 2007).

- Les antidouleurs de palier III sont des dérivés morphiniques majeurs difficilement tolérables pour le patient. Ils sont peu efficaces dans la PR.

IV.1.1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Ajoutant à leur effet anti-inflammatoire, les AINS sont des antipyrétiques et des antalgiques de classe I. Les médicaments de cette classe thérapeutique possèdent la capacité de bloquer l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine. Cette dernière intervient dans le processus inflammatoire, mais également dans la protection des muqueuses et dans l'agrégation plaquettaire. La sécrétion des prostaglandines est catalysée par la COX II dans le premier cas et par la COX I dans le second (Husson *et al.*, 2003). De ce fait, certains AINS ciblant spécifiquement les prostaglandines pathologiques ont été développées pour limiter l'apparition des effets indésirables.

Au cours de la PR, les AINS sont fréquemment prescrits pour leurs actions rapides et puissantes contre la douleur et les gonflements au niveau des articulations. Les formes galéniques les plus utilisées en PR sont les dérivés propioniques (Profénid®, Bi-Profénid®), les dérivés de l'indole avec l'indométacine (Indocid®), les dérivés acylacétiques avec le diclofénac (Voltarène®) et les oxicams (Feldène®). En effet, certaines poussées inflammatoires sévères nécessitent l'utilisation d'AINS sous forme injectable (intraveineuse ou intramusculaire).

Cependant, l'administration des AINS doit être de courte durée, à des doses minimales et au moment des repas afin d'éviter les troubles gastriques. La toxicité gastrique peut être expliquée par le fait que ces médicaments inhibent la COX I (Brandin *et al.*, 2007).

IV.1.1.3. Glucocorticoïdes ou anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les glucocorticoïdes sont fréquemment prescrits dans les cas de PR. Ils sont d'ailleurs capables d'une part de limiter l'évolution radiographique et d'autre part de stopper rapidement les douleurs. Ces molécules pourraient donc être considérées comme traitement de fond lorsque la pathologie est débutante (Kahn *et al.*, 2007). Dans la prise en charge des PR en phase d'état et dans le but de traiter les poussées inflammatoires, les AIS peuvent être associés à un traitement

de fond. Ils peuvent être aussi associés à des AINS, afin d'améliorer l'action de ces derniers, mais avec un suivi particulier. L'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est due au blocage de l'acide arachidonique suite à l'inhibition de phospholipase A₂, empêchant ainsi la sécrétion des prostaglandines. Ces glucocorticoïdes possèdent également une action immunomodulatrice par l'inhibition de la production de certains acteurs de l'inflammation (interleukines 1 et 2, interférons...) (Saag *et al.*, 1996).

Cependant, ce traitement accentue l'apparition de certains facteurs de risque tels que l'hypertension artérielle et les troubles du métabolisme lipidique. La réduction de la densité de l'os est également l'un des effets indésirables de la corticothérapie (Everdingen *et al.*, 2004).

IV.1.2. Traitements de fond hors biothérapies

Appelés aussi DMARD (*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*), les traitements de fond en complémentarité avec les traitements symptomatiques montrent une amélioration clinique après seulement 3 mois de suivi. Deux catégories peuvent être définies, d'une part les SMARD (*Symptom Modifying Anti-Rheumatic Drugs*) qui offrent une amélioration des signes cliniques et biologiques et d'autre part les DCART (*Disease Controlling Anti-Rheumatic Therapy*), dont le rôle est d'améliorer la fonction de l'articulation et de limiter la destruction de l'os.

Cependant, les DMARD doivent être instaurés durant les six premiers mois de la PR, et doivent également être constamment adaptés à la sévérité de la maladie en raison de leur efficacité qui est retardée, inconstante, suspensive et épuisable. De ce fait, le traitement de fond nécessite d'être maintenu tant que son efficacité et sa bonne tolérance sont conservées. Les traitements de fond conventionnels les plus connus sont le méthotrexate (MTX), le léflunomide (Arava®) et la sulfasalazine (Salazopyrine®) (Dougados *et al.*, 2002 ; Kremer, 2004).

IV.1.3. Traitement de fond par les biothérapies

Des progrès considérables dans la connaissance des mécanismes immunologiques responsables de la PR ont été développés ces dernières années. Ceci a permis de déterminer les points clés pour la réussite du traitement de la pathologie et la mise en œuvre des biothérapies. Ces drogues agissent en effet d'une manière très spécifique. Elles se dirigent vers les cytokines d'une part, et d'autre part vers les cellules responsables de la physiopathologie de la PR. Les molécules les plus commercialisées sont des anticorps monoclonaux anti TNF- α utilisés en perfusion (l'infliximab®) ou en sous-cutanée (Brandin *et al.*, 2007).

IV.2. Traitements médicamenteux par voie locale

Dans certains cas de PR, une supplémentation au traitement médicamenteux peut être mise en place. D'ailleurs le spécialiste ou le rhumatologue préfère intervenir localement au niveau de l'articulation touchée par ponction, par infiltration de corticoïdes ou par lavage articulaire.

IV.3. Traitement chirurgical

Il est connu que la polyarthrite rhumatoïde peut provoquer des lésions articulaires et osseuses persistantes, rendant ainsi les traitements antérieurs inefficaces. Le recours à la chirurgie sera donc privilégié. La décision nécessitera une concertation multidisciplinaire avec le patient, le chirurgien, le rhumatologue et une équipe de rééducation fonctionnelle. La chirurgie a pour objectif d'améliorer le fonctionnement de l'articulation en arrêtant sa destruction par excision du pannus synovial ; c'est la chirurgie dite conservatrice. Une excision du tissu synovial et du cartilage détruit est réservée aux destructions majeures de l'articulation ; c'est le cas de la chirurgie dite non conservatrice (Nizard, 2005).

IV.4. Traitements physiques : réadaptation et rééducation

Les traitements physiques de réadaptation et de rééducation sont importants et indispensables. Ils doivent intervenir rapidement. La rééducation qui précède généralement la réadaptation permet de prévenir ou de corriger une atteinte récente. En contrepartie, la réadaptation consiste à redonner un maximum d'autonomie à une personne handicapée (Dougados *et al.*, 2005).

Les traitements physiques appellent différentes spécialités tels que la kinésithérapie, le massage et l'ergothérapie. Ils auront pour objectifs d'atténuer la douleur, d'éviter les altérations articulaires et de permettre au patient de s'adapter à l'évolution de son handicap.

V. Place des produits naturels dans le traitement de la PR

Tous les traitements de fond ou symptomatiques utilisés dans la prise en charge de cette pathologie présentent d'ailleurs des effets indésirables à ne pas négliger. Une approche englobant la diète, certains suppléments et des produits naturels peut être bénéfique pour le patient polyarthritique et pourrait s'insérer dans la démarche de prise en charge de sa santé (Skoldstam *et al.*, 2003 ; Stamp *et al.*, 2005 ; Solau-Gervais, 2010).

V.1. Huiles de poisson

Les huiles de poisson sont connues pour leur efficacité dans les pathologies inflammatoires. Etant une source d'acide gras polyinsaturé oméga-3 y compris l'acide eicosapentaénoïque (EPA), ces huiles agissent directement sur le site de l'inflammation. Elles augmentent la synthèse des médiateurs anti-inflammatoires par rapport à ceux pro-inflammatoires (Wall *et al.*, 2010).

Des essais cliniques ont été menés sur le traitement de la PR par les oméga-3. Dans la plupart des cas, une amélioration significative des paramètres cliniques a été observée avec parfois une différence significative entre le groupe traité et le groupe placebo. Ces améliorations portent sur le nombre d'articulations douloureuses ou gonflées et sur l'engourdissement matinal. De plus, la consommation des poissons source d'oméga-3 n'entraîne aucune interaction avec les traitements médicamenteux de la PR (Kremer *et al.*, 1995 ; Ierna *et al.*, 2010 ; Hah *et al.*, 2011).

V.2. Probiotiques

Les maladies auto-immunes, notamment la PR sont fréquemment reliées au syndrome appelé intestin perméable. Ceci peut en effet, causer ou aggraver ce type de maladie. C'est dans cette optique que les probiotiques peuvent être utiles afin qu'ils normalisent la fonction intestinale et réduisent l'inflammation (Seignalet *et al.*, 1989 ; Hagen *et al.*, 2009).

V.3. Plantes

Le recours aux plantes pour le traitement de la PR se base sur la recherche de celles ayant un effet anti-inflammatoire. Certaines plantes tels que la griffe du diable, le gingembre et le piment de Cayenne ont prouvé leurs effets anti-inflammatoires voire même antiarthritiques *in vitro* et *in vivo* (Okoli *et al.*, 2003 ; Soeken *et al.*, 2003 ; Al-Nahain *et al.*, 2014).

Ces dernières années, l'utilisation des plantes est devenue courante en médecine vétérinaire. Elles sont utilisées pour leurs vertus antalgiques, anti-inflammatoires et chondro-protectrices (Hanser, 2009).

- Estimant que leurs effets secondaires sont moins nombreux, les préparations à base de plantes médicinales sont sujettes à de nombreux travaux sur la recherche de molécules alternatives aux traitements synthétiques. La phytothérapie peut donc occuper une place dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Chapitre II

Métabolites secondaires des plantes médicinales : Polyphénols et Huiles essentielles

*«Chaque plante guérissante est un rayon vers l'éveil de l'âme et vers
la redécouverte de l'essence » Dr Dorin Dragos*

I. Plantes médicinales

I.1. Terminologie

Une plante médicinale ou encore « drogue végétale » est définie par la pharmacopée comme étant une plante, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Lorrain, 2013).

La phytothérapie désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes. Ce mot vient du grec «*phyton* » qui signifie plante et «*therapein* » qui signifie soigner. En phytothérapie, les plantes sont consommées telles quelles (infusion) ou après transformation (extraits, médicaments à base de plantes...) (Larousse médicale, 2001 ; Gazengel et Orecchioni, 2013).

L'aromathérapie comme son nom l'indique, recourt aux extraits aromatiques des plantes (les huiles essentielles). Cet emploi particulier est en effet, une branche de la phytothérapie (AFNOR, 1986 ; Lorrain, 2013).

Les propriétés médicinales des éléments contenus dans les plantes peuvent s'expliquer par le fait que ces dernières synthétisent des métabolites primaires (protéines, lipides et hydrates de carbone) pour leur existence et celles des organismes qui s'en nourrissent. A partir de ces métabolites primaires, les plantes synthétisent d'autres secondaires (Cox, 1994).

II. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement. Ils la protègent donc contre les attaques des champignons, des bactéries, d'insectes et des animaux. C'est dans ce groupe de métabolites que se sont retrouvées les molécules actives. Nous citons parmi ces substances les composés phénoliques et les huiles essentielles (Smallfield, 2001).

II.1. Polyphénols

Dénommés aussi composés phénoliques, les polyphénols, constituent une famille de molécules organiques présentes dans les plantes, allant des racines jusqu'aux fruits, faisant donc partie intégrante de notre alimentation. En tant que métabolites secondaires, ces composés n'exercent aucune fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou

hétéroside. Leur nom provient donc du composé parent le plus simple : le phénol. Les noyaux aromatiques peuvent être synthétisés par deux voies d'élaboration, la voie shikimate ou la voie polyacétates pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates.

II.1.1. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre d'unités phénoliques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Nous pouvons distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (polyphénols) (Halliwell *et al.*, 1992 ; Harrington *et al.*, 1994). Par abus, nous les appelons indifféremment composés phénoliques ou polyphénols (Stalikas, 2007).

II.1.1.1. Composés phénolique simples

A. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils dérivent de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Zatta *et al.*, 2004).

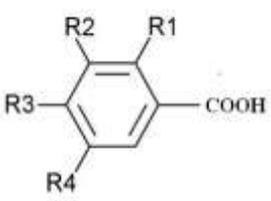
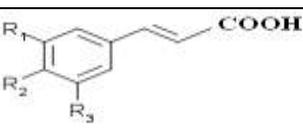
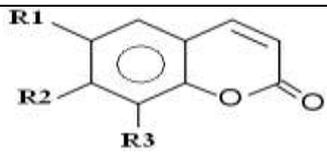
- **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)**

Ces acides peuvent être libres ou combinés à l'état d'esters ou hétérosides (Zatta *et al.*, 2004 ; Kaneda *et al.*, 2007). Ils peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais dans les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon (Mancuso *et al.*, 2000).

- **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)**

Rarement libres, ces composés peuvent être estérifiés (Kaneda *et al.*, 2007), amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Zatta *et al.*, 2004). L'acide caféique est en effet, le principal représentant de cette catégorie. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits (Mancuso *et al.*, 2000).

Tab.2. Principaux types des acides phénoliques et de coumarines (Sarmi-Manchado et Cheymer, 2006).

<i>Structure</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>Acide phénolique</i>
 <i>Ac hydroxy-benzoïque</i>	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
 <i>Ac hydroxy-cinnamique</i>	H	H	H	/	Acide cinnamique
	OH	OH	H	/	Acide caféique
 <i>Coumarines</i>	H	OH	OH	/	Daphnétole
	OHC3	OH	OH	/	Fraxétole

B. Flavonoïdes

D'après Piquemal G. (2008), le terme flavonoïde désigne la couche externe des écorces de l'orange, alors que d'autres auteurs supposent que le mot flavonoïde dérive de flavus qui signifie jaune (Karaali *et al.*, 2004). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent donc tous une même structure de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux cycles aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane selon le système C6-C3-C6 comme le désigne la figure ci-dessous (Emerenciano *et al.*, 2007).

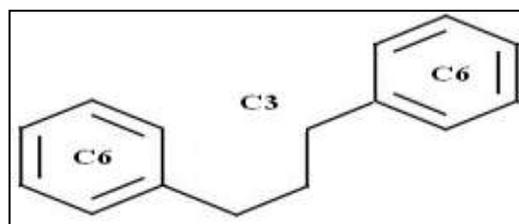


Fig.4. Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Brown *et al.*, 1998). Les

flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé ...) (Verhoeven *et al.*, 2002 ; Urquiaga et Leighton, 2000). Selon leur structure, les flavonoïdes sont classés en 6 groupes : flavanols, flavones, flavonoles, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medic-Saric *et al.*, 2004).

- **Flavanones**

Les flavanones sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 (Zatta *et al.*, 2004 ; Perron et Brumaghim, 2009). Les agrumes constituent d'ailleurs la principale source alimentaire de flavanones (Lahouel, 2005 ; Piquemal, 2008).

- **Flavonols**

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent présents sont le D-glucose et le L-rhamnose (Brown *et al.*, 1998). Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons, le poireau, le chou, les baies et le thé (Yoshino et Murakami, 1998 ; Jovanovic *et al.*, 1998 ; Heim *et al.*, 2002).

- **Flavanols**

Ces composés connus également comme dérivés de catéchine constituent la catégorie la plus complexe des flavonoïdes. Ces composés vont des simples monomères : catéchine et épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères (Perron et Brumaghim, 2009). Les catéchines sont souvent présentes dans le chocolat, le thé et dans les fruits comme l'abricot (Kostyuk *et al.*, 2001 ; Moridani *et al.*, 2003).

- **Anthocyanidines**

Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin (Bravo et Anaconda, 2001).

Tab.3. Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W- Erdman *et al.*, 2007).

Classes	Structure chimique	R 1	R 2	R 3	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-	OH	Daidézine

C. Alcools phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol et hydroxytyrosol sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (Chvátalová *et al.*, 2008).

II.1.1.2. Composés phénoliques complexes

Cette classe représente les tanins qui sont des molécules à poids moléculaire élevé (Madi, 2010) localisées dans les vacuoles (Andjelkovic *et al.*, 2009). Ils servent de défense contre les

micro-organismes et sont utilisés pour le tannage du cuir grâce à leur aptitude à se combiner aux protéines. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes.

A. Tanins hydrlsables (tanins galliques)

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou l'un de ses dérivés tels que l'acide ellagique et l'acide chébulique (Jungbluth *et al.*, 2000 ; El Hajji *et al.*, 2006). Ce type de tanins est facilement hydrolysable par voie chimique ou enzymatique (Hayakawa *et al.*, 1997).

B. Tanins condensés (tanins catéchiqes)

Egalement appelés pro-anthocyanidines, les tanins condensés sont plus complexes que les tanins galliques possédant un squelette phényl-2-chromane de flavonoïdes. Ils peuvent être constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines et de proanthocyanes (Hiramoto *et al.*, 1996 ; El Hajji *et al.*, 2006).

II.1.2. Procédés d'extraction

II.1.2.1. Extraction solide-liquide et Macération

Ce type est le plus simple des méthodes à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires. La technique est basée sur l'utilisation des solvants seuls ou en combinaison choisis en fonction de la famille de composés à extraire. Les solvants les plus utilisés sont d'ailleurs le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'eau. En effet, un même échantillon peut subir plusieurs macérations successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires et ce, pour obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt (Ibañez *et al.*, 1998).

Les travaux publiés par Justesen *et al.* (1998), par Escarpa et Gonzalez (1998) et par Careri *et al.*, (2001) préconisent l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des végétaux.

II.1.2.2. Extraction au Soxhlet

L'appareillage Soxhlet, en utilisant des solvants offre une extraction continue des espèces chimiques contenues dans une matrice solide. Contrairement aux macérations classiques, l'échantillon, placé dans une cartouche poreuse est traversé par les vapeurs du solvant. Ces dernières, passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Une fois le condensat atteint le sommet du siphon, le liquide retourne dans le ballon. Ce cycle est

répété jusqu'à l'épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010 ; Bimakr *et al.*, 2011).

II.1.2.3. Extraction au CO₂ supercritique

L'extraction aux fluides supercritiques se caractérise par une vitesse de diffusion élevée et une viscosité faible qui en font une méthode de choix pour l'extraction des molécules végétales actives tels que les caroténoïdes, flavonoïdes et terpènes (Mukhopadhyay, 2000). Contrairement aux solvants organiques, l'utilisation du gaz inerte y compris le CO₂ à température ambiante présente l'avantage de ne laisser aucun résidu dans l'extrait et dans la matière première.

II.1.2.4. Extraction par ultrasons

L'extraction par ultrasons est analogue à celle aux solvants, sauf que les vibrations permettent d'extraire plus rapidement les constituants. Selon Chemat *et al.* (2004), cette méthode est plus rapide par rapport à l'extraction classique et celle par Soxhlet. Plusieurs auteurs ont appliqué cette technique, citant par exemple Cuoco *et al.* (2009) qui ont extrait les anthraquinones à partir des racines de Garance (*Rubia tinctorum*).

II.1.3. Rôle des composés phénoliques

II.1.3.1. Chez les plantes

Les composés phénoliques notamment les flavonoïdes sont impliqués dans un certain nombre de fonctions chez les plantes. En effet, ils sont responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines ce qui attire les pollinisateurs. Ils interviennent ainsi dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Stalikas, 2007). Ces molécules jouent un rôle important dans l'équilibre et l'adaptation de la plante avec son milieu naturel, en lui permettant de tolérer des stress variés, de se protéger contre les radiations UV et de résister aux organismes pathogènes y compris les microorganismes (Beta *et al.*, 2005 ; Macheix *et al.*, 2005).

II.1.3.2. Chez l'homme

Les extraits phénoliques ont toujours été utilisés en industrie alimentaire et cosmétique, et comme agents antimicrobiens en médecine populaire. (Cowan, 1999). Ils ont d'ailleurs montré ces dernières années un intérêt biologique important ayant de multiples activités (Wang et Mazza, 2002).

En 2009, Vafeiadou et ses collaborateurs ont pu déterminer l'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes. Dans une étude antérieure, les lignanes présentaient cet effet, alors que les flavonoïdes ont montré une activité analgésique (da Silva *et al.*, 2005).

En présence de bactéries, les composés phénoliques sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis de ces organismes. Le mécanisme de toxicité est peut être lié à l'inhibition des enzymes, l'inactivation des adhésines ou le blocage des protéines de transport et de la paroi cellulaire (Cowan, 1999). Selon Harikrishna *et al.* (2004), les flavonoïdes sont actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Smyth *et al.* (2009).

En plus de l'effet antibactérien, ces composés montrent un effet antiparasitaire, dont les genres les plus concernés sont *Leishmania* (Ganapaty *et al.*, 2008 ; Filho *et al.*, 2008), *Trypanosoma* (Felippe *et al.*, 2008) et *Plasmodium* (Nowakowska, 2007).

Les travaux de Li *et al.* (2008) et Hirata *et al.* (2009) ont montré l'effet anticancérigène des flavonoïdes. Selon Win *et al.* (2008), les coumarines sont également actives contre le cancer.

Les polyphénols sont dotés d'autres effets thérapeutiques à savoir les activités anti-ulcéreuse (Gurbuz *et al.*, 2009), antivirale (Choi *et al.*, 2009), ostéogène (Maurya *et al.*, 2009) et anti-allergénique (Wollgast & Anklam, 2000).

II.2. Huiles essentielles

II.2.1. Définitions

Les huiles essentielles (HE) connues également sous le nom d'essences sont selon Durville (1930, 1893) des substances odorantes, huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales, incolores ou jaunâtres et inflammables. Elles sont souvent liquides à température ordinaire, quelques unes sont en partie cristallisées. Cette définition est confirmée par la nouvelle Encyclopédie Funk & Wagnalls (2004).

L'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000), a défini les huiles essentielles comme étant : « *des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques* ».

Selon la pharmacopée européenne (2008), une huile essentielle est : « *Un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition* ».

D'une manière générale, les huiles essentielles sont des mélanges liquides complexes, odorants et volatils isolés des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique (Kalemba et Kunicka, 2003). Ces substances qui sont contenues dans des structures spécialisées (les poils, les canaux sécréteurs et les poches) sont obtenues à partir des fleurs, des feuilles, des fruits, des écorces, de graines, de bourgeons, de brindilles, de bois, de racines ou de rhizomes (Burt, 2004 ; Rams *et al.*, 2014).

II.2.2. Caractères physicochimiques des huiles essentielles

Comme décrit précédemment dans la définition des HE par Durville (1930, 1893), ces substances volatiles sont liquides à température ambiante, liposolubles et solubles dans les solvants organiques ainsi que dans l'alcool et très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau.

Elles présentent généralement, une densité inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Souvent colorées, les essences sont rougeâtres pour les huiles de cannelle, jaunes pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin.

En effet, les huiles essentielles renferment des composés oxydables sous l'action de l'air et de la lumière. Elles s'altèrent donc en se résinifiant, ce qui entraîne une modification de leur odeur et de leurs constituants physiques et chimiques, rendant ainsi ces substances impropres à la consommation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité (Couic-Marinier et Lobstein, 2013)

Du point de vue chimique, les huiles essentielles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (AFSSAPS, 2008). Leurs composants se regroupent en six classes. On trouve les hydrocarbures (le limonène, pinène), les alcools (le bornéol, linanol, menthol), les esters (le salicylate de méthyle, acétate de linalyle),

les aldéhydes (l'aldéhyde benzoïque, citrannal), les cétones (la menthone), et les lactones (la coumarine) (Bousbia, 2011 ; Lakhdar, 2015).

II.2.3. Composition chimique des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée (Tomi et Casanova, 2006). Les constituants des HE appartiennent exclusivement à deux groupes distincts : les terpènes (mono et sesquiterpènes) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. (Bruneton, 1999 ; Kurkin, 2003).

II.2.3.1. Composés terpéniques

Etant très répandus dans le règne végétal, les terpènes sont prépondérants dans la plupart des essences. Ils sont formés par des unités d'isoprène qui est à son tour formé par la combinaison de cinq atomes de carbone (Bakkali *et al.*, 2008).

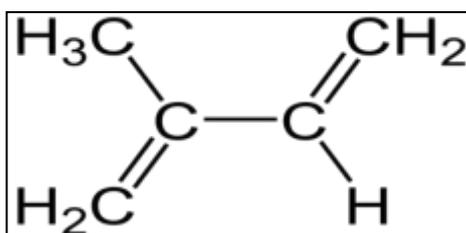


Fig.5. Structure de l'isoprène (C₅H₈)

Ayant un faible poids moléculaire, les terpènes présents dans les HE leur confèrent un caractère volatil et des propriétés olfactives. Ils sont classés selon leur fonction (alcools, aldéhydes, cétones, esters, cétone-oxydes) et leur structure linéaire ou cyclique (Pibiri, 2006 ; Couic-Marinier & Lobstein, 2013).

A. Monoterpènes

Ce sont les plus simples constituants des terpènes, formant 90% des HE et comportant deux unités d'isoprène. Selon le mode de couplage des unités, ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (Bakkali *et al.*, 2008).

B. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes résultent de l'assemblage de trois unités d'isoprène ($C_{15}H_{22}$), mais leur structure et leur fonction restent similaires à celle des monoterpènes. Ils constituent la classe la plus diversifiée des terpènes avec des structures acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques. En général, ces composés sont sous forme d'hydrocarbures ou hydrocarbures oxygénés tels que les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (Bakkali *et al.*, 2008).

C. Diterpènes

Ils sont composés de quatre unités d'isoprène et contiennent donc 20 atomes de carbone dans leurs squelettes de base (Sivropoulou *et al.*, 1996).

II.2.3.2. Composés aromatiques

Moins fréquents que les terpènes, les composés aromatiques dérivés du phénylpropane constituent une autre classe des substances volatiles présentes dans les HE (Kurkin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants connus (la vanilline, l'eugénol, l'anéthole et l'estragole) (Bruneton, 1999).

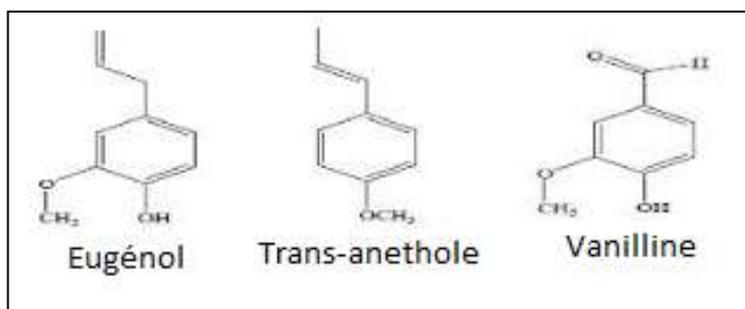


Fig.6. Exemples de composés aromatiques (Bruneton, 1999).

II.2.4. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentes dans les végétaux en faible quantité et sont donc obtenues avec des rendements très faibles. Il faut ainsi une grande masse de plantes pour obtenir quelques millilitres (Benkhniq, 2010). L'extraction de ces substances est donc une phase délicate. Il existe en effet, différents procédés d'extraction. Le choix de la méthode dépend de la nature de l'essence, de son indication et de son aspect économique (Collin, 2000).

II.2.4.1. Entraînement à la vapeur

La distillation et l'entraînement à la vapeur d'eau constitue l'un des procédés d'extraction les plus anciens. Dans un distillateur ou « alambic » et sous l'action de la chaleur, les vapeurs d'eau emportent les constituants volatils des produits bruts. Elles détruisent en effet, la structure des cellules végétales, libèrent les molécules aromatiques et les entraînent dans le système de refroidissement en les séparant du substrat cellulosique. Les vapeurs chargées de molécules volatiles se condensent ainsi et redeviennent à l'état liquide. Deux phases distinctes sont enfin obtenues dans le produit de distillation : la phase insoluble et la phase hydrosoluble. L'huile essentielle est donc obtenue par décantation des parties insolubles (Belaiche, 1979 ; Rozzi *et al.*, 2002 ; Dastmalchi *et al.*, 2008).

II.2.4.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation ou la méthode de Clevenger, inventée en 1928 (Clevenger, 1928) est d'ailleurs le procédé d'extraction le plus employé pour produire des HE au laboratoire et à des fins commerciales (Burt, 2004). Dans un ballon ou dans un alambic placé sur une source de chaleur, le matériel végétal intact ou broyé est en contact direct avec l'eau. Les vapeurs hétérogènes formées après ébullition se condensent dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité (Bruneton, 1999).

La durée de l'hydrodistillation varie selon le matériel utilisé et la matière végétale ce qui affecte le rendement en HE et leur composition chimique (Crouzet, 1998). Par ailleurs, la non maîtrise de la température du récipient contenant l'échantillon peut également modifier la composition de l'huile essentielle mais aussi sa couleur et son odeur (Chalchat *et al.*, 1997).

II.2.4.3. Distillation à vapeur saturée

Contrairement à la méthode précédente, celle-ci met le végétal en contact avec les vapeurs d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante. Le matériel végétal est placé sur une grille perforée au dessus du récipient contenant de l'eau.

II.2.4.4. Hydro-diffusion

L'hydrodiffusion, une sorte d'entraînement à la vapeur consiste à faire passer du haut vers le bas la vapeur d'eau à très faible pression au travers de la matrice végétale. Cette méthode est plus rapide. Elle a donc l'avantage d'être moins dommageable pour les substances volatiles. La

composition des produits obtenus est ainsi sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes.

II.2.4.5. Extraction par CO₂ super critique

Cette technique se particularise par l'utilisation d'un solvant à l'état supercritique. Il s'agit du CO₂ comprimé à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C) (Lorrain, 2013). A cet état, le CO₂ n'est ni liquide ni gazeux ce qui lui confère un excellent pouvoir d'extraction, rendant ainsi les constituants végétaux solubles. Cette propriété, permet donc l'extraction dans le domaine liquide supercritique et la séparation dans le domaine gazeux (Ribeiro et *al.*, 2001 ; Marongiu et *al.*, 2004).

Les avantages de cette méthode sont la facilité de séparation entre le solvant et l'extrait par simple compression détente (Bruneton, 1999) et la non toxicité du CO₂ qui est totalement inerte chimiquement (Wichtel et Anton, 1999). En plus, les températures utilisées sont basses et donc non agressives pour les constituants fragiles (Martini et Seiller, 1999).

II.2.4.6.Extraction assistée par microondes

Ce type d'extraction a été développé ces dernières décennies en se basant sur l'absorption de l'énergie des microondes par les composantes actives de la plante (Wang *et al.*, 2006). La matrice végétale est chauffée à pression réduite par microondes et les composés volatils sont entraînés par la vapeur à partir de l'eau propre à la plante. La récupération des composés se fait ensuite par refroidissement et décantation (Grigonis et *al.*, 2005 ; Reighard et Olesik, 2006). L'avantage principal de cette technique est l'obtention d'un rendement élevé en extrait dans un temps réduit. Les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont également limitées (Mengal et *al.*, 1993 ; Bendahou et *al.*, 2007 ; Lucchesi et *al.*, 2007).

II.2.5. Intérêts écologique, économique et thérapeutique des huiles essentielles

Les huiles essentielles jouent un rôle écologique important dans les interactions végétale-végétale et végétale-animale (Robert H. *et al.*, 1993). Elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les pollinisateurs, protègent les végétaux contre les herbivores, les rongeurs, les nématodes et les champignons phyto-pathogènes. En effet, cette auto-défense est liée à la présence des monoterpènes (Zambonelli *et al.*, 2004; Ben Arfa *et al.*, 2006).

Ces substances bioactives pourraient donc être utilisées en agroalimentaire comme agents de protection contre les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Mangena et

Muyima, 1999). Elles sont utilisées aussi pour aromatiser certains produits (gâteaux, chewing gum, bonbons...). Diverses industries utilisent également les HE, pour la fabrication des produits cosmétiques, des adhésifs (colle, scotch ...) et des sprays insecticides (Bakkali *et al.*, 2008).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont connues pour leurs vertus thérapeutiques. La principale propriété de ces composés est d'ailleurs leur efficacité contre les agents infectieux. Le groupe des phénols possède une puissante action antiparasitaire (Tchoumboungang *et al.*, 2009). En contrepartie, un grand nombre de composés volatils issus du thym, de la citronnelle, de la cannelle et du thé ont été testés contre une large gamme de champignons à savoir *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* et *Penicillium chrysogenum* (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). D'autres études ont montré l'effet antifongique des huiles essentielles (Ghfir et Dargent, 1995 ; Unlu *et al.*, 2002 ; Candan *et al.*, 2003 ; El Ajjouri *et al.*, 2008). Un autre fléau infectieux est traité par les HE (les infections virales) (Salah-Fatnassi *et al.*, 2010 ; Tkachenko, 2006).

A ces activités, s'ajoute l'action anti-infectieuse la plus connue des HE, c'est d'ailleurs, leur forte puissance antibactérienne due généralement aux phénols (carvacrol, thymol), aux monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol) et aux aldéhydes (géraniol) (De Billerbeck, 2007 ; Satrani *et al.*, 2007 ; Amarti *et al.*, 2010). Ces substances agissent variablement contre un large éventail de bactéries, y compris celles antibiorésistantes (Kalemba et Kunicka, 2003). Toutefois, les bactéries à Gram négatives grâce à leur structure pariétale paraissent moins sensibles (Burt, 2004). L'antibiorésistance, ce problème majeur de santé publique peut donc être résolu par ces essences qui ont prouvé leur efficacité contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (May *et al.*, 2000 ; Tohidpour *et al.*, 2010), les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips, 2009), *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella entereditis* (Shin et Kim, 2005). Grâce à leur cytotoxicité (Sivropoulou *et al.*, 1996) et leur large spectre, les HE sont de bons antiseptiques et désinfectants (Lacoste *et al.*, 1996 ; Caillard, 2003).

Les huiles essentielles présentent également des activités antioxydantes (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006) et anti-tumorales. L'huile essentielle isolée des graines de *Nigella sativa* L. a démontré une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales (Mbarek *et al.*, 2007).

En 1999, Siani et ses collaborateurs, ont établi l'effet antiinflammatoire des HE de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni* et *Protium grandifolium*. Une autre étude réalisée par Dordevic et al. (2007) a prouvé la capacité de l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* à inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat.

D'autres applications médicales peuvent être attribuées par les HE. Elles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'oestradiol (Monti et al., 2002). Elles peuvent être utilisées dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (Zhao et al., 2005).

III. Notion de toxicité

Bien que d'origine naturelle et ayant très peu d'effets indésirables, les substances actives des plantes médicinales, notamment les composés phénoliques et les HE peuvent se révéler dangereuses pour la santé. Il est donc important d'identifier le produit, de déterminer la dose à respecter et de choisir le mode d'administration adéquat afin d'éviter toute atteinte fonctionnelle humaine ou animale (Khattabi et al., 2010). Les extraits végétaux peuvent ainsi s'avérer allergisants, irritants, néphrotoxiques, hépatotoxiques et neurotoxiques. L'âge et le sexe constituent également un facteur de risque (Benkhniue et al., 2010).

Généralement, les composés à base de plantes médicinales présentent une faible toxicité par voie orale avec des doses létales à 50% (DL50) supérieures à 5 g/kg pour les HE. Cependant, il existe certaines exceptions tel que l'origan qui présente une toxicité élevée (1.4 g/kg).

Des crèmes cosmétiques et des sprays contenant des huiles essentielles sont couramment appliqués ce qui peut générer des irritations et des allergies. C'est le cas par exemple des HE de thym, d'origan et de la cannelle (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

Une utilisation prolongée de certains composés peut les rendre convulsivants et abortifs. En guise d'exemple, les huiles essentielles de l'absinthe et de la sauge officinale qui sont neurotoxiques (Franchomme et al., 1999 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

- Toutes les substances à base de plantes médicinales ont une ou plusieurs vertus particulières. Grâce à sa situation géographique et à son climat varié, l'Algérie de l'Est à l'Ouest et du Nord méditerranéen au Sud Saharien bénéficie d'une gamme d'espèces végétales diversifiée et riche en matières actives.

Chapitre III

*Monographie des plantes
choisies*

I. Rappel sur la famille des *Asteraceae*

La famille Asteraceae anciennement nommée «Compositae» est l'une des familles les plus importantes et les plus répandues dans le règne végétal en général et dans la classe des dicotylédones en particulier. Elle comprend plus de 13 tribus, 1000 genres environ et entre 20000 et 23000 espèces (Guignard, 1994). En Algérie, il existe 111 genres et 638 espèces (Gausson et Leroy, 1982). Les plantes de cette famille poussant généralement dans les régions tempérées sont le plus souvent herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes (Bayer et Starr, 1998).

Cette vaste famille est économiquement importante, fournissant des plantes alimentaires (laitues, endives, artichauts...), des plantes utilisées en thérapeutique et en cosmétologie (armoïse, arnica, camomille...) (Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle N°73, 2006).

II. *Inula viscosa* L.

II.1. Classification taxonomique et répartition géographique

D'après Fournier (1947), la taxonomie de la plante est comme suit :

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotyledones</i>
Sous Classe	<i>Gamopetales</i>
Ordre	<i>Campunulales</i>
Famille	<i>Compositae</i>
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>I. viscosa</i> L. Aiton
Synonymie	<i>Dittrichia viscosa</i> L.

Inula trouve son origine du grec «*Ineo*» signifiant «je purge» et «*viscosa*» qui veut dire visqueuse (Fauron et Moati 1983), d'où l'appellation commune de la plante « inule visqueuse » (Fournier 1947). En Algérie, la plante est connue sous le nom de «magramen» (Zeguerrou *et al.*, 2013).

Cette plante spontanée est très répandue dans le nord de l'Algérie et dans le bassin méditerranéen, poussant aux bords des cours d'eau, sur les prairies humides et sur les sols salés (Benayache, 1991 ; Wenqiao *et al.*, 2004).

II.2. Aspects botaniques



Fig.7. Planche d'*I. viscosa* (Bruneton, 1993).

L'inule visqueuse est une herbacée annuelle, vivace, glanduleuse à odeur forte et ligneuse dans sa partie inférieure. Elle apparait sous forme de buissons de 0.5 à 1 mètre de hauteur et présente de nombreux capitules à fleurs jaunes au sommet de la tige. Les feuilles sont dentées, ondulées, aiguës et rudes. La floraison commence à partir du mois de Septembre avec des fleurs jaunes. Les fruits sont des akènes velus (Zeguerrou *et al.*, 2013).

II.3. Aspects phytochimiques

Un grand nombre d'espèces appartenant au genre *Inula* ont fait l'objet d'études chimiques où se sont identifiés de nombreux métabolites secondaires. Une étude menée par Benayache *et al.* (1991) sur les parties aériennes d'*I. viscosa* a montré sa richesse en flavonoïdes, en terpènes et en lactones sesquiterpéniques. Parmi les composés présents dans cette espèce, nous retenons : apigénine, quercétine, 2-O-méthylkaempferol (classe des flavonoïdes) (Bicha, 2003), 3 β -acetyldammara-20, 24-diène (terpènes) (Oksöz, 1976 ; Bohlman, 1977), α santonine et inulviscolide (sesquiterpènes lactones) (Bicha, 2003). La plante comporte également d'autres substances mineures.

Souvent, les parties aériennes sont utilisées sous forme fraîches ou transformées en poudre (Cafarchia *et al.*, 1999). Cependant, les racines contiennent de nombreuses substances actives comme l'Inuline et le camphre (Fournier, 1947).

II.4. Aspects pharmacologiques

L'inule visqueuse a été largement utilisée en médecine traditionnelle pour ces diverses propriétés. Elle agit comme sédatif de la toux et des spasmes bronchiques (Bellakhader, 1997), corrige l'atonie de l'estomac et de l'intestin (Lastra *et al.*, 1993), améliore l'appétit (Roulier, 1990) et abaisse la fièvre. Le décocté de la plante est d'ailleurs efficace pour le traitement du diabète (Manez *et al.*, 2007), de l'hypertension et des néphropathies (Eddouks *et al.*, 2002).

De nombreuses autres études ont démontré une gamme élargie des activités biologiques de cette plante à savoir l'effet anti-inflammatoire (Al-Dissi *et al.*, 2001 ; Zeggwagh *et al.*, 2006 ; Hernandez *et al.*, 2007), antiviral (Sassi *et al.*, 2008), antitumoral (Rozenblat *et al.*, 2008), antiseptique, antibactérien, cicatrisant (; Chari et Hamdi Pacha, 1999 ; Hmamouchi *et al.*, 2001), et antifongique (Bssaibis *et al.*, 2003 ; Franco-Mican *et al.*, 2008).

Inula viscosa est couramment utilisée pour sa large durabilité de conservation alimentaire (Adam *et al.*, 1998). Elle peut donc être exploitée dans l'industrie agro-alimentaire afin d'accroître la durée de vie de certains produits (Boumaza, 2011).

III. *Anacyclus valentinus* L.

III.1. Classification taxonomique et répartition géographique

La position taxonomique d'*A. valentinus* a été citée dans la flore Fournier (1947) sous le code 3871 et dans la flore Tison & De Foucault (2014) sous le code 0380.

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotyledones</i>
Sous Classe	<i>Gamopetales</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Anacyclus</i>
Espèce	<i>A. valentinus</i> L.

La dénomination de cette plante diffère d'un pays à l'autre. Elle est nommée en France anacycle de valence, en Italie camomilla de Valencia et en Espagne manzanilla corda (Léger, 2007). En Algérie, la plante est connue sous le nom vernaculaire « Guertoufa » (Maiza *et al.*, 1993).

L'anacycle de valence est commune dans le bassin méditerranéen et en Afrique septentrionale. Elle pousse spontanément sur les sols argileux des lieux incultes et sur les bords des chemins dans les Pyrénées (Julve, 2015).

III. 2. Aspects botaniques

La principale particularité du genre *Anacyclus* est la présence d'ailes aplaties entourant les fruits. L'espèce, objet de notre travail, dont la floraison est entre Juin – Août est une plante annuelle, à tige de 10 à 40 cm de hauteur, dressée et plus ou moins velue. Cette dernière, en s'épaississant au sommet, porte un capitule hémisphérique à fleur jaune toute tubuleuse. Les feuilles de la plante sont bipennatiséquées à lobes étroits mucronulés et les fruits sont des akènes (Hamzi et Belhadj, 2008 ; Julve, 2015).

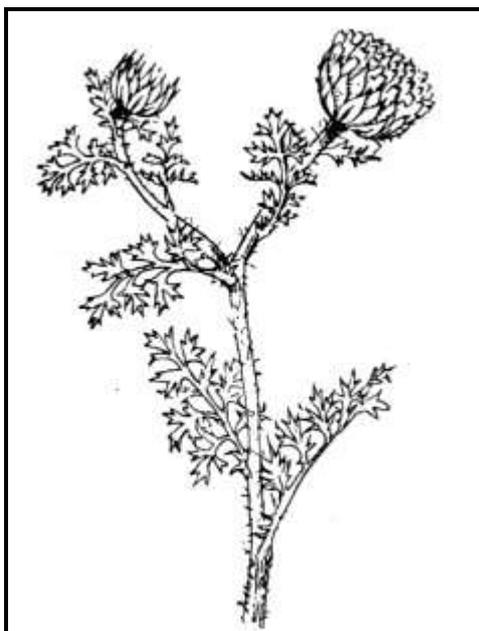


Fig.8. Planche d'*Anacyclus valentinus* (Tela Botanica 2011)

III.3. Aspects phytochimiques

Le genre *Anacyclus* a fait l'objet de quelques investigations chimiques, signalant la présence de nombreux types de métabolites secondaires à savoir les triterpènes, les stéroïdes, les coumarines, les lignanes, les polyacétylènes (alkamides) et les flavonoïdes. Parmi les composés isolés nous citons : lutéoline-7 à partir d'*A. clavatus* (Harald, 1978) ; campésterol, acide hexadécanoïque, acide tétradécanoïque et des monoterpènes à partir des fleurs d'*A. cyttrolepidioides* (Bergaoui *et al.*, 2006 a,b) ; anacycline (iso butylamide) à partir des racines d'*A. perythrum* (Arnason *et al.*, 1989).

Cependant, l'anacycle de valence est l'espèce la moins étudiée parmi celles du genre *Anacyclus*. En effet, Harald (1978) a pu isoler à partir des feuilles de cette plante trois types de flavonoïdes : Lutéoline-7-glucoside, 7-rhamnosylglucoside, quercétine-7-glucoside.

III.4. Aspects pharmacologiques

Les espèces appartenant au genre *Anacyclus* ont fourni de nombreuses propriétés tels que l'effet insecticide (El Morsi et Hassanein, 1999), antibactérien (Selles *et al.*, 2013) et antifongique (Boungab *et al.*, 2011)

Chez la population autochtone, *A. valentinus* est souvent utilisée dans les préparations culinaires, mais elle est également administrée pour les maux d'estomac (Hamzi et Belhadj, 2008).

Les travaux réalisés par Hocine et Zaoui en 2006 et par Ata et Ghrib en 2007, sur l'huile essentielle de cette espèce ont prouvé son activité antimicrobienne contre les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylocoques aureus* et *Aspergillus Sp*).

D'autres travaux (Adnane et Arbaoui, 2008 ; Tadjeddine *et al.*, 2013) montrent son effet antidiabétique. La plante possède également le pouvoir de solubiliser le cholestérol (Hacheimi et Kadi, 2009)

- Les travaux antérieurs réalisés sur les plantes de la famille des *Asteraceae* en particulier celles appartenant au genre *Inula* et *Anacyclus* ont mis en évidence leur richesse en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les flavonoïdes. C'est ainsi, que toute cette richesse dans l'usage thérapeutique traditionnel des plantes médicinales, nous a encouragé à étudier quelques activités biologiques des deux espèces algériennes *Inula viscosa* et *Anacyclus valentinus*.

Deuxième Partie
Travaux personnels

I. Matériels et Méthodes

I. Objectifs

En se basant sur les études antérieures portant sur les effets bénéfiques de quelques plantes médicinales (Kangralkar *et al.*, 2010 ; Al - Sobarry *et al.*, 2013) et en établissant des hypothèses sur les activités biologiques des composés phénoliques et des huiles essentielles à savoir le pouvoir antimicrobien, anti-inflammatoire et antalgique (Maoz et Neeman, 2000 ; Máñez S. *et al.*, 2007 ; Selles *et al.*, 2013), les plantes médicinales choisies dans ce travail pourraient avoir des effets bénéfiques.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons mis en place des études expérimentales dont l'objectif principal est d'évaluer l'effet des polyphénols et des huiles essentielles de deux plantes médicinales poussant en Algérie, *Inula viscosa* et *Anacyclus valentinus* contre l'arthrite rhumatoïde chez un modèle animal (rats Wistar). D'autres objectifs secondaires y compris les effets analgésiques et antibactériens des extraits ont été visés. A cet effet, nous avons suivi trois approches :

- Une approche chimique faisant appel à l'extraction, la caractérisation et le dosage des polyphénols et des huiles essentielles de ces deux plantes ;
- Une approche de toxicité permettant d'estimer la toxicité aigue des extraits et la détermination de la DL₅₀ chez les rats Wistar s'il ya lieu;
- La troisième approche est d'ordre thérapeutique. Elle consiste, dans un premier temps, à suivre quotidiennement durant 15 jours l'effet des extraits sur l'arthrite rhumatoïde. En second lieu, cette approche fait appel à d'autres activités biologiques des plantes étudiées ; notamment les activités : antalgique *in vivo* et antibactérienne *in vitro*.

II. Matériel biologique

II.1. Matériel végétal

Les matières végétales, utilisées pour l'extraction des polyphénols et des huiles essentielles sont les parties aériennes des plantes, dont les feuilles de l'inule visqueuse (*Inula viscosa*) (figure 10 a) ont été récoltées à Chorfa (Daïra de Sig), Wilaya de Mascara durant la période Octobre - Décembre.

Chorfa est une commune de la Daïra de Sig, Wilaya de Mascara située à une altitude de 161 mètres, une latitude de 35° 25' 55" Nord et une longitude de 0° 14' 43" Ouest.

La 2^{ème} plante anacycle de valence (*Anacyclus valentinus*) (figure 10 b) a été cueillie dans la Wilaya d'El Bayadh au mois d'Octobre.

La Wilaya d'El Bayadh faisant partie intégrante de la région des hautes plaines steppiques du Sud-Ouest Algérien est située à 1313m d'altitude, 33°40' 49" Nord et 1° 1' 13" Est.

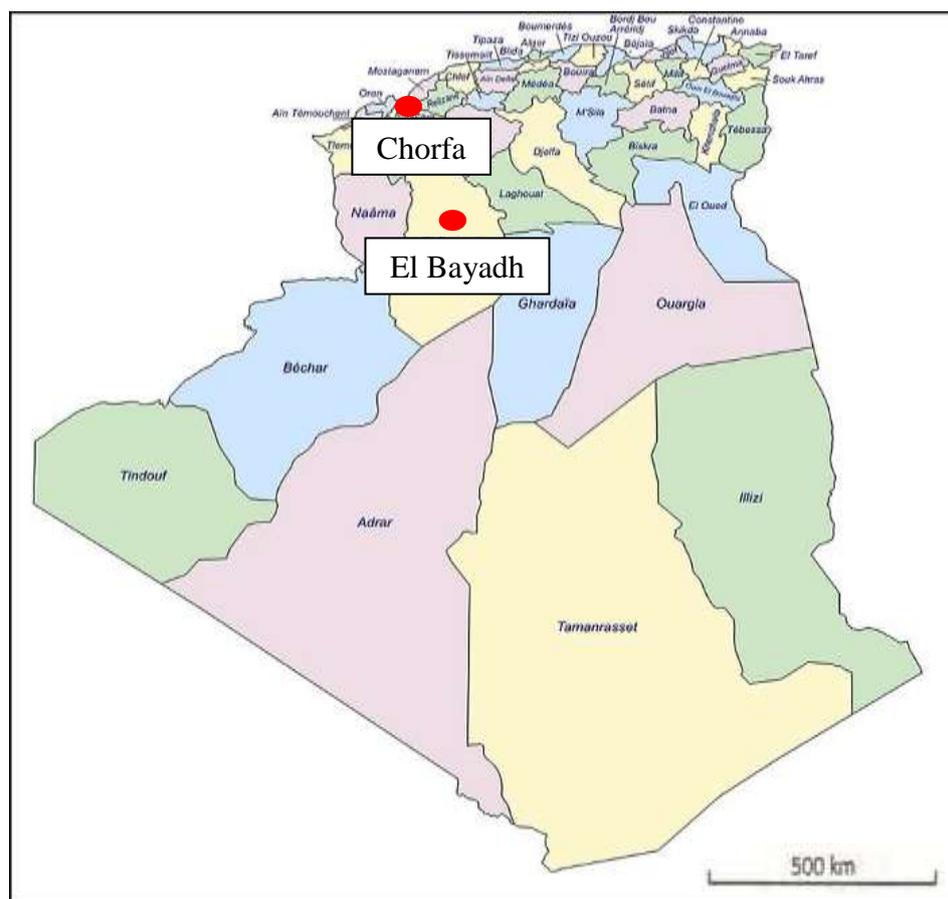


Fig.9. Carte géographique de sites de récolte des deux plantes

Les plantes ont été identifiées et confirmées suite aux données bibliographiques et par des enseignants botanistes du département de Biologie, Université de Mascara.

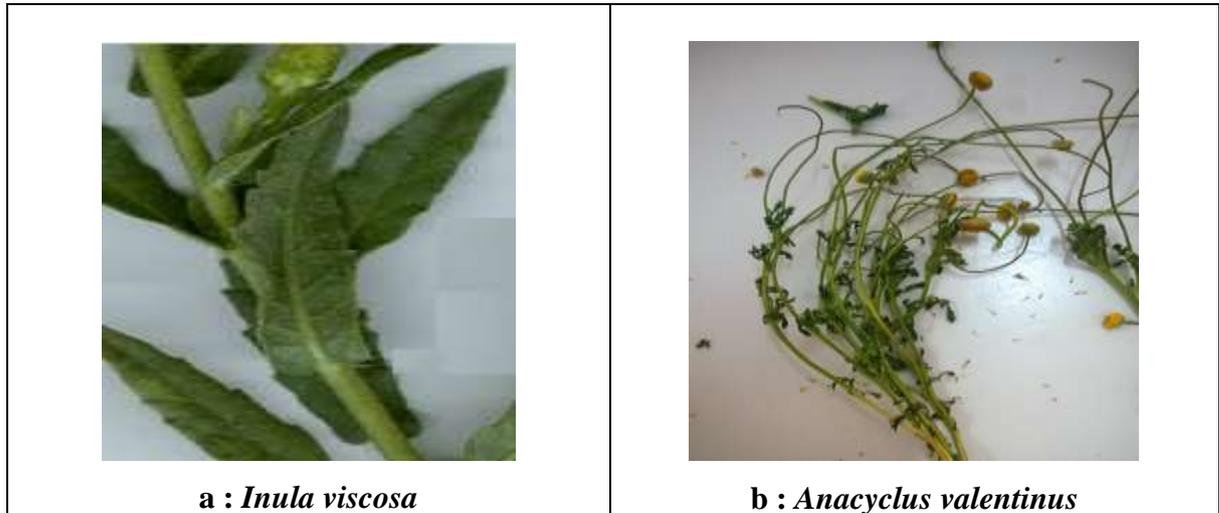


Fig.10. Parties aériennes du matériel végétal étudié

II.2. Animaux d'expérimentation

Notre étude a porté sur des rats adultes « *Rattus norvegicus* », de souche Wistar des deux sexes, pesant entre 150 et 200 g. L'élevage des animaux s'est déroulé au sein de l'animalerie de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mustapha Stambouli de Mascara. Les animaux sont soumis à l'alternance naturelle de jour et de nuit correspondant à 12 ± 1 h. La température ambiante dans l'animalerie est de 24 ± 2 °C et l'humidité comprise entre 35-60 %.

- Il est à noter que tous les essais *in vivo* ont été réalisés conformément aux directives éthiques (OMS, 1993).

II.3. Souches bactériennes

Les souches bactériennes nous ont été fournies par le Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologie et Sécurité Sanitaire de la Faculté SNV, Université de Mascara.

Sept espèces bactériennes ont été identifiées par un profil phénotypique et sélectionnées pour leur antibiorésistance. *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* ont été isolées à partir des infections sur plaie à l'Hopital Meslem Taib, Mascara. *Salmonella typhi*, *Shigella sp.* et *Bacillus subtilis* ont été isolées des eaux usées et *Clostridium sp.* à partir de la grande Sabkha d'Oran.

Tab.4. Profil d'antibiorésistance des souches bactériennes testées selon OMS (2008)

	P	AX	OX	CZ	SP	CN
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Shigella sp.</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Clostridium sp.</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	R

P : Pénicilline (30 µg), AX : Amoxicilline (30µg), OX : Oxacilline (5µg), CZ : Céfazoline (30µg), CN : Gentamycine (10µg), SP : Spiramycine (10 µg).

II.4. Produits

❖ Adjuvant Complet de Freund CFA (Sigma Aldrich)

Le CFA est une émulsion (huile et eau physiologique 0.9% v/v) contenant des membranes cellulaires lyophilisées de *Mycobacterium butyricum*. Le volume injecté contient l'équivalent de 200 µg de *M. butyricum*. Le tableau suivant représente les volumes recommandés pour l'application sur le modèle animal (Kamala, 2007).

Tab.5. Volumes recommandés d'adjuvant complet de Freund selon la voie d'administration

	<i>Sous-cutanée</i> (ml)	<i>Intradermique</i> (ml)	<i>Intrapéritonéale</i> (ml)	<i>Intra-plantaire</i> (ml)	<i>Intramusculaire</i> (ml)
Souris	< 0.1	*	< 0.2	< 0.05	< 0.05**
Rat	< 0.1	< 0.05 **	< 0.5	< 0.1	< 0.1**
Lapin	< 0.25	< 0.05 **	*	*	< 0.25**

* : Non recommandé, ** : Avec justification

❖ Diclofénac de potassium (Rapidus®) 50mg

Le produit utilisé est diclofénac de potassium provenant de la firme Rapidus®. Ce médicament est un anti-inflammatoire non stéroïdien connu pour ses effets anti-inflammatoires, antirhumatismaux et antalgiques.

❖ Paracétamol (Doliprane ®) 500mg

Le produit utilisé est le paracétamol qui provient de la firme Doliprane ®. C'est le principe actif de nombreux antalgiques et antipyrétiques. Il est indiqué dans le traitement des symptômes d'intensité faible à modérée.

❖ Chlorhydrate de Tramadol 50 mg (Supramadol ®)

Le tramadol est un antalgique de niveau 2, catégorie comprenant le dextropropoxyphène et la codéine. Il agit sur le même type de récepteur que la morphine.

❖ Kits

Les kits CRP Latex, FR Latex, Phosphatase Alcaline, GOT (AST) et GPT (ALT) de Spinreact.

III. Méthodes

III.1. Extraction des polyphénols

Les plantes médicinales contiennent des métabolites secondaires ou des substances bioactives possédant diverses propriétés thérapeutiques. Afin de profiter des valeurs de ces substances, l'étape de l'extraction est préliminaire. Elle a été réalisée selon la figure 11.

III.1.1. Préparation des échantillons

Les espèces végétales ont été séchées séparément et de façon identique sous forme étalée, à l'abri des rayons solaires et à température ambiante. Afin d'accroître la surface de contact avec le solvant et d'augmenter ainsi le rendement en extraits, les parties prélevées de chaque plante ont été broyées.

III.1.2. Macération à froid

En raison de sa simplicité d'exécution, la macération à froid est la méthode d'extraction choisie (Ferrari, 2002). Le solvant retenu est le méthanol et ce pour sa faible tension de vapeur et son rang élevé en polarité, capable d'entraîner le maximum de métabolites secondaires de diverses natures (Al Namer, 2014).

30 grammes de poudre de chaque plante sont mis à macération à une température ambiante, à l'abri de la lumière et avec agitation magnétique pendant 24h dans 300 ml de solutions aqueuses de méthanol à 80% v/v. Après filtration, l'opération est répétée avec le marc obtenu (Romani *et al.*, 2006). Les extraits méthanoliques s'évaporent. Les résidus obtenus sont ensuite placés dans un dessiccateur afin d'éliminer totalement le solvant.

III.2. Extraction des huiles essentielles

Comme décrit dans la partie bibliographique, l'extraction des HE à partir des plantes a été réalisée par hydrodistillation (Clevenger, 1928). L'opération est menée pendant trois heures en mélangeant 100g de matière végétale avec 1L d'eau distillée. Après une décantation à l'aide du

cyclohexane et une évaporation du solvant dans un évaporateur rotatif, les huiles essentielles obtenues ont été conservées à 4°C dans des flacons sombres (Kheyar *et al.*, 2014).

➤ **Codification des extraits obtenus**

Après extraction, les extraits ont été stérilisés par filtration (0,45 µm), étiquetés et conservés jusqu'à leur utilisation.

Extrait méthanolique d' <i>Inula viscosa</i>	IVM
Extrait méthanolique d' <i>Anacyclus valentinus</i>	AVM
Huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i>	IVH
Huile essentielle d' <i>Anacyclus valentinus</i>	AVH

III.3. Rendements d'extraction

Les rendements en extraits méthanoliques et en huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* ont été calculés selon la formule suivante : (Harborne, 1980).

$$\mathbf{R (\%) = 100 M_{ext}/M_{éch.}}$$

Où :

- **R** est le rendement en %;
- **M_{ext}** est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg ;
- **M_{éch}** est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

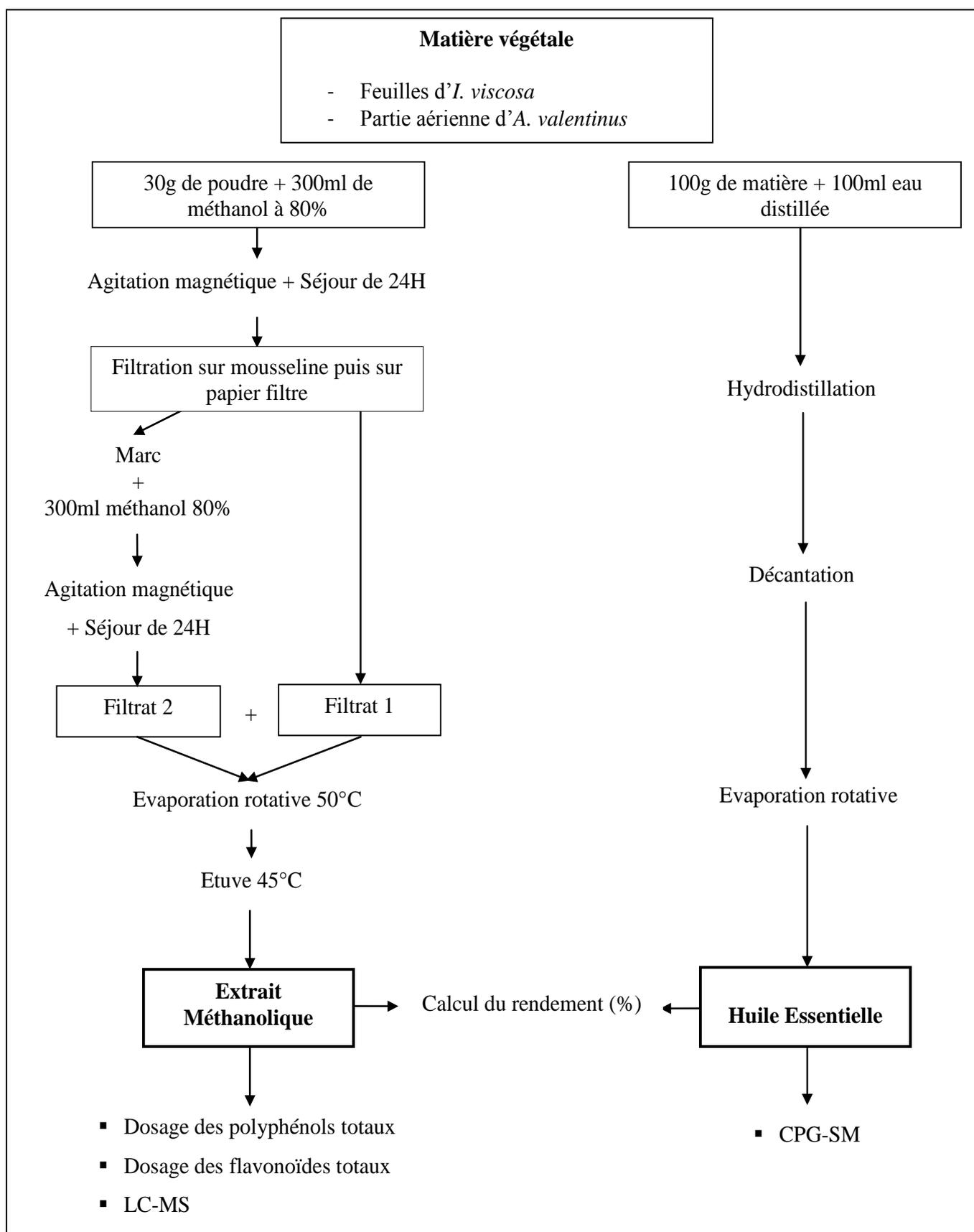


Fig.11. Schéma explicatif de l'extraction et des analyses phytochimiques des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (*I.viscosa*, *A. valentinus*).

III.4. Dosage des composés phénoliques

III.4.1. Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton & Rossi, 1965). Le réactif FC est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation en milieu alcalin de ce réactif par les groupements oxydables des composés phénoliques conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait analysé (Georgé *et al.*, 2005).

100 μ l d'extrait sont mélangés avec 500 μ l du réactif FC (dilué à 10% dans l'eau distillée) et 400 μ l de Na_2CO_3 à 7,5 % (m/v). Après une incubation de 10 minutes à température ambiante et à obscurité, l'absorbance est mesurée à 760nm (Boizot et Charpentier, 2006). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche (mg EAG/g sec) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 12).

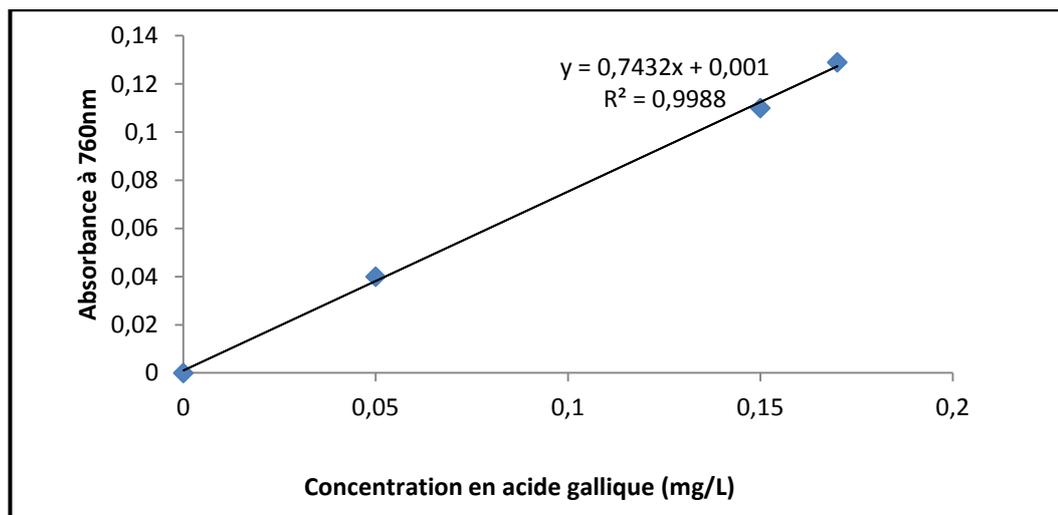


Fig.12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

III.4.2. Flavonoïdes totaux

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) selon le protocole de Dewanto *et al.* (2002). La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 415nm (Ababsa, 2009).

500 μ l de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 μ l de méthanol à 95 %, 100 μ l de $AlCl_3$ à 10 % (m/v), 100 μ l d'acétate de sodium (1 M) et 2,8 ml d'eau distillée. Le mélange est

agité puis incubé à l'obscurité et à une température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95 %. L'absorbance est mesurée à 415 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine préparée dans les mêmes conditions (figure 13).

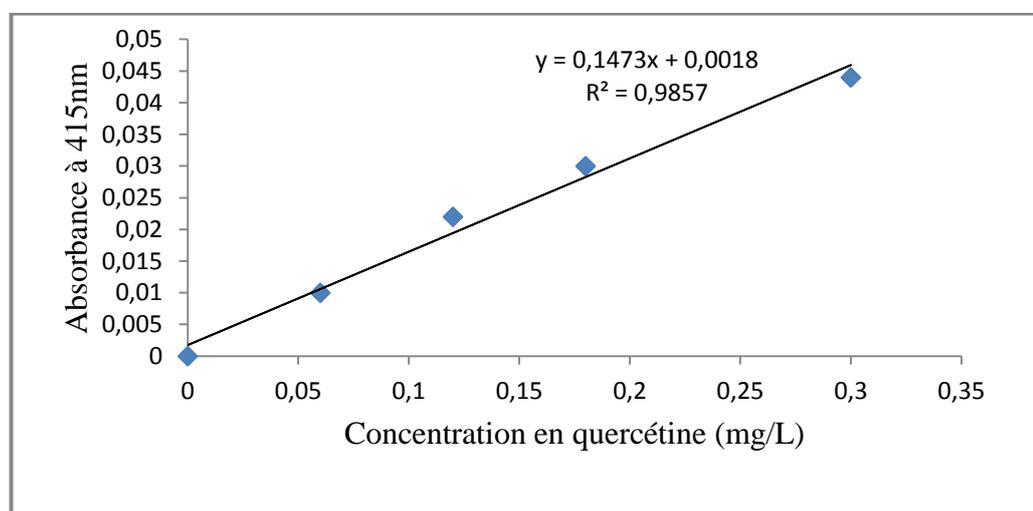


Fig.13. Courbe d'étalonnage de la quercétine

III.5. Identification phytochimique des polyphénols et des huiles essentielles

L'analyse chimique des composés phénoliques et des huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* a été réalisée au niveau du laboratoire de biomolécules, micro-environnement et métabolismes, de la Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens/France.

III.5.1. Analyse chimique des extraits méthanoliques par LC-MS

L'identification des composés phénoliques issus des deux plantes a été effectuée en utilisant la chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse.

L'appareillage de chromatographie de marque Shimadzu LC-MS/MS 8030 est équipé d'un détecteur UV, de diode et d'un spectromètre de masse de type triple quadrupôle. La séparation des composés est réalisée sur une colonne Phenomenex Luna 3u C18, thermostatée à 40°C. Les solvants utilisés pour l'élution sont l'eau distillée ultra pure et l'acétonitrile, dont le solvant A est constitué de 50 % eau + 50% acétonitrile et le solvant B composé de 25% eau+75% acétonitrile. L'élution est effectuée en mode gradient avec un débit de 0,4mL/min et un volume d'injection de 5,0 µL. La gamme de détection UV est comprise entre 190 et 800 nm. Les paramètres de détection MS sont : le gaz de nébulisation (N₂) avec un débit 3 L/min, le gaz de séchage avec un débit 15 L/min, le voltage d'interface : 4,5 Kv, la pression du gaz 230 kPa, la CDL température : 250 °C, « block heater temperature» 400°C, gamme m/z 100-2000.

III.5.2. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS

L'identification ainsi que la quantification relative des molécules contenues dans les HE des deux plantes furent effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (GC-MS) de marque SHIMADZU (QP2010SE). La phase stationnaire est une colonne capillaire (SGE de type BPx5 C) de 50mm de long, d'un diamètre intérieur de 0.25mm et d'une épaisseur de film de 0,25 μ m, alors que l'hélium a été employé comme gaz vecteur avec une vitesse linéaire de 28.8cm/sec. Le programme de température du four comprise entre 100 et 280°C a été maintenu à 280°C pendant 20 min. La température de l'injecteur a été fixée à 270°C et celle du détecteur à 250°C. L'injection en mode splitless de 1 μ l de la substance à analyser a été réalisée à l'aide d'une micro- seringue.

- L'identification des composés phénoliques et des huiles essentielles a été obtenue par comparaison aux travaux antérieurs réalisés sur des plantes du même genre.

III.6. Evaluation de la toxicité orale aigüe des extraits végétaux chez les rats *Wistar*

Les produits à base de plantes médicinales ont généralement de forts pouvoirs thérapeutiques, mais peuvent être toxiques. Pour une meilleure valorisation et utilisation des plantes médicinales, l'approche de l'étude toxicologique est donc une étape cruciale. En effet, l'étude de la toxicité aiguë est une analyse qualitative et quantitative de l'altération irréversible des fonctions vitales après administration unique d'une substance dans un délai de quelques minutes à quelques jours (2 semaines). Cette toxicité est évaluée en déterminant la dose létale 50 (DL₅₀) c'est-à-dire, la dose unique qui provoque la mort de 50 % des animaux traités.

La plupart des études entreprises en toxicologie s'effectuent par voie orale. Cependant d'autres voies d'administration sont possibles : intra veineuse, intramusculaire, sous-cutanée, percutanée et par inhalation. Dans le présent cas, la voie d'administration choisie est *per os*. Ce choix est justifié par le fait que les traitements conventionnels habituels les plus prescrits dans le cas de la PR sont sous forme de comprimés.

L'évaluation de la toxicité aiguë a été réalisée selon les Directives du Journal Officiel des Communautés Européennes code 423 (OECD, 2001).

III.6.1. Préparation des extraits

Comme étant non toxique et permettant la solubilisation des extraits méthanoliques et des huiles essentielles, l'eau physiologique stérile (9 ‰ NaCl) a été sélectionnée pour la préparation des différentes doses. Les concentrations choisies sont :

- Extraits méthanoliques : 300, 600, 1000, 1500, 2000 et 2500 mg/kg de poids corporel ;
- Huiles essentielles : 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2 et 3 ml/kg p.c.

III.6. 2. Préparation des groupes

Au total 280 rats (mâles et femelles) pesant entre 150 – 200 g ont été utilisés pour les deux plantes. Les animaux ont été répartis en 14 lots de 10 rats chacun et les lots sont rassemblés en trois groupes comme suit:

1^{er} Groupe : Deux lots témoin, soumis à un gavage de 10ml/kg du sérum physiologique ;

2^{ème} Groupe : Six lots recevant les différentes doses croissantes de l'extrait méthanolique ;

3^{ème} Groupe : Six lots recevant les doses croissantes en huiles essentielles.

Les rats ont été préalablement privés de nourriture pendant 18 h, ils ont eu accès juste à l'eau. Ensuite, chaque animal a été identifié et pesé.

III.6. 3. Administration des substances et suivi des animaux

Les différentes solutions ont été administrées par voie orale aux différents lots de rats, à raison d'une dose par lot et de 1ml pour 100 g du poids corporel.

Après l'administration des substances, les animaux ont été observés individuellement toutes les 30 minutes pendant 6 heures le premier jour et tous les jours pendant 15 jours. Pendant cette période, les animaux sont pesés régulièrement. Le nombre des rats morts ainsi que le comportement et les troubles symptomatologiques observés à l'œil nu sont enregistrés. Les principaux signes recherchés sont :

- ❖ Changements corporels (poids) ;
- ❖ Contraction abdominale ;
- ❖ Activité : démarche anormale, activité réduite;
- ❖ Respiration : changement de rythme ;
- ❖ Convulsion ;
- ❖ Diarrhée ;
- ❖ Coma ;

Si la mortalité intervient, la dose létale DL_{50} de l'extrait doit être calculée. Elle peut en effet être déterminée par la méthode de Miller et Tainter (1944) décrite par Randhawa en 2009 et par l'équation de Dragstedt et Lang (1957) (El Allaoui *et al.*, 2011).

III.7. Etude de l'effet des extraits végétaux sur l'arthrite rhumatoïde *in vivo*

Comme étant une pathologie inflammatoire, les signes cardinaux de l'arthrite rhumatoïde sont la rougeur, le gonflement, la chaleur et l'hyperalgésie.

Afin de vérifier l'efficacité des extraits méthanoliques et des huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* sur cette pathologie qui détruit le cartilage, nous avons établi un modèle expérimental d'arthrite rhumatoïde induite chez des rats mâles par adjuvant complet de Freund.

Le traitement a été divisé en deux catégories. Un groupe a été prétraité par les extraits végétaux (traitement préventif), alors que le second recevait les substances après installation de la maladie (traitement curatif). Les étapes de cette étude sont détaillées sur la figure 14.

III.7.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde

L'induction a été réalisée selon la méthode décrite par Kubo *et al.* (1984) par l'injection intra-plantaire de 100 µl du CFA dans la patte postérieure gauche des rats. Ce modèle de douleur inflammatoire provoque en effet, les mêmes aspects pathologiques de l'arthrite rhumatoïde présente chez les patients humains (Pincus *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 2004).

III.7.2. Traitement des animaux

Les différents traitements ont été administrés par voie orale quotidiennement pendant 15 jours aux doses choisies.

Le choix des doses des extraits méthanoliques et des huiles essentielles a été basé sur les résultats de l'étude de la toxicité aiguë, alors que celui du diclofénac a été basé sur les études proches déjà réalisées (Mubashir *et al.*, 2014). Il est à noter que pour le groupe curatif, le traitement est à compter à partir du neuvième jour après induction.

III.7.3. Répartition des lots

Au total, 55 Rats mâles pesant entre 150 et 200g ont été sélectionnés pour cette étude. Les rats ont été répartis en 11 lots de cinq rats chacun et le protocole expérimental a été mené selon les travaux de Woode *et al.* (2009) et Mubashir *et al.* (2014). Les groupes ainsi formés sont :

- Un groupe servira pour le contrôle négatif (témoin sain), recevant 10ml/Kg p.c d'eau physiologique stérile ;
- Un groupe arthritique servira pour le contrôle positif ne recevant aucune substance ;
- Un groupe standard recevant la substance de référence (20mg/Kg Diclofénac) ;

- Deux groupes recevant les extraits méthanoliques IVM et AVM (300mg/Kg) 2h avant immunisation des rats par CFA ;
- Deux groupes traités le neuvième jour suivant l'induction par IVM et AVM respectivement (300mg/Kg);
- Deux groupes recevant 2h avant induction de l'arthrite les huiles essentielles IVH et AVH (60µl/Kg) ;
- Deux groupes traités le 9^{ème} jour suivant l'induction de la pathologie par IVH et AVH (60µl/Kg).

III.7.4. Suivi des paramètres cliniques

III.7.4.1. Evolution pondérale

L'état physiologique des animaux influe sur leur apport en nutriments, ainsi que leurs poids corporels. Une diminution de ces derniers peut donc traduire la présence de certains problèmes fonctionnels chez les animaux.

Pendant toute la période de l'expérimentation, un suivi du poids corporel des animaux a été effectué régulièrement à l'aide d'une balance analytique. Le poids initial et le poids final de chaque groupe ont été enregistrés.

III.7.4.2. Suivi de l'œdème

La synovite ou le gonflement de la patte injectée par l'adjuvant de Freund et des autres pattes après installation de la maladie est le principal symptôme de l'arthrite rhumatoïde. La mesure du diamètre de l'œdème est donc une démarche importante dans le suivi de cette maladie ainsi que l'évaluation de l'effet des traitements testés.

L'évolution du gonflement de la patte injectée avant induction et au cours de traitement a été déterminée par la mesure de l'épaisseur de la patte (mm) en utilisant un pied à coulisse ayant une précision de 0,01-150 mm (Abdel-Moein *et al.*, 2011).

Pour les groupes prétraités au moyen de substances naturelles, les mesures ont été effectuées le jour de l'induction, le 5^{ème}, le 10^{ème} et le 15^{ème} jour de traitement.

Concernant les animaux mis aux essais curatifs, l'épaisseur de la patte a été déterminée le jour de l'induction, le 1^{er}, le 7^{ème} et le 15^{ème} jour de traitement.

III.7.4.3. Indice arthritique

Il existe plusieurs outils de mesure de la PR, en l'occurrence l'indice de Ritchie, HAQ (Health Assessment Questionnaire) et le DAS 28 (Disease Activity Score) (HAS, 2007). En expérimentation animale, l'arthrite rhumatoïde est également évaluée par des indices.

A la fin du traitement, Un indice arthritique a été calculé pour chaque animal comme étant la somme des scores (tableau 6). La moyenne de cet indice chez les différents rats traités a été ensuite comparée avec celle obtenue chez les rats arthritiques (Gerhard, 2014).

Tab.6. Les différents scores de l'indice arthritique

Site de lésion	Nature de lésion	Score
Oreilles	Absence de nodules et de rougeur	0
	Présence de nodules et de rougeur	1
Nez	Pas de gonflement du tissu conjonctif	0
	Gonflement intense du tissu conjonctif	1
Queue	Absence de nodules	0
	Présence de nodules	1
Pattes antérieures	Absence d'inflammation	0
	Inflammation d'au moins un membre	1
Pattes postérieures	Absence d'inflammation	0
	Inflammation légère	1
	Inflammation modérée	2
	Inflammation sévère	3

III.7.5. Suivi des paramètres biologiques

A la fin des expérimentations, tous les rats ont été privés de nourriture pendant 12h et ont été ensuite euthanasiés. Un prélèvement du sang et de quelques organes a été effectué. Les pattes postérieures gauches des rats sains et traités ont été également prélevées.

III.7.5.1. Masse relative des organes

Comme étant, une maladie systémique, l'arthrite rhumatoïde peut provoquer de sérieux problèmes non seulement au niveau des articulations mais également au niveau d'autres organes (Sany, 2003). Les traitements administrés (standards et substances naturelles) peuvent avoir des effets indésirables et atteindre ainsi le fonctionnement des organes internes. La détermination des poids de quelques organes vitaux demeure donc importante (figure 14).

Les organes prélevés sont le cœur, le foie, les reins, les poumons, la rate et le thymus. Après avoir séché ces organes à l'aide de papier filtre, un examen macroscopique et une prise de poids ont été réalisés. Le poids relatif de chaque organe a été ensuite calculé par rapport au poids corporel (g/100g de p.c).

III.7.5.2. Détermination des indices du thymus et de la rate

Comme étant des organes de l'immunité, la détermination de l'état de la rate et du thymus est importante dans l'évaluation de l'arthrite rhumatoïde (Fletcher *et al.*, 1998). Les indices des thymus et des rates ont été exprimés comme étant le rapport du poids de la rate et du thymus par rapport au poids corporel (mg / g) (Zhang *et al.*, 2004).

III.7.5.3. Prélèvement et analyses du sang

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à partir de l'aorte abdominale. L'échantillon du sang a été ensuite, récupéré dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA) et centrifugé à 4000 tour/mn pendant 10mn. Les sérums obtenus ont été retenus pour les analyses suivantes :

A. Facteur rhumatoïde (FR)

Le FR est l'un des marqueurs immunologiques du diagnostic de la PR, reconnu depuis plusieurs années. Il représente un auto-anticorps IgM dirigé contre la fraction constante des immunoglobulines G (Dubucquoi et Fily-Nalewajk, 2008).

La détection de ce facteur a été déterminée par test d'agglutination latex. Ce test permet en effet, une détermination qualitative et semi quantitative de cet auto-anticorps dans le sérum. Les particules de latex recouvertes de gammaglobulines sont agglutinées par les facteurs rhumatoïdes présents dans l'échantillon prélevé. La présence d'une agglutination indique une concentration en $FR \geq 8$ UI/ml.

B. Protéine réactive C (CRP)

La protéine réactive C est une glycoprotéine synthétisée par les cellules du foie et a pour rôle de mobiliser les défenses immunitaires de l'organisme par l'activation de la voie du complément. Cette protéine reflète l'inflammation aiguë et s'élève très rapidement. De ce fait, elle est un marqueur précoce de la réaction inflammatoire.

La détection sérologique de la CRP a été déterminée par le test d'agglutination latex qualitatif et semi quantitatif. En cas de présence de la CRP dans le sérum testé, les particules de

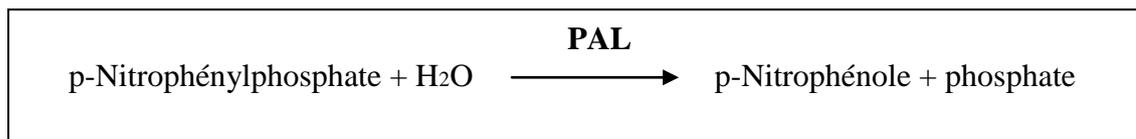
latex, sensibilisées avec des anticorps spécifiques de la CRP sont agglutinées. Les sérums donnant une réaction positive indiquent une concentration en CRP > 6 mg/l.

C. Phosphatase alcaline (PAL)

Les phosphatases sont des enzymes qui permettent l'hydrolyse de substrat phosphorylé naturel, organique ou minéral et libérant ainsi une molécule d'acide orthophosphorique. Elles sont présentes pratiquement dans tous les tissus de l'organisme, mais nous les trouvons principalement dans le foie, les os, les intestins et les reins (Eckersall et Nash, 1983).

Les PAL participent à la minéralisation des os, ainsi qu'à la fabrication du tissu osseux et du cartilage, d'où l'importance de leur dosage en cas de suspicion des maladies osseuses. Leur dosage est également important dans la recherche des maladies hépatobiliaires.

Les PAL catalysent à un pH de 10.4 l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate, libérant ainsi le p-nitrophénole et le phosphate.



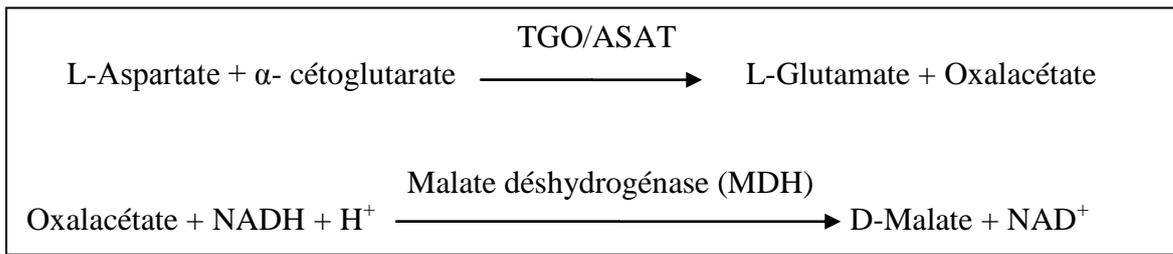
Le taux de la formation du p-Nitrophénole, mesuré par méthode colorimétrique est proportionnel à la concentration de la phosphatase alcaline présente dans le sérum. Les valeurs sont présentées en UI/l (Rosalki *et al.*, 1993).

D. Enzymes hépatiques (ALAT, ASAT)

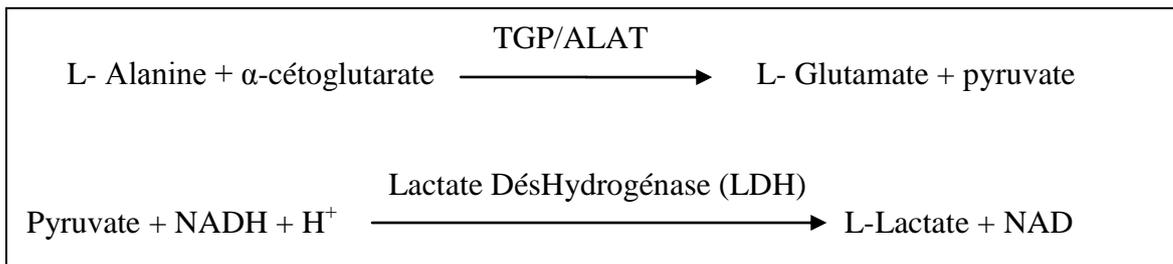
La détermination des PAL par la dite méthode ne permet pas de différencier la source de l'isoenzyme. Nous devons donc prendre en considération d'autres paramètres telle que la fonction hépatique.

Le dosage des enzymes hépatiques (les transaminases) permet la détermination colorimétrique de l'activité TGO et TGP selon les réactions suivantes :

- **Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO) / Aspartate aminotransférase (AST)**



- **Transaminase glutamopyruvique (TGP) / Alanine aminotransférase (ALAT)**



La vitesse de consommation de NADH est déterminée par spectrophotométrie et celle-ci est directement proportionnelle à l'activité des enzymes ASAT et ALAT dans l'échantillon. Les valeurs sont présentées en UI/L (Murray *et al.*, 1984).

III.7.6. Radiographie

La radiographie est une démarche indispensable dans le diagnostic et le suivi de l'évolution de l'arthrite rhumatoïde. Les signes élémentaires caractéristiques pouvant être déterminés par cette démarche sont l'érosion péri-articulaire, le pincement articulaire traduisant la destruction cartilagineuse et l'augmentation de la transparence radiologique.

L'analyse radiographique a été réalisée au niveau de la clinique radiologique ELAGAG Habib à Sig/ Wilaya de Mascara. L'interprétation des résultats a été faite par M^r SLIMANI Khaled, professeur au département des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Toutes les pattes des rats ayant subis l'injection du CFA, en plus de la patte postérieure gauche du rat ayant reçu de l'eau physiologique ont été prélevées et conservées immédiatement dans 10% de formol. Les analyses radiographiques ont été ainsi effectuées par un dispositif à rayons X (Meditronics, Hyderabad) avec une exposition de 300 mA pendant 5 sec (Karnati *et al.*, 2013).

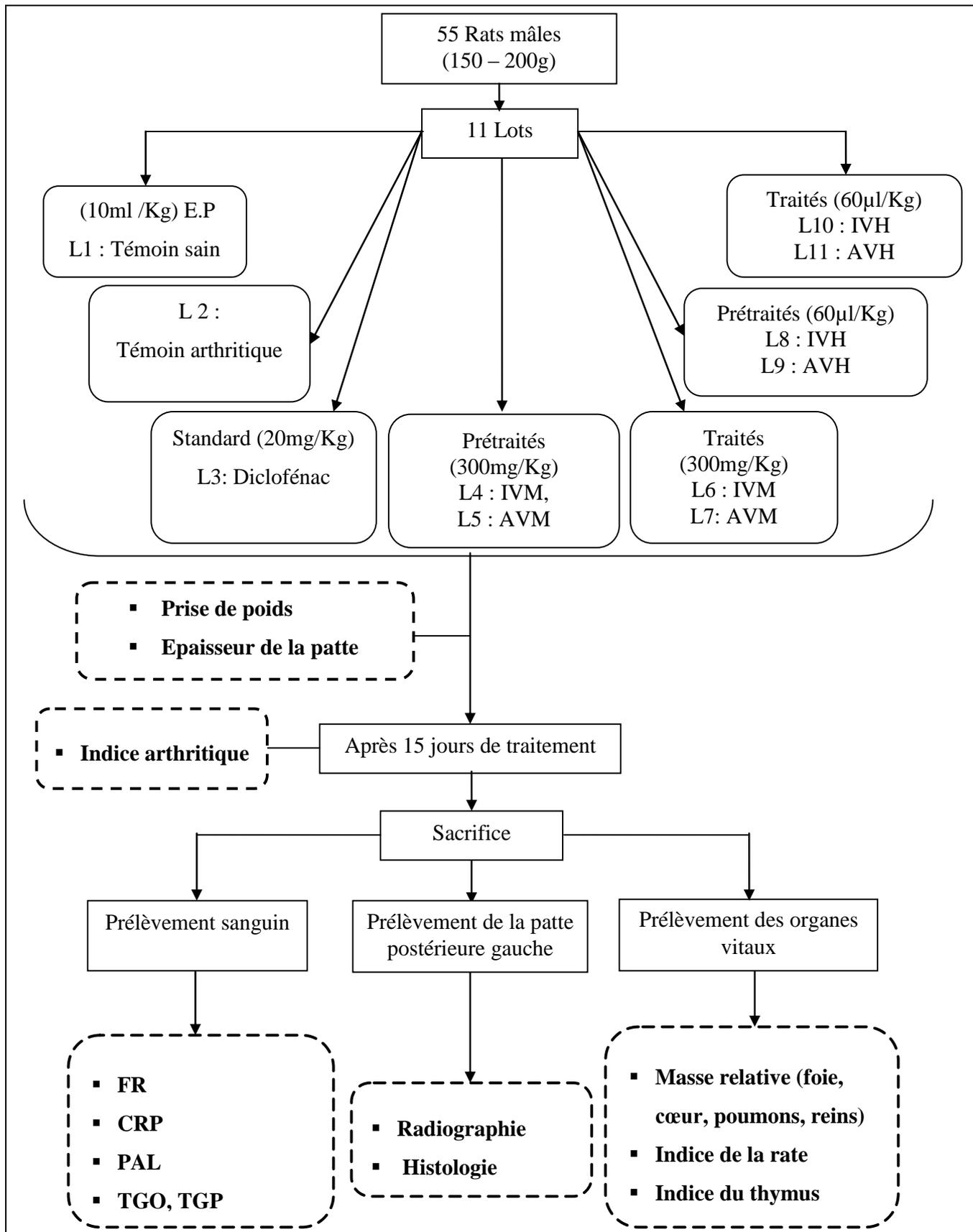


Fig.14. Schéma explicatif de l'évaluation de l'effet des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (*I.viscosa*, *A. valentinus*) sur l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant Complet de Freund chez les rats Wistar

III.8. Etude de l'action analgésique centrale des extraits végétaux *in vivo*

La douleur est l'un des problèmes de santé les plus importants en raison de l'handicap qu'elle peut entraîner. On conçoit que la douleur aiguë sert d'alarme pour protéger l'organisme contre les stimuli nocifs, alors que la douleur chronique est annonciatrice de pathologies et peut résulter des lésions des tissus. Souvent, les douleurs chroniques sont la conséquence de maladies inflammatoires y compris les maladies touchant le cartilage articulaire (Wang & Wang, 2003).

L'étude de l'activité antalgique des extraits testés dans ce travail est donc une étape complémentaire à l'évaluation de l'effet de ces extraits sur l'arthrite rhumatoïde.

Il existe en effet plusieurs techniques pour étudier les douleurs aiguës tels que le test de writhing, le test au formol, le test de la plaque chauffante... (Kulkarni, 1999 ; Fezai *et al.*, 2013). Nous avons choisi pour la recherche de l'action analgésique centrale, de type morphine le test de Tail Flick utilisant un stimulus thermique (Janssen *et al.*, 1963 ; Dykstra et Woods, 1986), celui de l'immersion de la queue ou brièvement appelé test à la queue. Ce dernier est le plus utilisé pour étudier les douleurs aiguës, le plus facile à manipuler et nécessite le moins de dispositifs.

La répartition des groupes et l'application du test ont été réalisées selon la figure 15.

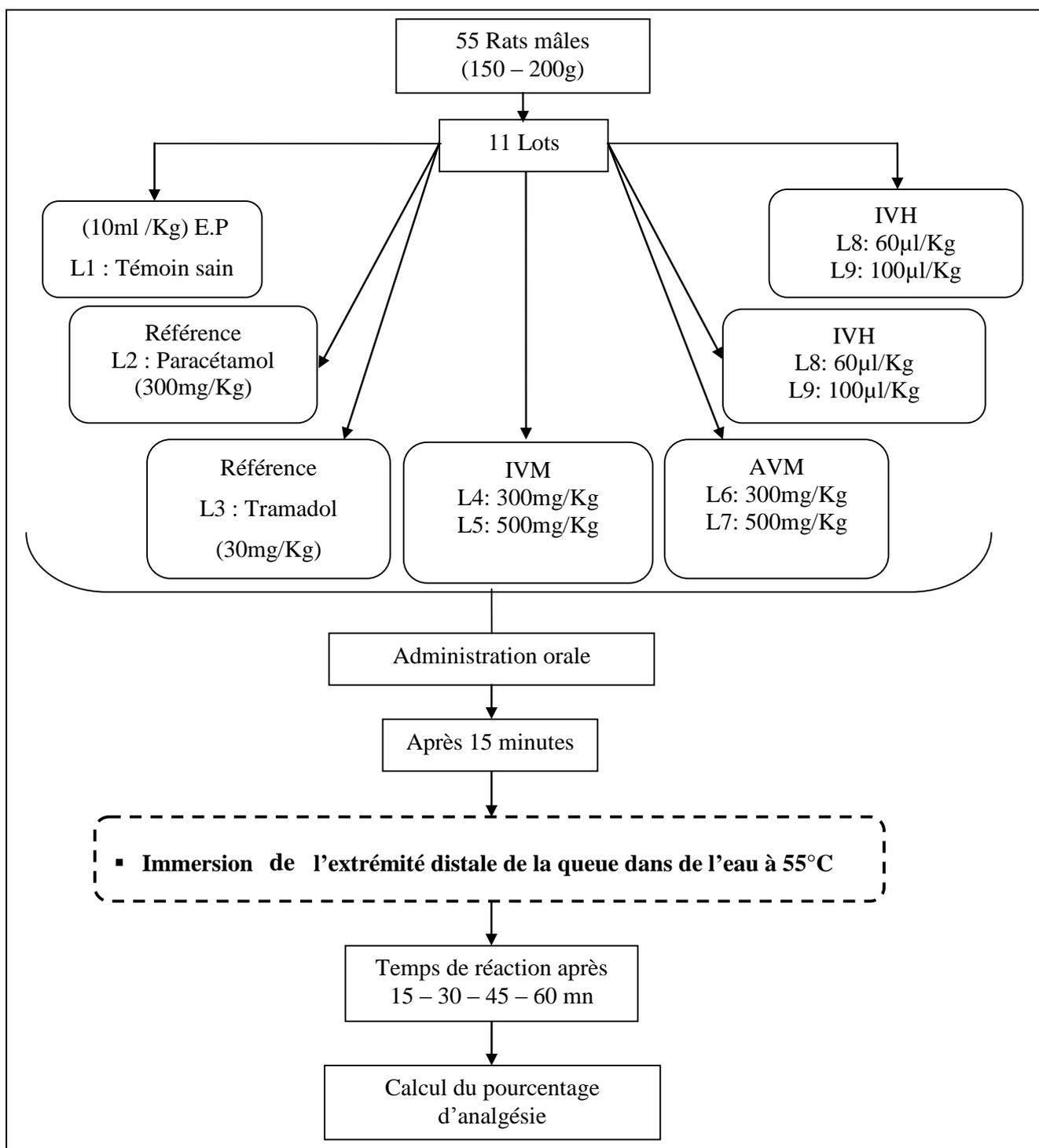


Fig.15. Schéma récapitulatif de l'étude de l'action analgésique centrale des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (*I.viscosa*, *A. valentinus*) chez les rats *Wistar*

III.8.1. Préparation des lots

Pour la réalisation de ce test, 11 lots de 5 rats mâles pesant entre 150 – 200g ont été préparés, soit :

- **1 lot témoin** recevant de l'eau physiologique stérile à raison de 10ml/Kg de poids corporel ;
- **2 lots de référence** recevant du paracétamol à 100 et du tramadol à 30 mg/kg (Singh *et al.*, 1996 ; Sawadogo *et al.*, 2006) ;
- **8 lots essais**, dont 2 lots pour chaque type d'extrait (300 et 500 mg/Kg pour les extraits méthanoliques, 60 et 100 µl/Kg pour les huiles essentielles).

III.8.2. Application du test

L'eau physiologique, les substances de référence, les extraits méthanoliques (IVM, AVM) et les huiles essentielles (IVH, AVH) ont été administrés par voie orale 15 minutes avant le test.

Après ce temps, l'animal fut maintenu en position verticale afin de pouvoir fixer sa queue. En effet, le test consiste à tremper la partie inférieure (environ 5cm de l'extrémité distale) de la queue du rat dans de l'eau chauffée à 55 ± 2 °C et à étudier le réflexe de retraitement de la queue de l'animal 15, 30, 45 et 60 mn après l'administration des substances. Le temps (en secondes) que met l'animal pour retirer sa queue est mesuré. Il est considéré donc comme temps de réaction (Sook-Ha *et al.*, 2014). Le temps de réaction maximal a été fixé à 16 secondes, afin d'éviter l'endommagement des tissus de la queue (Nirmal *et al.*, 2016).

Le pourcentage d'analgésie à 30mn a été ensuite calculé selon la formule ci-dessous (Sook-Ha *et al.*, 2014) :

$$\text{Pourcentage d'analgésie} = \frac{T_a - T_b}{T_b} \times 100$$

Où :

- **T_a** : temps de réaction du témoin
- **T_b** : temps de réaction des lots traités après 30mn

III.9. Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux *in vitro*

En règle générale, le processus inflammatoire implique une série d'événements qui peuvent être suscités par des stimuli tels que l'interaction antigène-anticorps, le préjudice thermique ou physique et de nombreux agents infectieux, notamment les bactéries (Insel, 1990). Les infections bactériennes sont traitées par les antibiotiques. Paradoxalement, depuis que ces agents sont utilisés, la résistance des microorganismes à ces substances n'a cessé d'augmenter et ce problème devient de plus en plus préoccupant (Raymond *et al.*, 2001).

Devant l'inefficacité de la majorité des antibiotiques sur les infections bactériennes et comme étant un facteur de risque du déclenchement de la PR, il serait indispensable de vérifier l'effet des composés phénoliques et des huiles essentielles préparés dans le présent travail sur quelques souches bactériennes révélées résistantes (figure 16).

III.9.1. Préparation des extraits

1 g de chaque extrait méthanolique a été dissous dans 5 ml de Diméthylsulfoxyde (DMSO). Une concentration obtenue de 200 mg/ml a été diluée dans de l'eau distillée de façon à obtenir une concentration finale de 100mg/ml.

1ml de chaque huile essentielle a été dissous dans 1ml de DMSO, pour obtenir une concentration de 500µl/ml.

III.9.2. Préparation de l'inoculum bactérien

A partir d'une culture de 18h, une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une densité équivalente au standard de 0,5 Mac Farland. Cette densité correspond à une concentration de $10^6 - 10^8$ UFC/ml (Wade *et al.*, 2001).

III.9.3. Diffusion des disques sur gélose

C'est une étape préliminaire aux études qui suivent permettant d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est semblable à un antibiogramme standard (Hayes & Markovic, 2002). Elle consiste à déposer des disques de papier Wattman (6mm de diamètre) imprégnés de 10µl des différentes substances (200 mg/ml pour les EM et 500 µl/ml pour HE) à la surface d'une gélose Muller Hinton préalablement inoculée avec une suspension de la bactérie à étudier. Les zones d'inhibition formées après une incubation de 24h à 37°C ont été mesurées en mm (Kumar *et al.*, 2009).

- **Test témoin**

Afin de confirmer l'efficacité des E.M et des HE, un antibiogramme a été réalisé en utilisant différents disques imprégnés de 10µl de solutions de méthanol à 80%, de cyclohexane, de DMSO et d'eau distillée.

III.9.4. Détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide

Cette technique consiste à suivre la cinétique de croissance d'un inoculum bactérien standardisé en présence d'une gamme de concentrations décroissantes en extraits et en huiles essentielles. L'observation et le suivi de la gamme permettent d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en substance antibactérienne capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Toutes les cupules de la microplaque (96) ont été remplies par 50 µl de bouillon de Mueller-Hinton. Un volume de 50µl de la solution mère des extraits testés (E.M : 50mg/ ml, HE : 250µl/ml) a été additionné aux cupules de la 2^{ème} colonne. Des dilutions binaires ont été ensuite réalisées. La plage de concentrations obtenues commence donc par une concentration en extraits méthanoliques de 50 mg/ml et une concentration en huiles essentielles de 250µl/ml. Enfin, 10µl d'inoculum bactérien a été ajouté. Les cupules de la 1^{ère} colonne contenant le milieu de culture et la suspension bactérienne serviront pour témoin. La microplaque a été ainsi incubée à 37 ° C pendant 24 heures. Au cours de l'incubation, les densités optiques ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque (TECAN) (Wade *et al.*, 2001).

III.9.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Le jour suivant la lecture de la CMI, un ensemencement de 10µl de culture en stries de 5 cm chacune a été effectué à partir des cupules ne présentant pas de croissance visible à l'œil nu. Après 18h d'incubation à 37°C, le nombre de colonies a été déterminé. La CMB sera la plus faible concentration en extraits méthanoliques ou en huiles essentielles où le pourcentage de bactéries survivantes est $\leq 0,01\%$ de l'inoculum initial (Stephen *et al.*, 2012).

- **Le rapport CMB/CMI**

Le rapport CMB/CMI a été calculé pour chaque extrait. Dans la mesure où ce rapport est supérieur à 32, la souche bactérienne présente donc une tolérance à l'agent antibactérien testé (Jacquiera *et al.*, 2007).

III.10. Etude des interactions entre les extraits et les antibiotiques (test de FIC)

Les associations d'antibiotiques sont généralement utilisées dans le but d'élargir le spectre d'action, de prévenir l'apparition des mutants résistants et d'obtenir une synergie. La synergie est le fait de réussir à avoir un effet plus intense et donc renforcer mutuellement l'action des deux antibiotiques donnant ainsi un effet supérieur à celui de chaque antibiotique seul (Soussy, 1990) ;

Nous avons essayé dans la présente étude, d'évaluer l'effet des combinaisons entre les extraits préparés et quelques antibiotiques commerciaux.

Pour la réalisation de cette approche, trois espèces bactériennes ont été choisies ; une bactérie à Gram négatif *E. coli*, une bactérie à Gram positif *S. aureus* et une bactérie sporulée *B. subtilis*.

D'une part, la croissance bactérienne a été observée en présence de chaque extrait avec la gentamicine pour *E. coli* et *B. subtilis* et avec l'oxacilline pour *S. aureus*. D'autre part, l'effet antibactérien a été testé en mélangeant les extraits méthanoliques des deux plantes et les huiles essentielles.

III.10.1. Test de synergie sur gélose

Après inoculation des boîtes, les disques d'antibiotique ont été déposés à la surface des géloses. Ensuite, 20µl d'E.M à 50 mg/ml ou d'HE à 250µl/ml ont été ajoutés aux disques. En contrepartie, des volumes égaux des E.M et des HE des deux plantes ont été mélangés et mis sur les disques de papier filtre.

Des disques d'extraits de plantes et des antibiotiques seuls ont été utilisés pour comparer les effets. La synergie est déterminée après incubation en comparant les diamètres des zones d'inhibition des extraits seuls et en association (Jouda, 2013).

III.10.2. Détermination des concentrations fractionnaires inhibitrices (FIC)

L'évaluation des interactions entre les agents antibactériens testés a été pratiquée par la méthode dite de l'échiquier (Stephen *et al.*, 2012). Pour chaque souche, les CMI des extraits et l'antibiotique utilisé en combinaison ont été mesurés par croisement de différentes gammes de concentrations d'un agent avec l'autre. La préparation de l'inoculum, la distribution des substances dans les cupules, l'incubation et la lecture étaient similaires à celles décrites pour les mesures de CMI. En utilisant cette méthode, nous sommes capables de reconnaître si la réaction produite de l'interaction est synergique, additive, indifférente, ou antagonique.

Après détermination des CMI, l'impact de l'association des deux agents antibactériens a été quantifié par le calcul de l'index des concentrations inhibitrices fractionnaires (CIFI) qui sont les plus faibles concentrations de substances en combinaison inhibant la croissance visible des souches bactériennes testées. Le FICI est calculé et interprété comme suit :

$$\Sigma \text{ FIC} = \text{FIC de l'agent A} + \text{FIC de l'agent B}$$
$$\Sigma \text{ FIC} = \frac{\text{CMI de l'agent A en combinaison}}{\text{CMI de l'agent A seul}} + \frac{\text{CMI de l'agent B en combinaison}}{\text{CMI de l'agent B seul}}$$

Selon la valeur du FIC index, quatre catégories d'association sont définies :

- Synergique : $\Sigma \text{ FIC} \leq 0.5$
- Additive : $0.5 < \Sigma \text{ FIC} \leq 1$
- Indifférente : $0.5 < \Sigma \text{ FIC} \leq 4$
- Antagoniste : $\Sigma \text{ FIC} > 4$

III.11. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm la déviation standard (Moyenne \pm SD). Les résultats des différents tests sont analysés par ANOVA. Les valeurs de p inférieur à 0.05 ($p < 0.05$) sont considérées statistiquement significatifs.

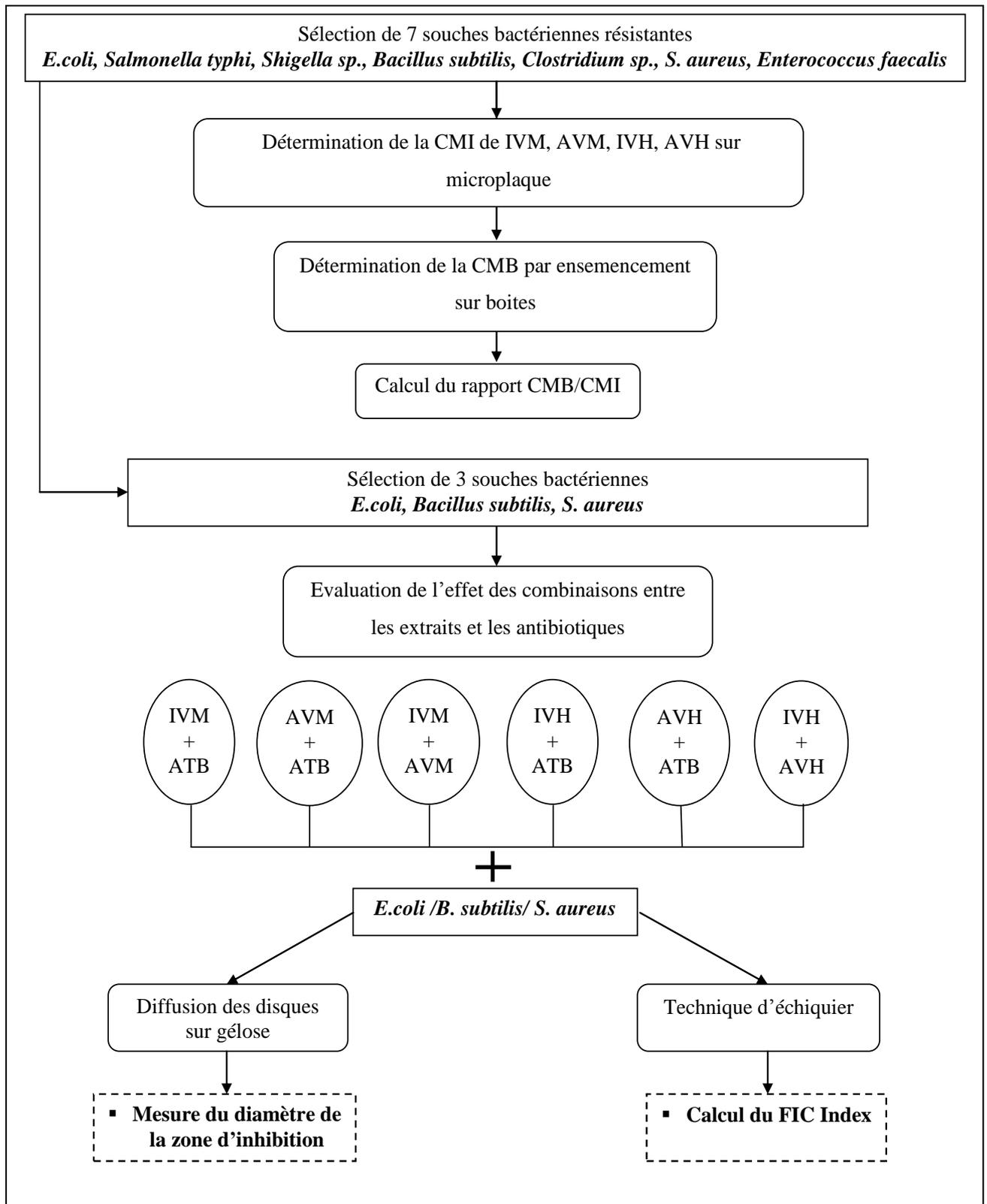


Fig.16. Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité antibactérienne des polyphénols et des huiles essentielles issus des deux plantes (*I.viscosa, A. valentinus*) *in vitro* et de leur association aux antibiotiques.

II. Résultats et Discussions

I. Etude phytochimique des extraits méthanoliques et des huiles essentielles

I.1. Rendements d'extraction et caractères organoleptiques

Les calculs des rendements d'extraction et les différents caractères organoleptiques des extraits méthanoliques et des huiles essentielles des deux plantes (*I. viscosa*, *A. valentinus*) sont illustrés dans le tableau 7.

Tab.7. Principales caractéristiques des extraits méthanoliques et des huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

	Couleur	Aspect	Odeur	%
IVM	Marron	Poudre	Forte	12,46 ± 0,51
AVM	Marron brillant	Visqueux	Forte et agréable	17,82 ± 0,49
IVH	Jaune pâle	Liquide volatil	Très forte	1,49 ± 0,09
AVH	Jaune	Liquide très volatil	Forte	0,63 ± 0,17

I.1.1. Extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques des deux plantes présentent une couleur foncée et une forte odeur, avec un aspect visqueux d'AVM. Ce dernier a enregistré un rendement plus élevé (17,82 ± 0,49 %) par rapport à l'extrait méthanolique d'*I. viscosa* (IVM) (12,46 ± 0,51 %).

Le rendement en IVM obtenu dans ce travail est proche de ceux enregistrés par Gökbulut et ses collaborateurs en 2013 (15%), par Abuhamdah *et al.* en 2013 (10%) et par Chahmi *et al.* en 2015 (13,35 %). En revanche, en utilisant du méthanol absolu, Laghrifi et ses coauteurs (2013) ainsi que Chebouti-Meziou (2016) ont trouvé un rendement beaucoup plus élevé avec des pourcentages respectifs de 44,95 % et de 37,41%.

Des travaux antérieurs réalisés sur les espèces appartenant au genre *Anacyclus* ont enregistrés des rendements beaucoup plus faibles. A titre d'exemple, les études menées sur *A. pyrethrum* où Hamimed (2009) a obtenu 2,70 %, alors que Sujith *et al.* (2011) ont obtenu 1,12% d'extraits. Dans une autre étude réalisée sur *A. clavatus*, le rendement fluctuait entre 6,78 et 9,11% (Aliboudhar & Tigrine-Kordjani, 2014).

I.1.2. Huiles essentielles

L'hydrodistillation de 100g de matière végétale des deux plantes a donné des huiles essentielles de couleur jaune avec des odeurs forte. Dans ce cas, le rendement moyen en huile

essentielle d'*A. valentinus* ($0,63 \pm 0,09$ %) est inférieur à celui d'*I. viscosa* ($1,49 \pm 0,17$ %). Ce dernier est en effet, quasiment identique à celui obtenu par Soltani A. en 2010 (1,50%) sur la même plante de la région de Mascara. Cependant, ces résultats diffèrent de ceux de Haoui *et al.* (2011) et ceux de Kheyar *et al.* (2014) ayant des rendements oscillant entre 0,14 et 0,22%.

Les plantes appartenant au genre *Anacyclus* sont généralement peu rentables en huiles essentielles, ce qui a été prouvé par Selles *et al.* (2013) et par Elazzouzi *et al.* (2014).

Bien que les techniques d'extraction soient les mêmes, la différence de quantité en extraits peut être due à l'origine géographique de la plante, aux conditions climatiques et à la saison de récolte. Par ailleurs, le séchage et le stockage de la matière végétale ainsi que la méthode d'extraction influent largement sur la qualité organoleptique des extraits en particulier les huiles essentielles (Lee *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2005).

I.2. Dosage des composés phénoliques

La teneur totale en phénols est déterminée en fonction de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche (mg EAG/ g sec). En contre partie, la teneur en flavonoïdes est calculée en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche (mg Equ Q/ g sec) tout en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats de l'étude quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits méthanoliques d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* figurent dans le tableau 8 ci-dessous.

Tab.8. Taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques d'*I. viscosa* et *A. valentinus*

	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	Flavonoïdes totaux (mg Equ Q/g)	Pourcentage des flavonoïdes
IVM	174,51 ± 0,41	49,19 ± 0,39	28,18 %
AVM	115,47 ± 0,13	52,15 ± 0,78	45,16 %

I.2.1. Polyphénols totaux

D'après les investigations antérieures, le taux moyen des polyphénols dans les extraits issus d'*I. viscosa* variait généralement entre 103 et 441 mg EAG/g sec selon le solvant utilisé (Gökbulut *et al.*, 2013 ; Abu-Qatouseh *et al.*, 2013 ; El Ouriachi *et al.*, 2014 ; Chahmi *et al.*,

2015 ; Mahmoudi *et al.*, 2016). Quant à notre travail, le taux moyen des polyphénols est de 174,51 mg EAG/g sec.

Parallèlement, l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* (AVM) a donné un taux moyen en composés phénoliques de l'ordre de 115,47 mg EAG/g. En comparant ces résultats avec des études réalisées sur des espèces végétales proches, les extraits d'*A. valentinus* sont plus riches que ceux d'*A. clavatus* qui renferment entre 30,79 et 71,09 mg EAG/g de composés phénoliques (Aliboudhar & Tigrine-Kordjani, 2014 ; Krimat *et al.*, 2014). Cependant, Selles *et al.* (2013) déclaraient que les polyphénols de l'extrait méthanolique des racines d'*A. pyrethrum* avaient atteint une moyenne de 310,78 mg EAG/g.

Ainsi, ces résultats ne sont en réalité qu'une estimation du taux de polyphénols. La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines, donnant ainsi un taux phénolique apparent élevé (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

I.2.2. Flavonoïdes totaux

Pour les taux en flavonoïdes des extraits des deux plantes (tableau 8), la teneur la plus élevée a été enregistrée pour AVM avec une moyenne de 52,15 mg Equ Q/g sec, suivie de celle d'IVM avec une moyenne de 49,19 mg Equ Q/g sec.

Les résultats obtenus pour *I. viscosa* sont d'ailleurs en concordance avec ceux d'Abu-Qatouseh *et al.* (2013) et ceux de Chahmi *et al.* (2015). Cependant, El Ouriachi *et al.* (2014) ont estimé des valeurs en flavonoïdes de 32 et de 74 mg Equ Q/g sec en utilisant le di-éthyl éther et l'éthyle acétate comme solvants d'extraction.

En ce qui concerne *A. valentinus*, le taux en flavonoïdes est relativement élevé par rapport à la quantité totale des polyphénols, puisque l'extrait renferme presque la moitié des composés phénoliques (45.16 %). Selles *et al.* (2013), ont déterminé une concentration en flavonoïdes d'*A. pyrethrum* de 92,50 – 72,50 et 24,20 mg Equ Q/ g sec dans les extraits méthanolique, aqueux et chloroformique.

En effet, l'augmentation du métabolisme des composés phénoliques y compris les flavonoïdes dans *A. valentinus* (plante d'origine saharienne) peut être liée aux conditions de

stress climatiques telles que les températures élevées, l'exposition au soleil, la sécheresse et la salinité (Rai et Carpinella, 2006).

Au vu de ces résultats et par comparaison à la littérature, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont fortement affectées par les solvants d'extraction (la présence de composés phénoliques caractérise les extraits polaires). Par opposition aux tisanes, les extraits hydroalcooliques de plantes offrent une reproductibilité bien plus importante, et permettent d'obtenir une concentration en principes actifs adaptée et standardisée (Fougère et Wynn, 2007).

Pareillement au rendement, la différence de quantité dans les teneurs peut donc être expliquée par les conditions environnementales, la période de récolte ainsi que les protocoles expérimentaux (Lee *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2005).

Par la suite, il était intéressant d'identifier les différents composés phénoliques présents dans les extraits testés.

I.3. Identification phytochimique des polyphénols et des huiles essentielles

I.3.1. Analyse chimique des extraits méthanoliques par LC-MS

La comparaison des pics et des m/z obtenus lors de l'analyse LC-MS (ESI) en mode positif et négatif des deux extraits méthanoliques avec ceux des études antérieures, nous a permis d'établir une identification probable de quelques composés.

I.3.1.1. Extrait méthanolique d'*I. viscosa*

Les données provenant de l'analyse d'IVM, nous ont permis d'établir une identification probable de 12 composés phénoliques (tableau 9).

Les résultats montrent la richesse d'IVM en composés phénoliques, dont différentes classes ont été identifiées. Les acides phénoliques notamment les dérivés de l'acide cinnamique sont représentés par l'acide rosmarinique, l'acide chlorogénique et l'acide dicaféylquinique. Ces deux derniers acides ont été également identifiés par Mahmoudi *et al.* (2016). Les flavonoïdes présents dans l'extrait sont principalement de type flavonol (quercétine, kaempférol, isorhamnétine). Ces mêmes substances ont été d'ailleurs révélées par Bicha (2003) dans son étude sur *I. viscosa*.

Le pic en mode positif ayant une m/z de 271,1 pourrait correspondre à la tomentosine ou à l'inulviscolide qui sont des lactones sesqui-terpéniques ($C_{15} H_{20} O_3$) largement présents chez les espèces du genre *Inula* y compris *I. viscosa* (Bicha, 2003 ; Mamoci *et al.*, 2011).

Tab.9. Identification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique (IVM)

N° du pic	m/z Ions +/-	Identification possible	Références
1	104,2	Dérivé du méthanol	
5	146,1	Coumarine	Tuncay Agar <i>et al.</i> (2015)
6	181,1	Acide tannique	Tuncay Agar <i>et al.</i> (2015)
9	271,1	Inulviscolide	Mamoci <i>et al.</i> (2011)
		Tomentosine	
10	287,1	Kaempférol	Kenny <i>et al.</i> (2014)
2	/189,1	Catéchine	Simirgiotis <i>et al.</i> (2015)
3	/315,0	3-O-Méthyl quercétine	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> (2010)
		Isorhamnétine	Mahmoudi <i>et al.</i> (2016)
4	/353,1	Acide chlorogénique	Spiridon <i>et al.</i> (2013) ; Mahmoudi <i>et al.</i> (2016)
5	/359,1	Dérivé de l'acide hydroxy-cinnamique (acide Rosmarinique)	Kenny <i>et al.</i> (2014)
7	/473,0	Quercétine méthyl éther hexoside	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> (2015)
8	/515,1	Acide dicaféylquinique	Spiridon <i>et al.</i> (2013)

I.3.1.2. Extrait méthanolique d'*A. valentinus*

Les valeurs de m/z en ions positifs et négatifs issues de l'analyse LC-MS d'AVM, nous ont permis de déterminer 14 composés (tableau 10).

Tab.10. Identification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique AVM

N° du pic	m/z Ions +/-	Identification possible	Références
2	104,2	Dérivé du méthanol	
4	266,2	Apigénine	Kenny <i>et al.</i> (2014)
1	/133,1	Acide malique	Tuncay Agar <i>et al.</i> (2015)
2	/173,0	Acide ascorbique	Kenny <i>et al.</i> (2014)
3	/187,0	Acide azélaïque	Abu Reidah (2013)
4	/189,1	Catéchine	Kenny <i>et al.</i> (2014)
5	/215,0	Acide 2,3,4,9-tétra hydro-1H-β-carboline -3-carboxylique (lycoperodine 1)	Abu Reidah (2013)
6	/217,0	9,10-dihydroxy-8-méthoxy thymol	Spiridon <i>et al.</i> (2013)
8	/225,1	Acide sinapique	Lee <i>et al.</i> (2015)
9	/293,0	N.I	Lee <i>et al.</i> (2015)
10	/355,1	Acide férulique β-glucoside	Abu Reidah (2013)
11		Myricétine mono-acétate	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> (2015)
		Di hydroxy-tétra méthoxy flavone	Lin & Harnly (2012)
13		Apigénine -7-O- glucoside	Kenny <i>et al.</i> (2014)
		Kaempférol -3-O- rhamnoside	Lee <i>et al.</i> (2015)
14		Lutéoline 3-O-β- glucopyranoside	Karaköse <i>et al.</i> (2015)
		Quercétine 3-O- rhamnoside	Lee <i>et al.</i> (2015)

Le tableau 10, montre clairement la richesse d'AVM en flavonoïdes sous forme brute ou glycosylée. De nombreux composés présentent des spectres caractéristiques de flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine), de flavones (apigénine, lutéoline) et de flavanols (catéchine). Ces résultats confirment donc l'analyse colorimétrique de cet extrait où les flavonoïdes occupent 45,16% de la totalité des composés phénoliques. L'analyse a révélé également la présence de dérivés des acides phénols (acide sinapique, acide férulique-β-glucoside), des sesquiterpènes (lycoperodine) et des dérivés du thymol (9,10- dihydroxy -8-méthoxy thymol).

- Le spectre ayant une valeur m/z de 104,2 pourrait correspondre au dérivé du méthanol, puisque ce dernier a été utilisé pour solubiliser les extraits.
- Les pics manquants dans les tableaux correspondent à des produits non identifiés

La plupart des composés phénoliques identifiés dans le présent travail ont été également déterminés chez certaines espèces de la famille des *Asteraceae* notamment *Matricaria chamomilla* L. (Linn & Harnly, 2012), *Haplopappus* sp. (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2015), *Chrysanthemum morifolium* (Lai *et al.*, 2007) et *Chresta exsucca* (Schinor *et al.*, 2007).

Les plantes de la famille des *Asteraceae* sont en effet, connues par leur richesse en composés flavoniques (Okuda, 1986) et en lactones sesquiterpéniques (Bellakhdar, 1997), ce qui est en concordance avec les résultats décrits précédemment.

I.3.2. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, pouvant comporter plus de soixante composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres sont présents seulement comme trace (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008).

I.3.2.1. Huile essentielle d'*Inula viscosa*

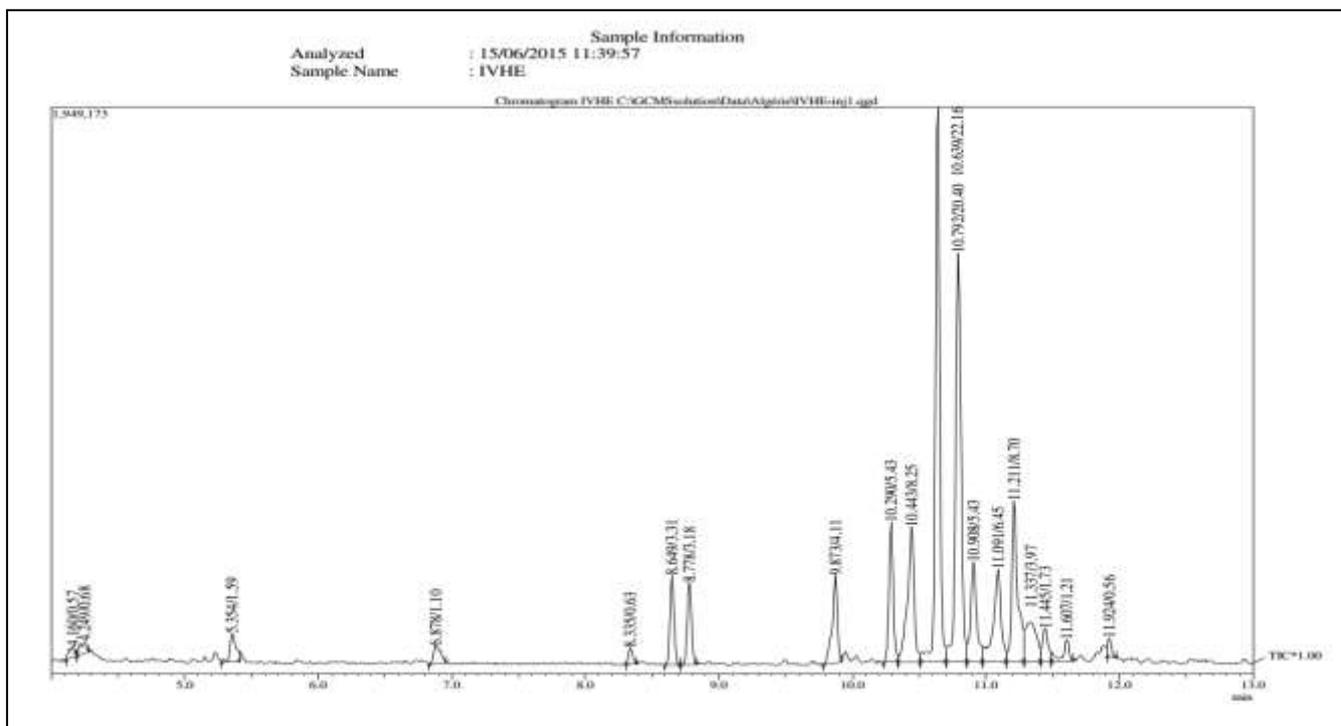


Fig.17. Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle d'*I. viscosa* (IVH) par GC-MS

Le profil chromatographique de l'analyse quantitative et qualitative (GC-MS) d'IVH est représenté par la figure 17. Au cours de ces analyses, 19 composants sont identifiés.

Tab.11. Composition chimique de l'huile essentielle d'*I. viscosa* (IVH)

N°	Temps de rétention (Minute)	Composant	Pourcentage (%)
1	4,160	Nerolidol	0,57
2	4,249	Tricosane	0,68
3	5,354	Borneol	1,59
4	6,878	6, 10, 14-Trimethylpentadecan-2-one	1,1
5	8,335	1, 6, 10-Dodecatrien-3-ol, 3, 7, 11-trimethyl	0,63
6	8,649	Caryophyllene oxide	3,31
7	8,778	Linoleic acid	3,18
8	9,873	Butyl hydroxy toluene	4,11
9	10,290	Pentacosane	5,43
10	10,443	Costic acid	8,25
11	10,639	12-Carboxyeudesma-3, 11 (13) diene	22,16
12	10,792	Farnesene epoxide	20,40
13	10,908	<i>n</i>-Hexadecanoic acid	5,43
14	11,091	<i>neo</i>-Intermedeol	6,45
15	11,211	Eucalyptol	8,70
16	11,337	α -Eudesmol	3,97
17	11,445	Phytol	1,73
18	11,607	Palmitic acid	1,21
19	11,924	α -Copaen-11-ol	0,56

A travers ces résultats, nous remarquons que IVH est majoritairement constituée de 12-Carboxy-eudesma-3, 11 (13) diène (22.16%), de Farnesene epoxide (20,40%), de l'eucalyptol (8,70%), de l'acide costique (8,25%), de *neo*-Intermédeol (6,45%), de l'acide *n*-hexa décanoïque et de pentacosane (5,43 %). L'acide linoléique, l'oxyde de caryophyllène, α - eudésmol et le butyl-hydroxy toluène sont présents avec des concentrations s'étalant entre 3,18 et 4,11%. D'autres composants tels que le bornéol, le phytol et l'acide palmitique sont également présents mais avec des concentrations inférieures à 2%. A la lumière de ces données, nous pouvons constater que les terpènes oxygénés sont les constituants principaux de l'huile essentielle d'*I.viscosa*.

En effet, la composition chimique de l'huile essentielle testée est proche qualitativement et quantitativement de celle démontrée par Haoui et ses collaborateurs (2011) chez l'inule visqueuse d'origine algérienne. Cependant deux constituants n'ont pas été identifiés par ces auteurs l'époxyde de farnésène et le phytol qui furent déterminés dans d'autres études sur la même espèce (De Laurentis *et al.*, 2002; Nasser *et al.*, 2014).

Une comparaison avec les investigations précédentes réalisées sur *I. viscosa* de différentes régions, montre une différence en nombre de constituants identifiés et une variation de la composante principale (Perez *et al.*, 1996 ; Camacho *et al.*, 2000 ; Blanc *et al.*, 2006).

I.3.2.2. Huile essentielle d'*A. valentinus*

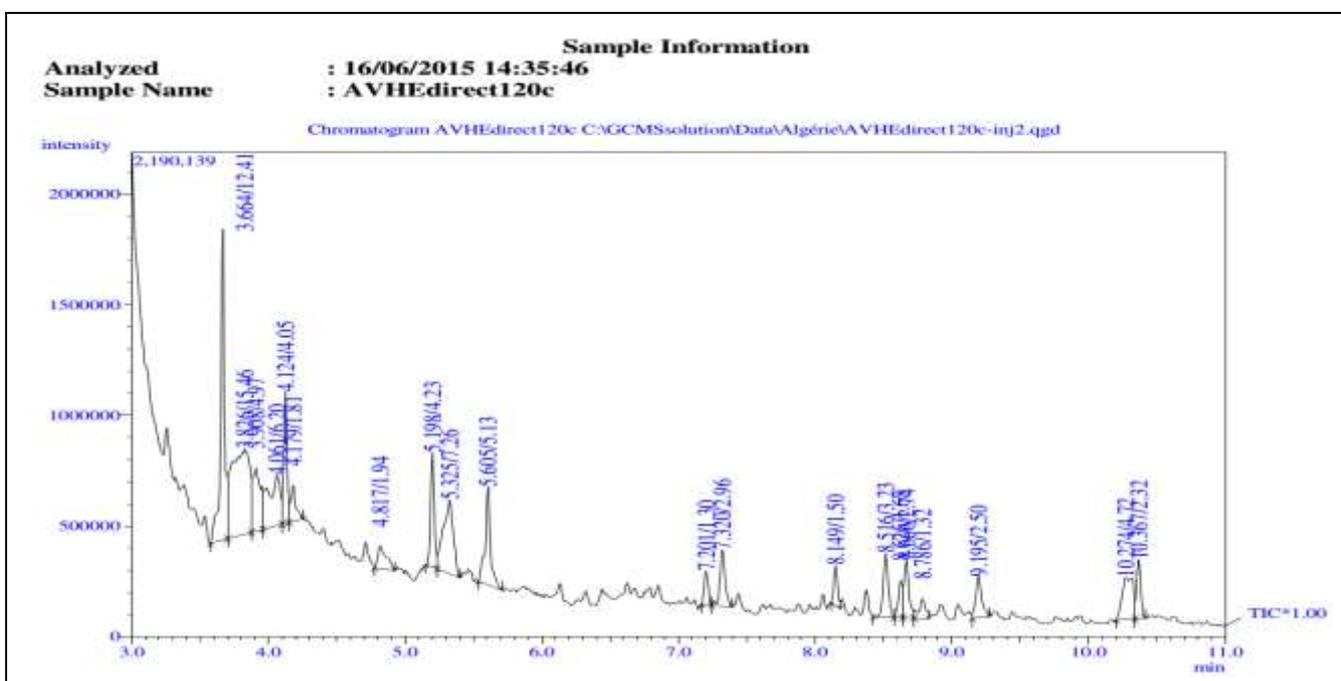


Fig.18. Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle d'*A. valentinus* (AVH) par GC-MS

L'analyse de l'échantillon par GC-MS a permis d'identifier 20 constituants (figure 18, tableau 12) avec une prédominance de 5 constituants : le germacrene (15,46 %), le *trans*-Chrysanthényl acétate (12,41 %), le *trans*-thujone (7,26 %), l'eudesma-4 (15), le 7-diène-1-β-ol (6,2 %) et le β-Biotol (5,13 %). D'autres composés moins fréquents ont été également identifiés : mayurone (4,94%), terpinen-4-ol (4,72%), salvial-4 (14)-en-1-one (4,23%), 14-oxy-α-murolène (4,05%).

Tab.12. Composition chimique de l'huile essentielle d'*A. valentinus* (AVH)

N°	Temps de rétention (Minutes)	Composants	Pourcentage (%)
1	3,664	<i>Trans</i>-Chrysanthenyl acetate	12,41
2	3,826	Germacrene	15,46
3	3,908	Mayurone	4,94
4	4,061	Eudesma-4 (15), 7-diene-1-β-ol	6,2
5	4,124	14-oxy- α -Muuroleone	4,05
6	4,197	Muurole-4, 10 (14)-diene-1- β -ol	1,81
7	4,817	Spathulenol	1,94
8	5,198	Salvial-4 (14)-en-1-one	4,23
9	5,325	<i>Trans</i>-Thujone	7,26
10	5,605	β-Biotol	5,13
11	7,201	Tridecane	1,3
12	7,320	β -Atlantol	2,96
13	8,149	3-iso-Tujopsanone	1,5
14	8,516	Khusinol	3,23
15	8,626	Bicyclogermacrene	1,68
16	8,666	Cis-Cadin-4-en-7-ol	2,74
17	8,786	Occidentalol	1,32
18	9,195	α -Terpinene	2,5
19	10,274	Terpinen-4-ol	4,72
20	10,367	Isobicyclogermacrenal	2,32

Certains composés de l'huile essentielle d'*A. valentinus* sont d'ailleurs présents chez d'autres espèces du genre *Anacyclus*, mais avec des proportions différentes. Le germacrene, le spathuléol, l' α -Terpinene et le Mayurone ont été également repérés dans les huiles essentielles de *A. calvatus* (Hammami *et al.*, 2013), *A. pyrethrum* (Elazzouzi *et al.*, 2014) et *A. cyrtolepidioides* (Zardi-Bergaoui *et al.*, 2008).

D'après les proportions des 20 composés identifiés et contrairement à la plupart des huiles essentielles, celle d'*A. valentinus* comporte plusieurs composés majoritaires dont la plupart sont des sesquiterpènes : une caractéristique de la famille des astéracées (Selles *et al.*, 2013 ; Elazzouzi *et al.*, 2014).

Les huiles essentielles testées présentent une diversification chimique d'une part par rapport aux plantes de la même famille (*Asteraceae*) et d'autre part par rapport aux plantes du même genre voire même la même espèce. Par conséquent, la famille *Asteraceae* est particulièrement caractérisée par le polymorphisme chimique (Garneau, 2001).

- La quantification et l'identification des polyphénols et des huiles essentielles d'*A. valentinus* menées dans la présente étude sont en effet les premières informations sur la composition chimique de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle de cette plante d'origine algérienne.

II. Evaluation de la toxicité orale aiguë des extraits végétaux chez les rats

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses qui apparaissent immédiatement, après l'administration d'une seule dose de la substance testée et ce durant une période s'étalant à 14 jours (Le Blanc, 2010).

Les paramètres suivis après gavage par différentes doses des extraits méthanoliques et des huiles essentielles testés sont les premiers signes de toxicité, le comportement général et la prise de nourriture (Almança *et al.*, 2011).

Pareillement au lot témoin ayant reçu de l'eau physiologique, l'administration orale des différentes doses en extraits méthanoliques allant de 300 jusqu'à 2500 mg/Kg p.c et en huiles essentielles de 0,3 à 1,5 ml/Kg p.c. n'a montré aucun signe de toxicité immédiat. Cependant, la prise d'IVH et d'AVH aux doses de 2 et 3 ml/Kg p.c. a provoqué des changements dans l'activité physique et le comportement des rats dans les 30 minutes suivant l'administration. Un isolement et une convulsion ont été remarqués chez ces rats.

Durant la période d'observation, aucun effet retardé n'a été signalé chez les rats recevant les différents extraits par comparaison au témoin. En plus, aucune mortalité n'a été enregistrée, la DL_{50} est supposée donc supérieure à 2500 mg/Kg pour les extraits méthanoliques et à 3ml/Kg pour les huiles essentielles. D'après Hodge et Sterner (1943), les produits ayant une DL_{50} supérieure aux valeurs précédentes sont faiblement toxiques.

Çelik et Aslanturk (2010) ont démontré la cyto-génotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles d'*I. viscosa* sur les cellules d'*Allium cepa*. Bien que cette plante ait des effets bénéfiques en médecine, elle peut causer des dommages sur les cellules lorsqu'elle est mal utilisée.

En revanche, l'extrait hydroéthanolique d'*I. racemosa* n'a montré aucune toxicité aigue par voie intra-péritonéale chez les rats (Srivastava *et al.*, 1999).

En effet, certaines plantes du genre *Inula* particulièrement *I. helenium* provoquent des dermatites par contact (Aalto-Korte *et al.*, 2007; Aberer, 2008). Cette dermatite ne résulte pas uniquement suite à l'exposition aux plantes du genre *Inula*, mais aussi à d'autres plantes de la famille des *Asteraceae* (Aberer, 2008). Ce problème de dermatite est probablement lié à la présence des lactones sesquiterpéniques qui prédominent la composition de l'inule (Marc *et al.*, 2008). L'augmentation de l'utilisation médicinale de ces composés, pourrait donc augmenter le risque de leur potentiel toxique (Amorim *et al.*, 2013).

Tadjeddine et ses collègues (2013) ont rapporté dans leur étude, que l'administration orale de l'extrait aqueux d'*A. valentinus* de la région d'El Bayadh (Algérie) à des doses atteignant 4 g/Kg p.c. n'a provoqué aucune toxicité aigue chez les rats. En plus, dans des études réalisées sur l'extrait aqueux des racines d'*A. pyrethrum*, la DL₅₀ a été déterminée supérieure à 1g/Kg p.c. (Selles, 2012) et à 2g/Kg p.c. (Kishor Kumar & Lalitha, 2013) chez les rats.

L'étude de Hmamouchi (1997) sur les plantes alimentaires, aromatiques condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc a montré que l'espèce *I. viscosa* est une plante médicinale non toxique, alors que l'espèce *A. valentinus* est une plante médicinale, aromatique, condimentaire et considérée comme épice.

D'après Franz-Xavier *et al.* (2004), les substances toxiques dans les plantes sont principalement divisées en alcaloïdes, glycosides triterpéniques et glycosides cyanogènes, bien qu'elles soient utilisées comme médicaments.

- On pourrait conclure que les quatre extraits IVM, AVM, IVH et AVH sont relativement sans danger, lorsqu'ils sont administrés par voie orale chez les rats, mais ceci n'empêche pas qu'à fortes doses, ces substances deviennent un risque. Le fait que nous n'utilisons que des plantes ne signifient pas que cela est sans danger. Par conséquent, elles méritent d'être utilisées avec précaution chez l'homme.
- Cette étape n'est que préliminaire et devrait être renforcée par une étude de la toxicité subaigüe et chronique. Toutefois, ces résultats sont encourageants pour la valorisation des deux plantes étudiées.

III. Etude de l'effet des extraits végétaux sur l'arthrite rhumatoïde *in vivo*

L'évaluation des extraits des plantes étudiées sur l'arthrite rhumatoïde induite chez les rats mâles portait sur le suivi de quelques paramètres vitaux et sur l'évolution de l'œdème durant 15 jours de traitement.

III.1. Evolution pondérale

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience, est illustré dans les figures 19a, 19b.

III.1.1. Evolution pondérale chez les rats prétraités par les extraits végétaux

Selon la figure ci-dessous, chez les rats recevant de l'eau physiologique, le poids évolue de façon normale enregistrant un gain de 13 g. En revanche, une perte massive et significative du poids apparait chez les rats arthritiques. Une légère diminution de la masse corporelle est aperçue chez les groupes recevant l'extrait méthanolique et l'huile essentielle d'*I. viscosa*, par comparaison à ceux recevant les substances issues d'*A. valentinus* où les rats prétraités par AVM démontrent un gain de 9,2 g de poids.

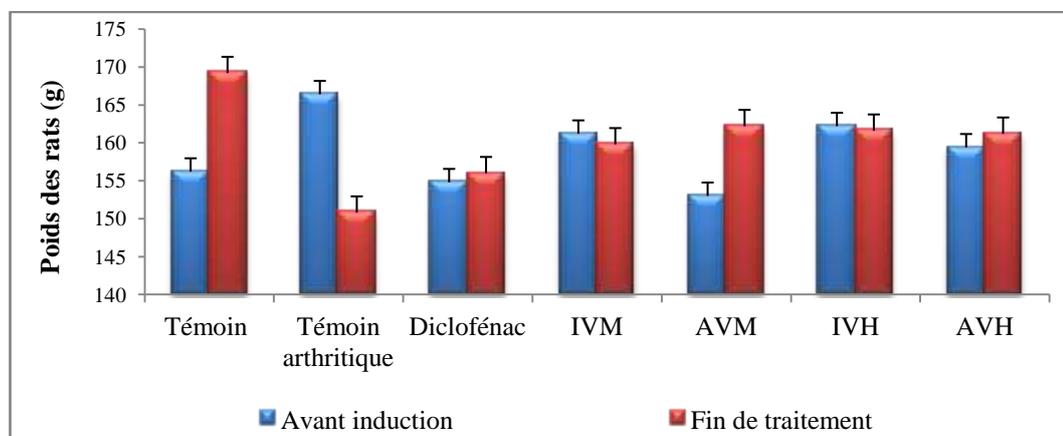


Fig. 19a. Poids initiaux et finaux des rats témoins et prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

III.1.2. Evolution pondérale chez les rats traités par les extraits végétaux

Dans ce cas, tous les rats ont enregistré un gain pondéral à l'exception des animaux traités par l'huile essentielle d'*I. viscosa*, où une diminution légère de poids a été observée (figure 19b). Comme pour les rats prétraités, l'administration d'AVM provoque le gain de poids le plus élevé sur la totalité des rats traités. Cependant, aucune différence significative n'est notée dans l'évolution corporelle des rats traités comparés aux rats sains.

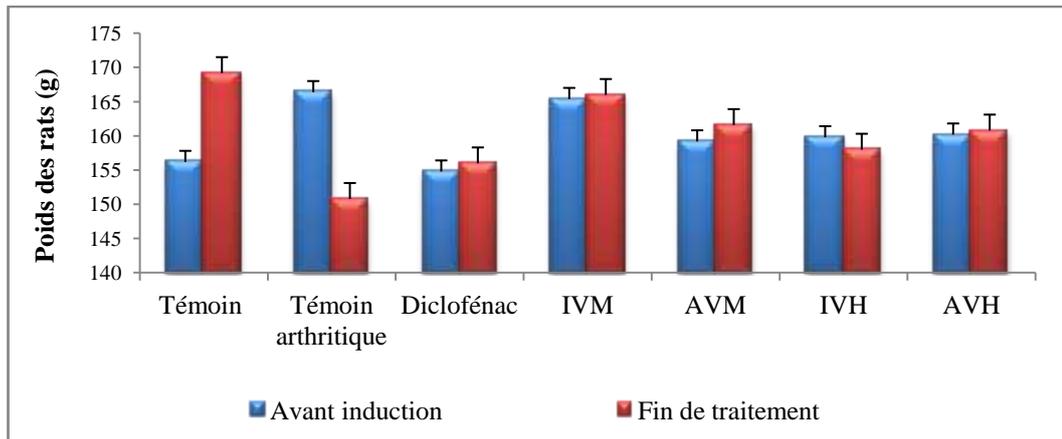


Fig. 19b. Poids initiaux et finaux des rats témoins et traités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Des études réalisées sur l'effet des préparations à base de plantes médicinales sur l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant de Freund et par collagène, ont également signalé que la variation des masses corporelles des animaux traités est non significative par rapport au témoin (Leonavičienė *et al.*, 2013 ; Karnati *et al.*, 2013).

Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (El Hilaly *et al.*, 2004). Ainsi, la perte de poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal et peut être expliquée par l'altération de son métabolisme (Mukinda et Syce, 2007). C'est le cas des rats arthritiques non traités, dont la perte de leur poids est probablement due à l'inflammation causée par l'adjuvant complet de Freund.

En contrepartie, l'évolution normale de la masse corporelle des animaux arthritiques ayant reçus les différentes substances testées témoigne de la capacité de ces substances à maintenir constant le poids des rats. Cette capacité peut être corrélée à l'atténuation de l'inflammation à l'origine du déséquilibre de l'état physiologique des rats malades. En effet, Vetal (2013) ainsi que Wang *et al.* (2012) ont constaté cette corrélation entre l'inhibition de l'inflammation par les polyphénols et le gain pondéral.

- La PR est généralement associée à une perte de poids connue sous le nom de cachexie rhumatoïde qui conduit à la diminution de l'activité physique et de la force musculaire (Patil *et al.*, 2011). Certains chercheurs ont rapporté que l'altération du métabolisme réduit l'absorption intestinale du glucose (Brunet-Guedj *et al.*, 2006). Le gain de poids corporel remarqué dans la présente étude peut être dû à la restauration de la capacité d'absorption de l'intestin et donc à la gestion de la cachexie rhumatoïde.

III.2. Suivi de l'œdème

L'infection résultant de l'injection du CFA provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui augmentent la perméabilité des capillaires. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Rousselet *et al.*, 2005). Le suivi de l'œdème est d'ailleurs l'un des principaux paramètres dans l'évaluation du degré de l'inflammation aiguë ou chronique et de l'efficacité du traitement utilisé (Farong *et al.*, 2004). L'évolution du diamètre de l'œdème des rats arthritiques, prétraités et traités au cours de l'expérience est présentée dans les figures (20a, 20b).

III.2.1. Suivi de l'œdème chez les rats prétraités par les extraits végétaux

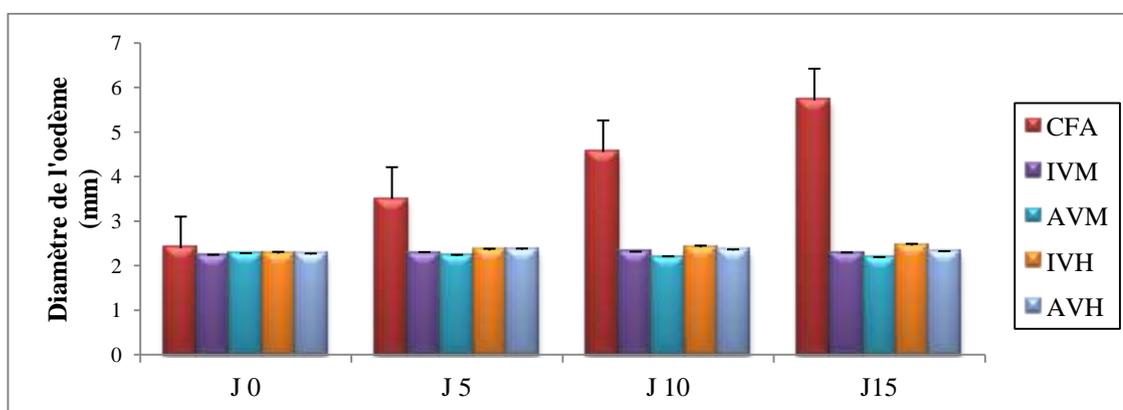


Fig. 20a. Evolution de l'œdème chez les rats arthritiques et les rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Dans l'état normal, le diamètre de la cheville des rats varie entre 2,27 et 2,29 mm. Cependant, l'œdème formé chez les rats arthritiques a provoqué le gonflement des chevilles de ces animaux atteignant une moyenne de 5,71 mm.

Depuis le jour de l'induction jusqu'à la fin de l'expérimentation, le diamètre moyen de l'œdème a varié entre 2,23 et 2,45 mm chez les rats ayant subi l'administration orale préventive des extraits méthanoliques et des huiles essentielles des plantes étudiées. En comparant ces lots, aucune différence significative n'a été déterminée. Par comparaison au témoin arthritique, IVM, AVM, IVH et AVH limitent voire même inhibent la formation de l'œdème.

III.2.2. Suivi de l'œdème chez les rats traités par les extraits végétaux

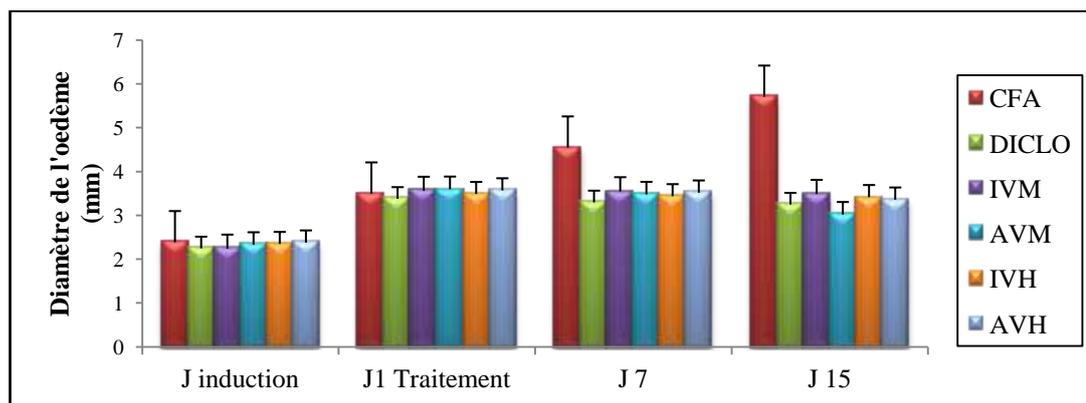


Fig.20b. Evolution de l'œdème chez les rats arthritiques et les rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Les rats arthritiques ont présenté un gonflement et une rougeur des tissus mous autour des articulations de la cheville injectée lors du déclenchement ainsi qu'au cours de l'évolution de l'arthrite. Ils ont montré une intensité maximale au 9^{ème} jour. Dès le premier jour de traitement, l'œdème a lentement diminué jusqu'au 15^{ème} jour.

L'administration orale de 20mg/Kg p.c. de diclofénac a réduit significativement l'inflammation ($p < 0,05$) par rapport à celle du groupe contrôle passant d'une épaisseur moyenne de 5,71mm à 3,25 mm soit à 43,08%. Le diclofénac est couramment utilisé dans les pathologies inflammatoires y compris la PR (Brandin *et al.*, 2007).

Chez les rats traités par 300 mg/Kg d'IVM et d'AVM, le diamètre de l'œdème diminue significativement ($p < 0,05$). Il atteint $3,49 \pm 0,01$ mm pour IVM et $3,02 \pm 0,02$ mm pour AVM. Ceci signifie une inhibition de l'inflammation de 38,87% et 47,11%. L'inhibition de l'inflammation par AVM est en effet supérieure à celle obtenue avec le diclofénac.

Le traitement oral par IVH et AVH à la dose de 60 μ l/Kg p.c. induit une diminution significative de l'épaisseur des pattes injectées par CFA. L'huile essentielle (IVH) réduit le diamètre de l'œdème d'une différence de 2,29 mm, ce qui correspond à une réduction de l'inflammation de 40,10%, alors que pour AVH, la différence est de 2,35 mm correspondant à 41,15%. Aux doses utilisées, les deux huiles essentielles donnent des effets inhibiteurs proches de ceux du traitement standard.

Suite à ces données, nous pouvons conclure que les plantes médicinales étudiées présentent un fort pouvoir sur l'inflammation avec ses phases aigue et chronique. En effet, l'étude de l'activité anti-inflammatoire d'*I. viscosa* est le sujet de plusieurs investigations (Al-Dissi *et al.*,

2001 ; Zeggwagh *et al.*, 2006 ; Hernandez *et al.*, 2007). Hyeun Choi et ses collègues (2010) ont également déterminé la capacité d'une autre espèce du genre *Inula* (*I. japonica*) à atténuer les réponses inflammatoires.

Bien que les espèces de la famille des *Asteraceae* soient connues pour leur effet anti-inflammatoire et malgré les études montrant les propriétés thérapeutiques des espèces du genre *Anacyclus* (Efraim *et al.*, 2008; Benitez *et al.*, 2010), aucune évaluation du pouvoir anti-inflammatoire n'a été admise.

La capacité des extraits méthanoliques à réduire l'œdème est due à la présence de plusieurs types de composés possédant des propriétés anti-inflammatoires à des concentrations très importantes. Les flavonoïdes identifiés lors de l'étude phytochimique comme la quercétine, la myricétine, le kaempférol et l'apigénine exercent une action sur la synthèse de la cyclooxygénase et la lipoxygénase (Kim *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2004 ; Bahmani *et al.*, 2014).

L'inulviscolide, principal constituant d'IVM a démontré une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'œdème de l'oreille chez les rats (Shah Biren *et al.*, 2006).

La lutéoline 3-O- β - glucopyranoside identifiée dans AVM, possède une action inhibitrice sur la synthèse des thromboxanes et par conséquent sur la synthèse de l'acide arachidonique principal acteur du processus pro-inflammatoire (Odontuya *et al.*, 2005).

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles est due principalement à la présence des terpènes. Certains constituants volatils tels que l' α -thujène, l' α -eudesmol et le phytol inhibent la synthèse des prostaglandines (Bahmani *et al.*, 2014).

- Le traitement par les substances issues d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* réduit l'inflammation de l'arthrite rhumatoïde induite par CFA, alors que le prétraitement par ces substances maintient constant l'état des rats. Nous suggérons que les principes actifs contenus dans ces substances préviennent le déclenchement de l'inflammation.

III. 3. Indice arthritique

La détermination de l'indice arthritique est importante dans l'évaluation du degré d'inflammation, de la sévérité de la PR et des effets thérapeutiques d'une substance (Kumar *et al.*, 2006 ; Kshirsagar *et al.*, 2014).

L'observation visuelle de l'état des pattes postérieures/antérieures et de l'inflammation et/ou des nodules sur les oreilles, le nez et la queue nous a permis de calculer l'indice arthritique et d'établir les histogrammes illustrés dans les figures 21a et 21b.

III.3.1. Indice arthritique chez les rats prétraités par les extraits végétaux

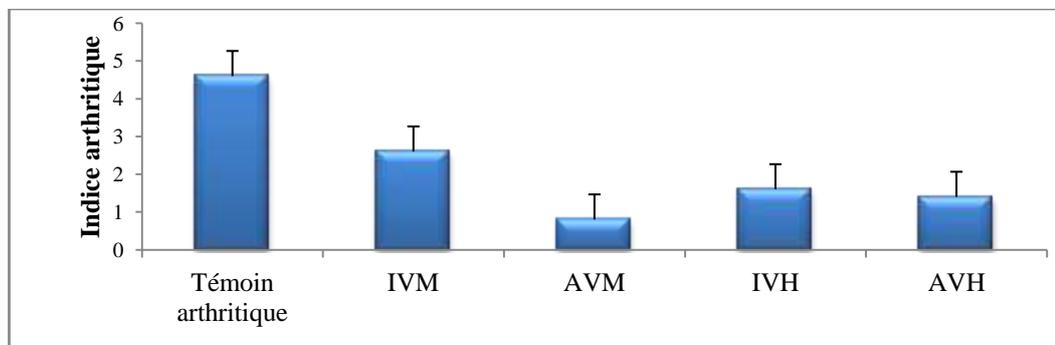


Fig.21a. Indice arthritique chez les rats témoins et les rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Comme l'indique la figure, après immunisation par le CFA, l'indice arthritique chez les rats a augmenté significativement donnant une valeur moyenne de 4,6 par rapport aux rats sains ne démontrant aucun changement.

Cependant, l'administration préventive d'IVM, d'AVM, d'IVH et d'AVH a donné des valeurs moyennes respectives d'indice arthritique de 2,6 – 0,8 – 1,6 et 1,4. La comparaison entre ces groupes n'a donné en effet aucune différence significative.

L'indice le plus faible a été enregistré chez les rats recevant l'AVM, où l'évolution de l'œdème était pratiquement constante et le gain pondéral était le plus élevé.

III.3.2. Indice arthritique chez les rats traités par les extraits végétaux

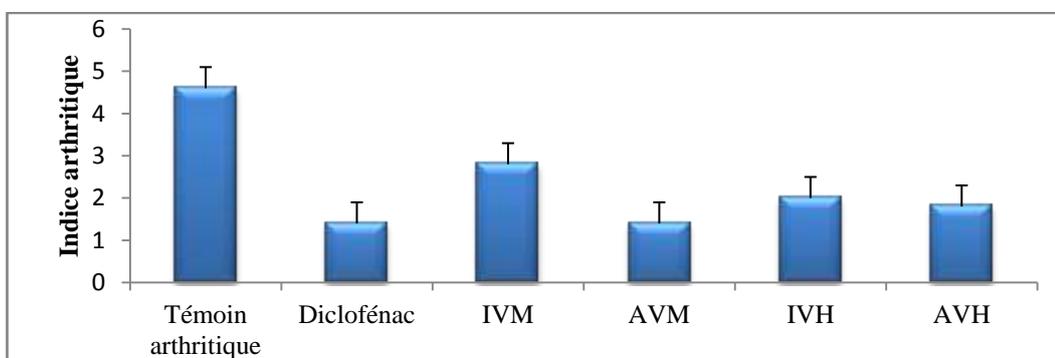


Fig.21b. Indice arthritique chez les rats témoins et les rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Dans le cas où le traitement débutait après installation de la maladie, la prise orale de diclofénac a montré une réduction significative ($p < 0,05$) du score calculé ($1,4 \pm 1,14$).

Les traitements avec 300 mg/Kg p.c. d'IVM et d'AVM par comparaison au témoin ont diminué significativement l'inflammation et les nodules formés sur les tissus. Chez les rats recevant IVM, l'indice arthritique était de $2,8 \pm 1,09$, alors qu'il était de $1,4 \pm 0,54$ chez les animaux recevant AVM.

La moyenne du score arthritique calculé chez les rats post-traités par 60 µl/Kg p.c. d'IVH est de 2. Cette substance a produit un effet statistiquement comparable au témoin ($p < 0,05$). De même, la prise d'AVH (60 µl/Kg p.c.) durant 15 jours a réduit également la sévérité de la maladie donnant un indice moyen de 1,8.

Bien que la prise des différents extraits végétaux ait atténué l'évolution de l'inflammation, celle, d'AVM a donné le résultat le plus important identique à celui du standard.

L'injection de l'adjuvant complet de Freund dans la patte postérieure gauche aboutit au gonflement de celle-ci. La persistance de la maladie implique des réponses bi-phasiques et latérales aboutissant au gonflement et à la rigidité des autres pattes. Des nodules autour des tissus mous apparaissent également comme effets secondaires de l'inflammation (Choudhary *et al.*, 2014). L'indice arthritique constitue un paramètre crucial dans l'évaluation clinique de l'inflammation au cours de l'arthrite rhumatoïde (Patel *et al.*, 2012a). La réduction de cet indice est donc directement liée à la suppression de l'inflammation, ce qui a été démontré précédemment.

III.4. Masse relative des organes

De nombreuses études sur l'arthrite rhumatoïde, ont montré que non seulement les articulations sont touchées, les organes viscéraux peuvent également être affectés par le processus pathologique (Leonavičienė *et al.*, 2013).

A la fin du traitement, tous les rats ont été sacrifiés et quelques organes (foie, rate, reins, poumons et cœur) ont été prélevés, observés et pesés. Généralement, les tailles, les formes et la couleur des organes vitaux prélevés sont toutes normales.

III.4.1. Masse relative des organes des rats prétraités par les extraits végétaux

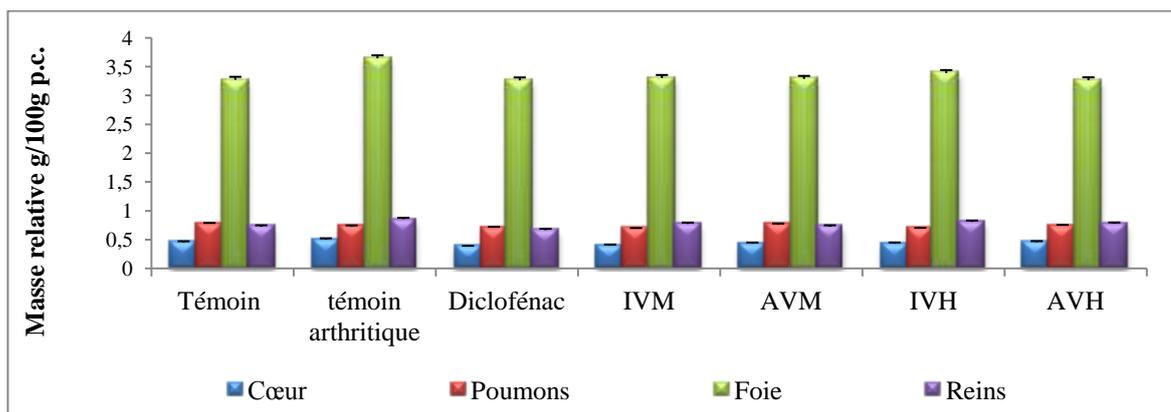


Fig.22a. Masse relative des organes des rats témoins et des rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Par comparaison aux sains, les rats arthritiques présentent une augmentation significative du poids relatif du cœur, du foie et des reins.

A l'exception d'une augmentation ($p < 0,05$) de la masse relative des reins des rats prétraités avec $60 \mu\text{l/Kg p.c.}$ d'IVH, toutes les valeurs sont semblables à celles obtenues chez les rats sains.

Nos résultats se concordent en effet avec ceux obtenus par Alam et Galav (2013) sur l'effet antiarthritique du thymoquinone isolé des graines de la nigelle.

III.4.2. Masse relative des organes des rats traités par les extraits végétaux

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation des masses relatives du cœur, du foie et des reins a été rétablie significativement ($p < 0,05$) chez les groupes traités par le standard, AVM, IVH et AVH.

Cependant, chez les rats recevant IVH, la taille des reins n'a pas été restaurée (figure 22b). Cette augmentation remarquée également chez les rats recevant cette huile à visée préventive peut être expliquée par la toxicité de l'un de ses constituants.

Par comparaison entre les différents lots, celui d'AVM était le plus proche du témoin sain suivi par le traitement de référence.

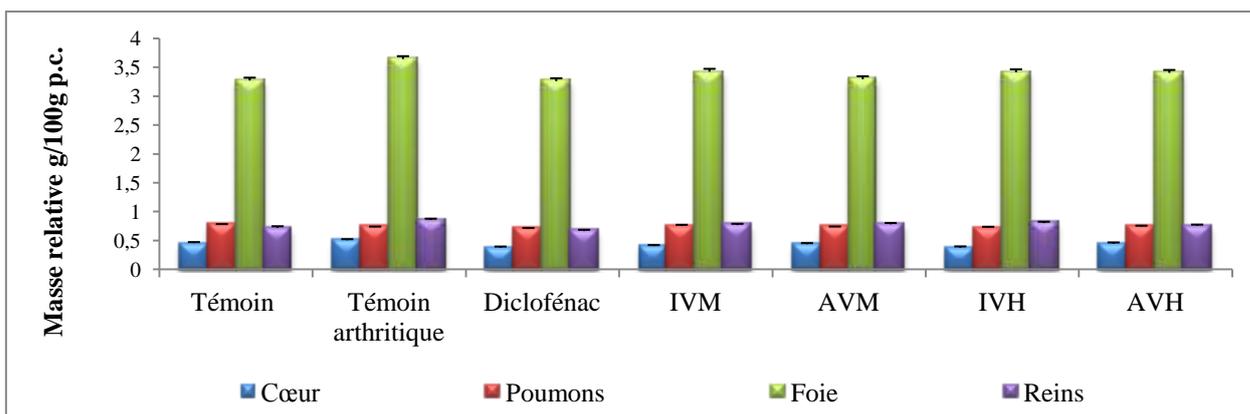


Fig.22b. Masse relative des organes des rats témoins et des rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

L'élévation de la masse d'un organe peut être liée à une congestion par la réservation du sang dans le tissu (Rasekh *et al.*, 2008), ou par la présence d'un infiltrat inflammatoire (Betti *et al.*, 2012). La variation des poids des reins, du cœur et du foie est l'une des caractéristiques de l'arthrite expérimentale, ce qui pourrait refléter indirectement la stimulation du processus inflammatoire (Bauerova & bezek, 1999).

Généralement, les altérations de la masse relative des organes reflètent la toxicité après l'exposition à une substance toxique. Le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique d'un toxique (Jothy *et al.*, 2011).

La variation du poids des organes internes est d'ailleurs un bon indice de l'évaluation de la toxicité d'une substance (Teo *et al.*, 2002). Les valeurs obtenues indiquent un effet bénéfique des préparations testées sur les organes internes, ce qui pourrait donc compléter celui de l'étude de la toxicité aigue des extraits.

III.5. Indices du thymus et de la rate

La détermination des indices de la rate et du thymus est l'un des paramètres essentiels dans le diagnostic de l'inflammation systémique dans l'arthrite rhumatoïde expérimentale (Fletcher *et al.*, 1998).

La prise de poids des rates et des thymus des différents groupes et le calcul de leur ratio par rapport au poids corporel sont présentés dans les figures 23a et 23b.

III.5.1. Indices de la rate et du thymus des rats prétraités par les extraits végétaux

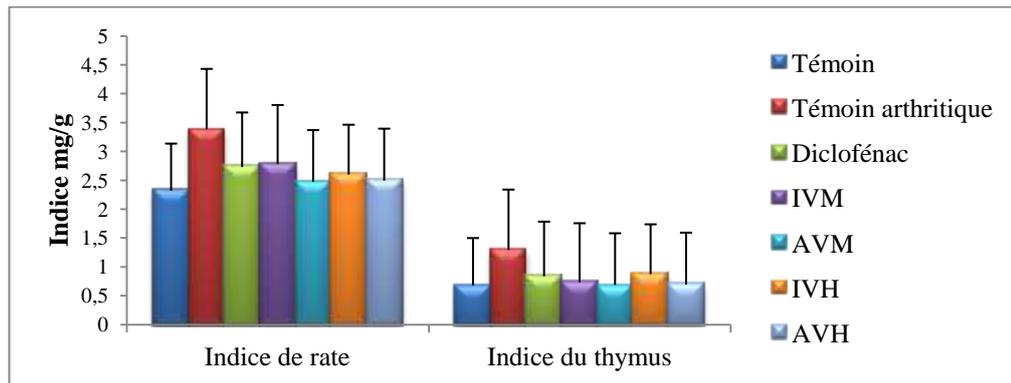


Fig.23a. Indices de la rate et du thymus des rats témoins et des rats prétraités par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

L'injection de l'adjuvant de Freund a induit l'augmentation significative des masses de la rate et du thymus, donnant des indices de $3,38 \pm 0,15$ et $1,29 \pm 0,13$, par rapport aux rats normaux présentant des indices de $2,32 \pm 0,21$ pour la rate et de $0,68 \pm 0,10$ pour le thymus.

L'administration préventive de l'extrait méthanolique (300 mg/Kg p.c.) et de l'huile essentielle (60 µl/Kg p.c.) d'*A. valentinus* a donné des résultats analogues à ceux du témoin.

D'après la figure, l'extrait méthanolique d'*I. viscosa* contribue à la régulation des indices précités avec une légère augmentation du poids de la rate.

Chez les rats prétraités par IVH, un indice de thymus élevé a été remarqué par rapport aux rats normaux et ceux recevant les autres substances. En revanche, cet indice est inférieur à celui calculé chez les rats non traités.

III.5.2. Indices de la rate et du thymus des rats traités par les extraits végétaux

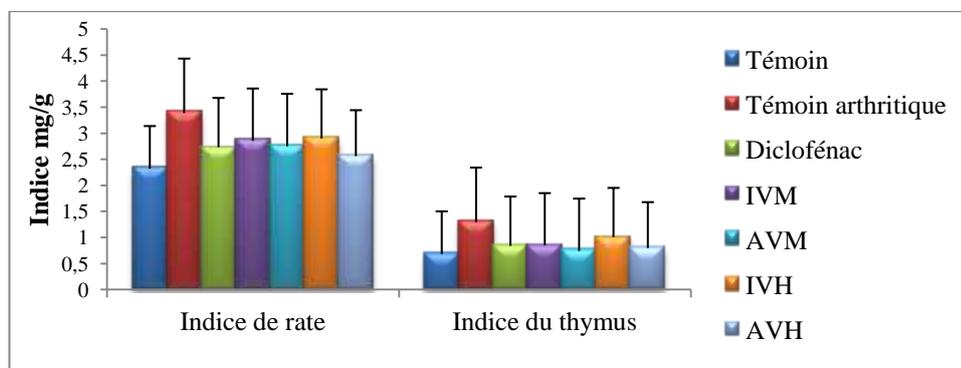


Fig.23b. Indices de la rate et du thymus des rats témoins et des rats traités par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Suite à la figure ci-dessus, le diclofénac à 20 mg/Kg p.c. a diminué les indices de la rate ($2,73 \pm 0,12$) et du thymus ($0,83 \pm 0,23$). L'augmentation du poids de la rate et celui du thymus a

été inhibée suite à la prise orale d'IVM, d'AVM et d'AVH. Les indices moyens ainsi acquis s'étendaient entre 2,56 et 2,85 pour la rate et entre 0,74 et 0,84 pour le thymus.

L'administration d'IVH a donné un indice de rate de 2.89 ± 0.35 et un indice de thymus de $1 \pm 0,18$ du point de vue statistique ($p < 0,05$). Ce résultat est inférieur à celui des rats non traités, mais supérieur à celui des rats normaux et des rats prétraités par les autres extraits.

Les observations que nous avons établies concordent avec celles de Patel *et al.* (2003) et celles de Wang *et al.* (2016). Par opposition, d'autres investigations sur les effets antiarthritiques des plantes médicinales ont démontré que le CFA impliquait une diminution de l'indice du thymus (Leonavičienė *et al.* 2013 ; Choudhary *et al.*, 2014).

D'une part, l'augmentation du poids de la rate par rapport au poids corporel se produit suite à la libération des cytokines entraînant une perturbation de l'histologie de cet organe. D'autre part, la variation du poids du thymus est due à la suppression ou au déséquilibre du système immunitaire (Gebhard *et al.*, 2009). Nos résultats indiquent donc que IVM, AVM, IVH et AVH réduisent ou inhibent l'hypertrophie de ces organes.

- Nous pouvons constater que les principes actifs contenus dans les plantes étudiées particulièrement *A. valentinus* aident à la récupération de l'hyperfonctionnement des organes immunitaires sans causer de dommages. Ils semblent donc avoir un effet immuno-protecteur.

III.6. Marqueurs sanguins

Puisque nous avons utilisé des kits spécifiques aux dosages sériques chez l'être humain, nous avons pris comme normes les valeurs mentionnées sur les prospectus expérimentaux. La comparaison a été faite par rapport aux rats sains et ceux malades non traités.

III.6.1. Facteur rhumatoïde

L'estimation des valeurs du facteur rhumatoïde (FR) chez les rats sains, arthritiques non traités, arthritiques prétraités et arthritiques traités est présentée dans la figure 24. Les rats malades n'ayant subi aucun traitement, présentaient un taux sérique élevé en FR ($57,6 \pm 14,13$ UI/L) par rapport au témoin (8 UI/L).

L'administration préventive d'IVM, d'AVM (300 mg/Kg p.c.), d'IVH et d'AVH (60 µl/Kg p.c.) inhibent de façon significative la production de cet auto-anticorps. Le résultat le plus

important a été enregistré chez les rats recevant AVM ($9,6 \pm 3,57$ UI/L). Chez les autres groupes, les valeurs moyennes du FR variaient entre 12,8 et 22,4 UI/L.

Dans le cas où les rats recevaient les traitements le 9^{ème} jour suivant l'induction de la maladie, la réduction du taux du FR a été remarquée ($p < 0.05$) pour le diclofénac ($14,4 \pm 10,43$ UI/L) et les autres groupes. Le résultat le plus significatif a été noté pour l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* ($11,2 \pm 4,38$ UI/L).

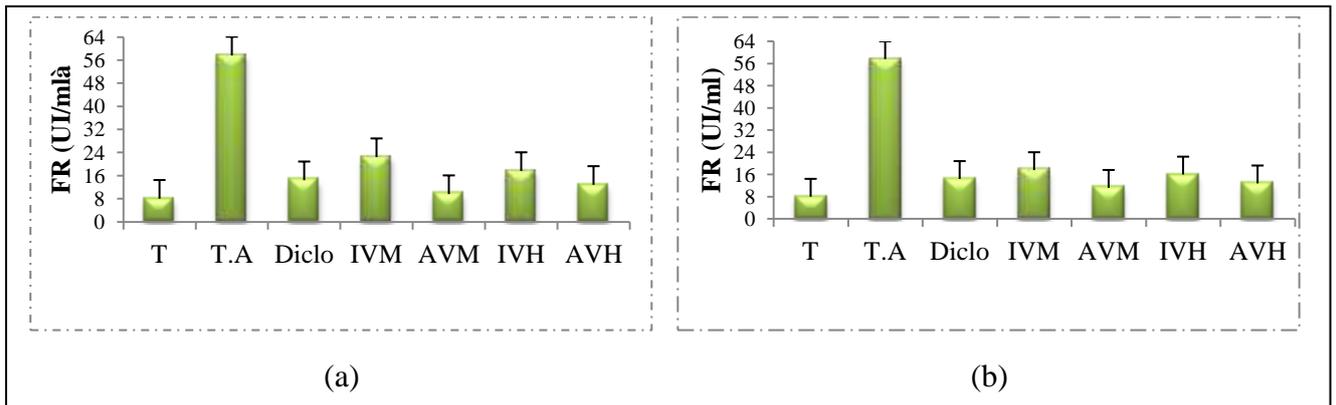


Fig.24. Valeurs de FR chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

En état physiologique normal, Le facteur rhumatoïde est transitoire et à des taux faibles. Il constitue un procédé physiologique d'élimination d'immuns complexes circulants. Dans le cas où leur titre est élevé, leur persistance traduit un processus inflammatoire chronique et un dérèglement du système immunitaire. Il a été suggéré que des titres élevés de FR peuvent prédire la détérioration de l'articulation et donc l'installation d'une arthrite rhumatoïde. En revanche, leur élévation n'est pas spécifique à la PR (Dubucquoi & Fily-Nalewajk, 2008).

III.6.2. Protéine Réactive C

Les valeurs de la CRP obtenues après 15 jours de traitement chez les différents groupes préventifs (IVM, AVM, IVH, AVH), curatifs (diclofénac, IVM, AVM, IVH, AVH) et témoins (sain, arthritique) sont exposées dans la figure suivante.

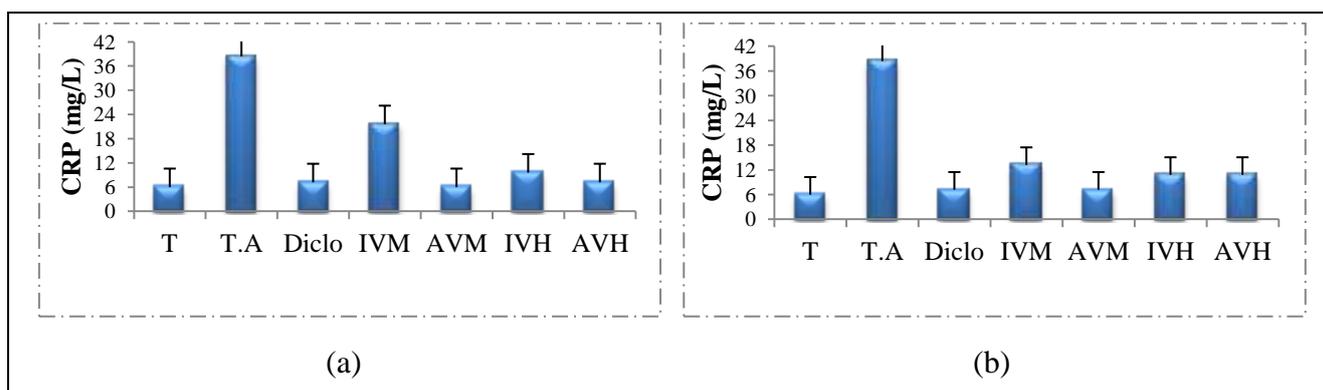


Fig.25. Valeurs de la CRP chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

La valeur moyenne normale de la CRP a été fixée à 6mg/L. Néanmoins, les rats arthritiques présentaient des valeurs plus élevées ($38,4 \pm 13,14$ mg/L).

Les prétraitements par l'extrait méthanolique et l'huile essentielle d'*A. valentinus* ont pu pratiquement stabiliser le taux de CRP (6 ± 0 mg/L, $7,2 \pm 2,68$ mg/L). Chez les rats prétraités par l'extrait méthanolique et l'huile essentielles d'*I. viscosa*, les valeurs de la CRP étaient significativement inférieures à celles du témoin arthritique ($21,6 \pm 15,64$ mg/L, $9,6 \pm 8,04$ mg/L), bien qu'elles soient supérieures à celles des extraits de la deuxième plante.

Les traitements par diclofénac et par AVM ont pu réduire de façon remarquable le taux de la CRP dans le sang (7,2 mg/L). Chez les autres groupes (IVM, IVH, AVH), les valeurs moyennes de cette protéine s'étaient entre 10,8 et 13,2 mg/L. Ces valeurs sont en effet significatives par rapport au contrôle.

L'administration des différentes préparations à titres préventif et curatif impliquent donc la régulation du taux sérique de la CRP chez les rats atteints d'une arthrite rhumatoïde.

Les niveaux de la CRP sont étroitement liés à la progression de l'inflammation en réponse à l'action de l'interleukine-6 (Nielen *et al.*, 2006). L'effet positif des extraits méthanoliques et des huiles essentielles testés peut être dû à la suppression de l'inflammation et à l'inhibition de la synthèse des médiateurs chimiques. Cet effet bénéfique concorde avec la richesse de ces substances en composés actifs et leur capacité à réduire l'œdème des pattes démontrés précédemment.

III.6.3. Phosphatase alcaline

Le dosage colorimétrique de la phosphatase alcaline (PAL) dans les sérums des rats témoins, des rats protégés et des rats post-traités par les différentes substances est affiché dans la figure 26.

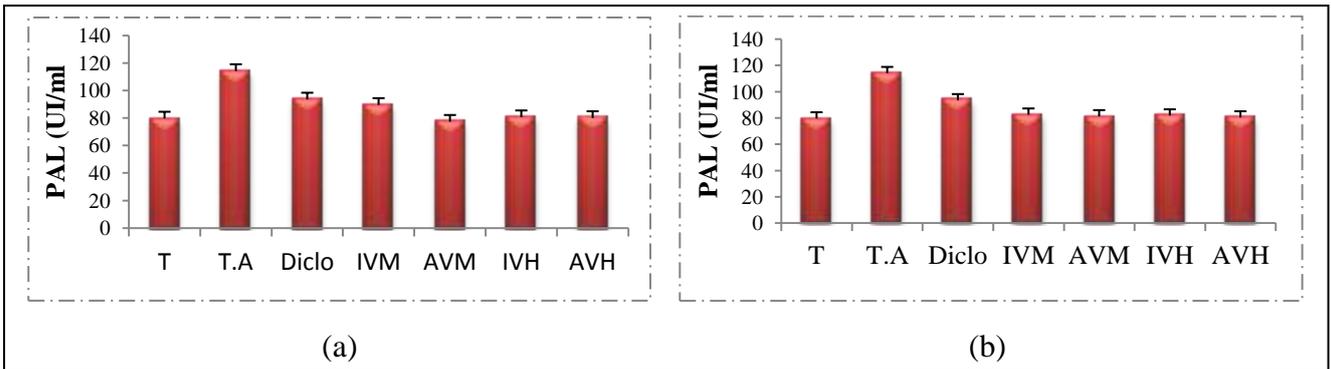


Fig.26. Valeurs de la PAL chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d’*I. viscosa* et d’*A. valentinus*

Nos résultats montrent une augmentation significative de l’activité de cette enzyme chez les rats malades ne recevant aucun traitement ($114,17 \pm 4,01$ UI/ml) par rapport aux rats témoins ($79,65 \pm 3,90$ UI/ml). Dans le cas où les extraits végétaux ont été administrés afin de prévenir l’arthrite rhumatoïde, les valeurs moyennes de la PAL ont été à $p < 0,05$ significativement inférieures à celles du contrôle arthritique et voisines du témoin sain. Nous pouvons donc suggérer que cette administration a pu prévenir l’hyperproduction de la PAL.

Le traitement par diclofénac et les extraits testés après installation de la maladie ont mené à un rétablissement de l’activité de la PAL avec des moyennes entre 80,40 et 93,55 UI/ml, notant que le taux a été élevé chez le groupe recevant le standard par rapport aux autres groupes traités.

Les PAL sont des enzymes présents dans l’organisme, mais surtout au niveau du foie, de l’os, de l’intestin, des reins et des globules blancs. La localisation cellulaire de ces enzymes leur assigne une certaine activité dans le transfert des esters phosphoriques à travers les membranes. Elles interviennent dans le l’absorption intestinale et dans le processus d’ossification (Ricklin, 2005). L’atteinte des organes précités provoque ainsi la libération des PAL (Akhtar *et al.*, 2012).

III.6.4. Aspartate aminotransférase

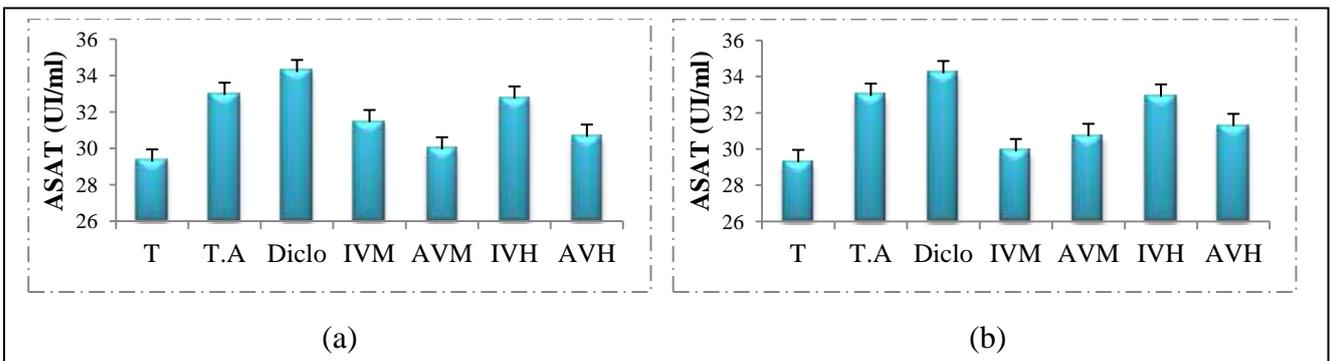


Fig.27. Valeurs de l’ASAT chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d’*I. viscosa* et d’*A. valentinus*

Le déclenchement de la PR induit une augmentation significative du taux sérique de l'ASAT ($32,94 \pm 7,72$ UI/ml), tandis que l'administration préventive et curative d'IVM, d'AVM et d'AVH présentent des valeurs proches de celles du témoin sain.

La concentration moyenne de l'ASAT chez ces groupes varie entre 29,27 et 31,26 UI/ml. En outre, chez les rats recevant IVH, l'ASAT est statistiquement élevée ($32,73 \pm 6,97$ UI/ml ; $32,89 \pm 7,08$ UI/ml) (figure 27). Le traitement par diclofénac a induit une libération remarquable de cette enzyme ($34,19 \pm 5,92$), dépassant celle déterminée chez les rats non traités.

L'ASAT est une enzyme dont la concentration est élevée dans les hépatocytes mais elle est aussi largement distribuée dans le cerveau, les reins, les muscles squelettiques et le myocarde (Sacher & McPherson, 1991). En outre, cette enzyme trouvée dans le sérum est d'origine mitochondriale et cytoplasmique. Toute augmentation peut donc être prise comme un premier signe de lésions cellulaires et de l'altération du métabolisme du rat (James *et al.*, 2010).

III.6.5. Alanine aminotransférase

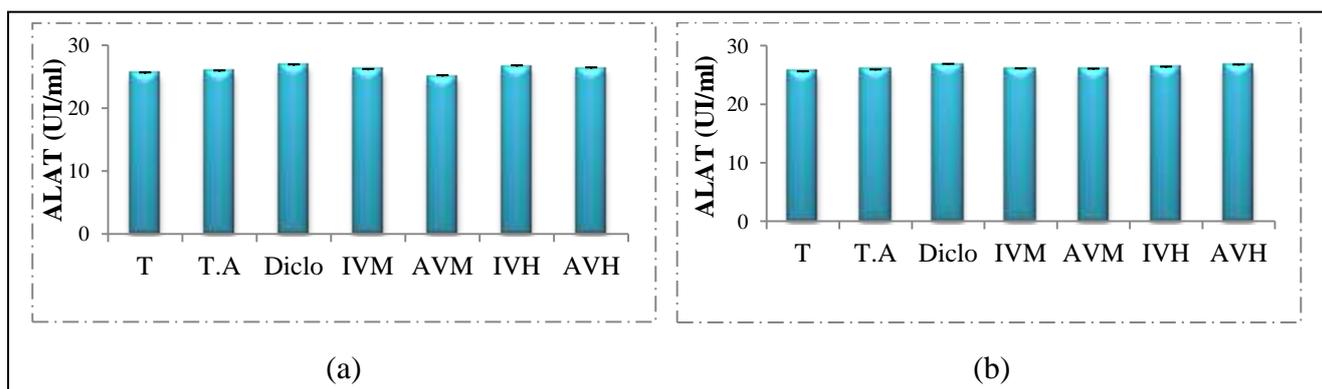


Fig.28. Valeurs de l'ALAT chez les rats témoins, les rats prétraités (a) et les rats traités (b) par le diclofénac, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*

Comme le montre cette figure, il n'y a pratiquement pas de différence dans l'activité de l'alanine aminotransférase sérique (ALAT). Le taux moyen de l'ALAT chez tous les groupes s'étend entre 25 et 25,98 UI/ml.

L'ALAT est une enzyme cytoplasmique présente à des concentrations très élevées dans le foie. Son augmentation sérique, suggère des dommages hépatocellulaires (Gad *et al.*, 2013).

En effet, plusieurs études menées sur les effets thérapeutiques des plantes médicinales contre la PR induite par CFA chez les rats, ont démontré que les taux sériques des enzymes hépatiques augmentent après immunisation (Pulla & Lokesh, 1996 ; Arafa, 2005 ; Hungl *et al.*, 2006).

Suite aux résultats deux hypothèses peuvent être établies :

- L'augmentation sérique de la PAL et de l'ASAT chez les rats atteints d'arthrite rhumatoïde indique une modification de la biochimie hépatique et donc un déséquilibre des fonctions métaboliques, l'un des effets secondaires de cette maladie.
- La stabilité de l'ALAT parallèlement à l'augmentation des autres enzymes peut refléter une fonction hépatique normale, mais des lésions au niveau de l'os résultant de l'installation de la pathologie.

III.7. Radiographie

Bien que le suivi de l'œdème, de l'indice arthritique, des organes immunitaires et des paramètres sanguins participent essentiellement au diagnostic de la PR, ils ne peuvent en effet, que prédire l'état de l'os notamment le cartilage articulaire. Néanmoins, la radiographie constitue une étape cruciale dans le suivi de cette pathologie donnant ainsi une image réelle de l'os. Les images radiographiques de l'articulation des pattes injectées par le CFA de tous les groupes des rats sont évoquées sur la figure 29.

L'articulation des rats sains (figure 29a) présente un aspect radiographique d'opacité normale. L'espace articulaire et le cartilage semblent normaux.

Il est évident à partir de ces images que les rats arthritiques (figure 29b) ont développé une réaction. Nous pouvons remarquer un espace articulaire irrégulier avec une opacité essentiellement concentrée au niveau du condyle fémoral correspondant à un cal osseux. La présence d'une gonarthrite (inflammation de l'articulation du genou), l'instabilité articulaire et la lyse du cartilage ont été également observées.

III.7.1. Radiographie des rats prétraités par les extraits végétaux

Chez les rats recevant IVM, la radiographie (figure 29d) montre une atteinte d'une gonarthrite avec une forte usure du cartilage de l'articulation du genou et une instabilité articulaire.

L'administration préventive d'AVM a donné une image radiographique d'opacité et d'un aspect bicondylien normaux. En outre, aucune lésion du cartilage n'est signalée. Cependant, une légère lyse osseuse de l'articulation fémoro-tibiale est remarquée (figure 29e).

Selon la figure 29f, une légère inflammation et une érosion du cartilage de l'articulation du genou des rats protégés par IVH ont été observées.

Malgré la petite lyse osseuse observée dans l'articulation des groupes gavés par AVH, l'espace articulaire et l'opacité radiographique sont tout à fait normaux (figure 29g).

Suite aux observations, nous pouvons noter que l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* a donné l'aspect radiographique le plus proche du témoin sain tout en préservant le cartilage. Ceci n'empêche pas que les prétraitements par IVH et AVH avaient un effet intéressant par comparaison au témoin arthritique.

III.7.2. Radiographie des rats traités par diclofénac et par les extraits végétaux

Quoique que les traitements par IVM (figure 29h) et par diclofénac (figure 29c) aient réduit l'inflammation et amélioré les fonctions métaboliques des rats, l'image radiographique de l'articulation de ces rats présentait une opacité essentiellement concentrée au niveau du condyle tibial. Une lyse du cartilage articulaire est également observée.

D'après la figure 29i, une légère lyse osseuse a été déterminée au niveau de l'articulation des rats traités par AVM. Cette articulation avait un aspect radiographique d'opacité normale en absence de toute lésion du cartilage.

Les groupes recevant IVH et AVH (figure 29j, k) montraient une gonarthrite associée à une petite usure du cartilage du genou. En outre, une opacité au niveau du condyle tibial est présente chez les rats recevant IVH.

Les traitements par IVM et par diclofénac n'ont pas amélioré l'image radiographique et donc n'avaient pas d'effets sur l'arthrite rhumatoïde. En revanche, l'administration d'AVM (300 mg/Kg), d'IVH et d'AVH (60 µl/Kg) a limité le développement de la maladie tout en préservant l'architecture osseuse, signalant que le résultat le plus important a été enregistré pour AVM.

En effet, ce résultat concorde avec les résultats précédents, où le prétraitement par AVM était le plus efficace. L'extrait méthanolique d'*A. valentinus* pourrait donc prévenir le déclenchement de la PR, mais aussi limiter son développement.

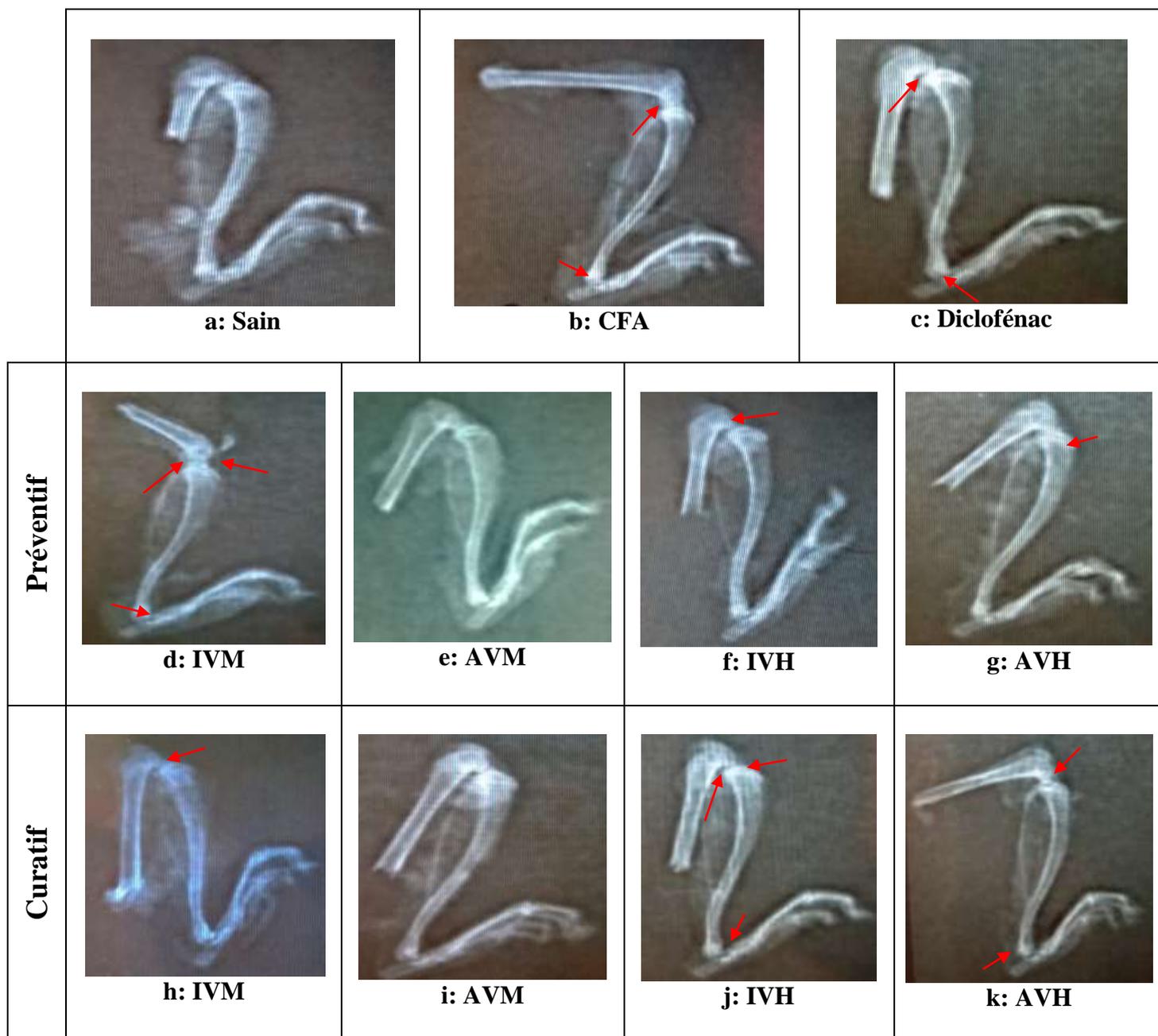


Fig.29. Images radiographiques des pattes injectées par CFA

- Les résultats de la présente approche révèlent le potentiel des extraits testés en particulier l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* à inhiber la survenue et/ ou ralentir la progression arthritique, tout en atténuant l'inflammation et en préservant les fonctions métaboliques de l'organisme. Ce potentiel peut être attribué à la diminution du taux des cytokines, du TNF- α et d'autres facteurs pro-inflammatoires.

IV. Etude de l'action analgésique centrale des extraits végétaux *in vivo*

L'évaluation de l'action antidouleur des extraits préparés par le test de tail Flick porte sur le suivi du reflexe de retraitement de la queue avant et après administration des substances. Un temps supérieur à 6 secondes révèle une action analgésique centrale morphine-like (Alaoui *et al.*, 1998). Les résultats de ce test sont illustrés dans les figures 30a et 30b.

IV.1. Evaluation de l'action analgésique des extraits méthanoliques

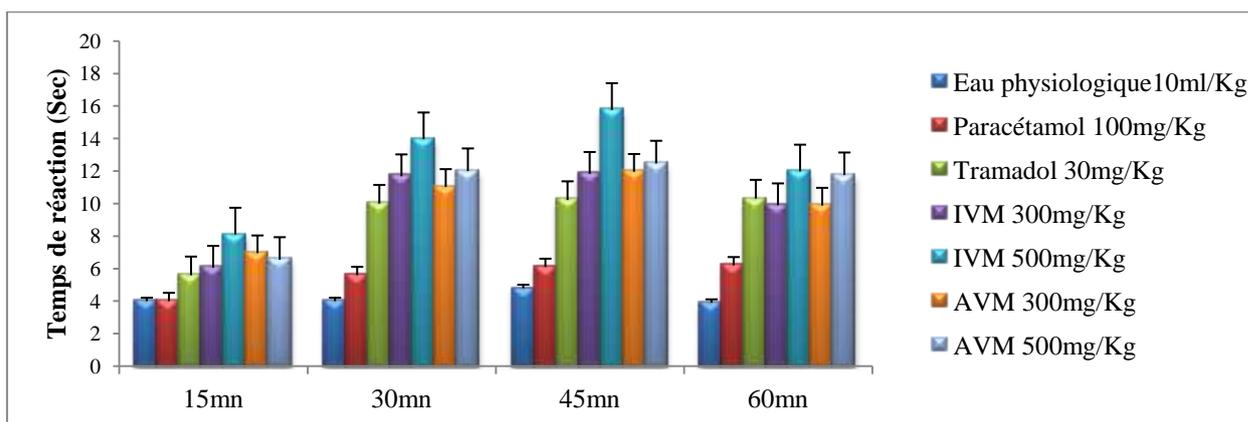


Fig.30a. Action analgésique centrale des extraits méthanoliques à 300 et 500mg/Kg

A une dose de 100 mg/kg p.c. de paracétamol, le temps maximal de réaction est de $6,20 \pm 0,02$ Sec à 60mn, ce qui reflète une légère action analgésique. Par contre, après 1h d'administration de tramadol (30mg/kg p.c.), le temps de réaction est de $10,31 \pm 0,02$ Sec. Ces résultats étaient statistiquement élevés par rapport au témoin recevant de l'eau physiologique ($4,8 \pm 0,06$ Sec).

Par comparaison aux traitements de référence, l'action inhibitrice d'IVM et d'AVM a été plus rapide et plus importante ($p < 0.05$). Le temps de réaction a dépassé 6 Sec dans les premières 15mn suivant le gavage indiquant une bonne absorption intestinale des substances. Le temps maximal de réaction a été enregistré à 45mn.

L'extrait méthanolique d'*I. viscosa* a donné à la dose de 300 mg/Kg p.c. un temps moyen de reflexe de 11,82 Sec et à la dose de 500 mg/Kg p.c. un temps plus élevé (15,76 Sec). Le seuil moyen d'inhibition d'AVM à la dose de 300 mg/Kg p.c. est de 11.96 Sec. Ce seuil est significativement élevé à la dose de 500 mg/Kg p.c. (12,47 Sec).

Du point de vu statistique, les deux extraits méthanoliques témoignent une action antinociceptive dose/temps dépendante remarquable à celle des standards.

IV.2. Evaluation de l'action analgésique des huiles essentielles

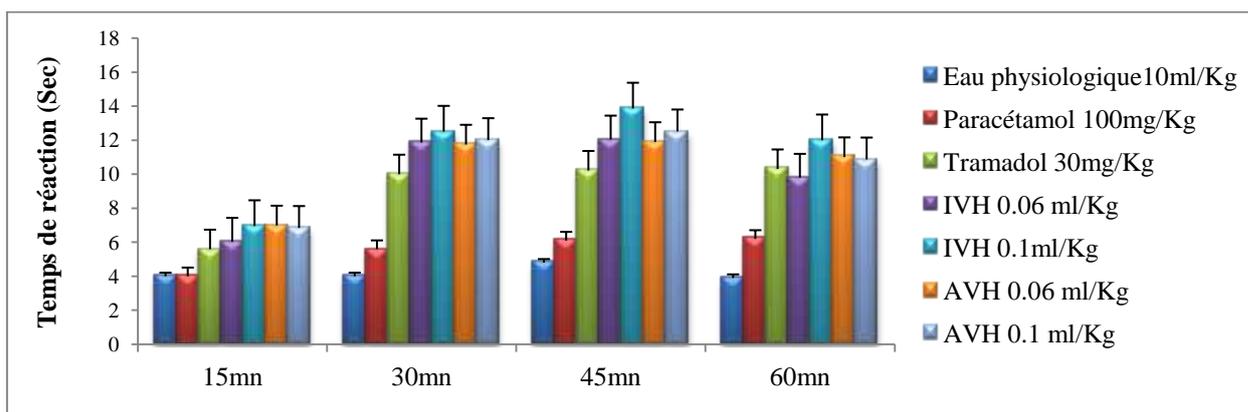


Fig. 30b. Action analgésique centrale des huiles essentielles à 0.06 et 0.1 ml/Kg

Lors du test de Tail Flick, les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* aux doses de 60 et 100 µl/kg p.c. révèlent une activité analgésique centrale comparativement au témoin.

L'action inhibitrice du paracétamol a débuté à 45 minutes alors que celle du tramadol à 30mn après gavage des rats. Cependant, dès les premières 15 mn, le temps de réaction des rats recevant les huiles essentielles a dépassé 6 Sec.

Le temps de reflexe le plus élevé a été noté à 45min pour IVH à 100 µl/kg ($13,87 \pm 0,05$), suivi d'AVH à 100µl/kg ($12,52 \pm 0,02$), IVH à 60 µl/kg ($12,05 \pm 0,03$), et AVH à 60 µl/kg ($11,9 \pm 0,03$). Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée entre ces groupes.

IV.3. Pourcentage d'analgésie des extraits méthanolique et des huiles essentielles

En se référant au tableau 13, nous remarquons que le pourcentage de protection le plus élevé est déterminé chez les rats recevant 500 mg/Kg p.c. d'IVM (83%). Pour les autres groupes, l'analgésie varie entre 58,58 et 70,9%. Il est clair donc que les quatre extraits sont plus actifs que les traitements de référence.

Le faible pourcentage enregistré chez le groupe recevant du paracétamol s'explique par le fait que son action débute à 45 mn et que ce traitement est un antalgique périphérique.

Tab.13. Pourcentage d'analgésie des traitements de référence et des extraits végétaux

Groupes		Pourcentage d'analgésie (%)
Standards	Paracétamol	13,33
	Tramadol	50
IVM	300mg/Kg	64
	500mg/Kg	83
AVM	300mg/Kg	58,58
	500mg/Kg	66,66
IVH	0.06ml/Kg	65,58
	0.1ml/Kg	70,9
AVH	0.06ml/Kg	64,58
	0.1ml/Kg	66,75

La douleur est généralement associée à l'inflammation comme un processus secondaire résultant de la libération de médiateurs algiques comme les kinines, les produits de la cyclooxygénase et les cytokines (Queiroz *et al.*, 2010).

L'effet antinociceptif des extraits méthanoliques et des huiles essentielles des deux plantes pourrait être attribué à leur composition. Les flavonoïdes et les terpènes sont aptes à traverser la barrière hémato-encéphalique et contrôler la douleur. L'effet antalgique s'exerce principalement par un mécanisme central en stimulant les sous récepteurs aux opioïdes (μ , δ et κ) et par l'inhibition des enzymes de l'inflammation (Hoodgar *et al.*, 2010 ; Parvin *et al.*, 2012).

Les plantes appartenant à la famille des *Asteraceae* sont connues par leur pouvoir antalgique périphérique et central. Citant comme exemple *I. racemosa* (Arumugam *et al.*, 2012), *Matricaria aurea* (Qnais, 2011) et *Ageratum fastigiatum* (Glauciemar *et al.*, 2009).

- Le potentiel analgésique central révélé pour les extraits méthanoliques et les huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus* influe positivement sur leur pouvoir antiarthritique, puisque la douleur est l'un des principaux symptômes de cette pathologie.

V. Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux *in vitro*

Après avoir réalisé des tests préliminaires sur gélose, l'activité antibactérienne des extraits préparés a été mesurée en utilisant la technique de dilution sur microplaque. La variation du nombre des survivants au cours du temps, illustrée sur les figures 30 (a, b), nous a amené à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

Il est à signaler que les témoins testés (eau, méthanol, DMSO et cyclohexane) n'ont aucun effet néfaste sur les bactéries étudiées. Toute action inhibitrice observée est donc due aux substances actives contenues dans les extraits.

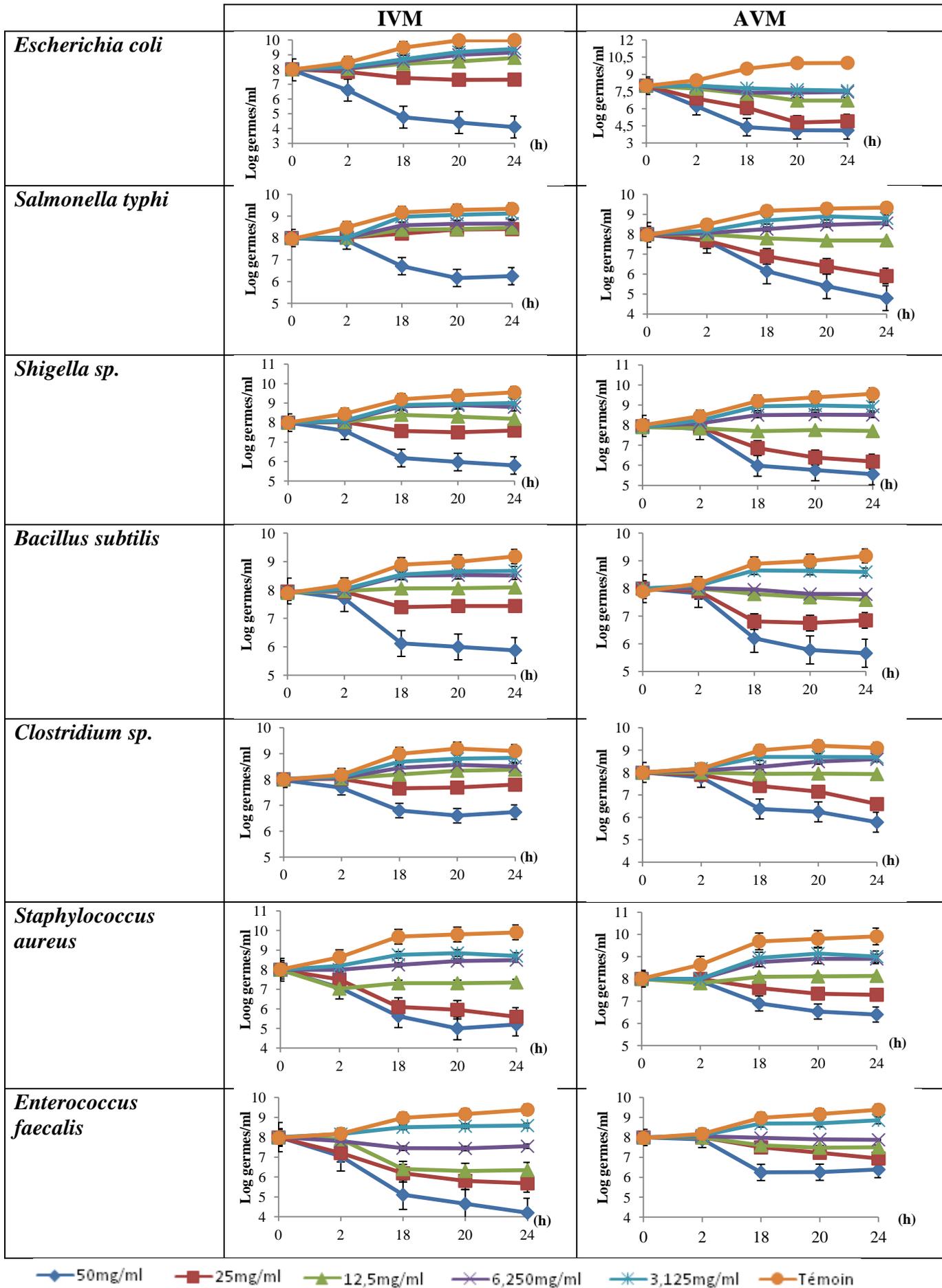
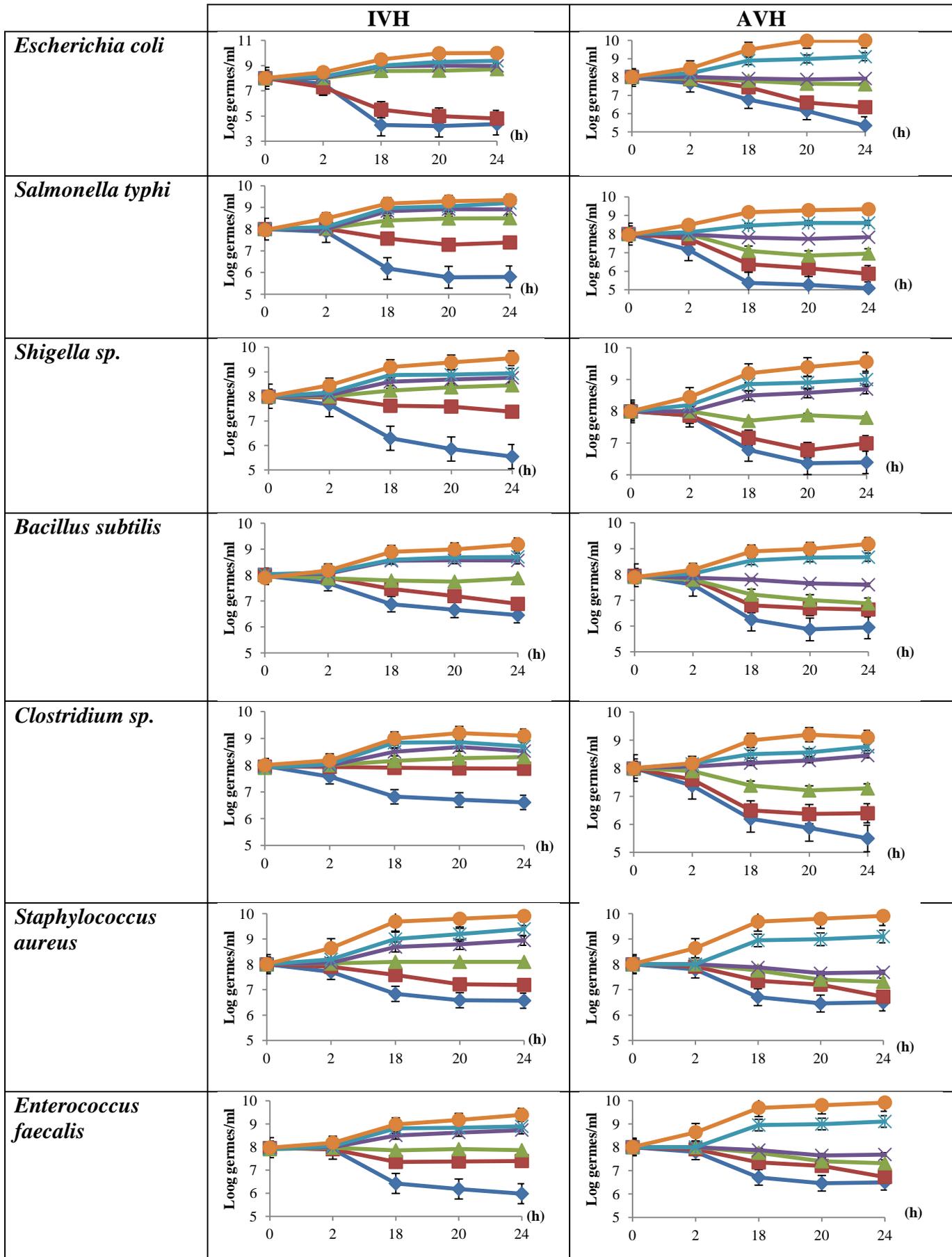


Fig. 31a. Cinétique de croissance des bactéries testées en présence d'IVM et d'AVM



◆ 250µl/ml ■ 125µl/ml ▲ 62,5µl/ml ✕ 31,25µl/ml * 15,625µl/ml ● Témoins

Fig. 31b. Cinétique de croissance des bactéries testées en présence d'IVH et d'AVH

V.1. Détermination de la CMI

Les valeurs de la CMI des composés phénoliques et des huiles essentielles extraits des feuilles d'*I. viscosa* et de la partie aérienne d'*A. valentinus* sont présentées dans le tableau 14.

Tab.14. Concentrations minimales inhibitrices des extraits végétaux

	Extraits méthanoliques mg/ml		Huiles essentielles µl/ml	
	IVM	AVM	IVH	AVH
<i>E. coli</i>	25	3,125	125	31,25
<i>S. typhi</i>	50	12,50	125	31,25
<i>Shigella sp.</i>	25	12,50	125	62,50
<i>B. subtilis</i>	25	6,25	62,50	31,25
<i>Clostridium sp.</i>	25	12,50	125	62,50
<i>St. aureus</i>	12,50	12,50	62,50	31,25
<i>En. faecalis</i>	6,25	6,25	62,50	62,50

En se référant au tableau, il ressort qu'IVM est plus actif sur les bactéries à Gram+, où les CMI étaient plus faibles par rapport à celles décelées chez les bactéries à G-. Cet effet a été également déterminé par Laghrifi *et al.* (2013) et par Abuhamdahet *et al.* (2013). En revanche, ces derniers ont trouvé des valeurs plus faibles que les nôtres.

En ce qui concerne AVM, le type bactérien n'a pas influé sur le degré de son activité. Les valeurs de la CMI étaient inférieures à celles d'IVM, s'étendant entre 3,125 et 12,50 mg/ml. Selles *et al.* (2013), dans leur étude sur l'effet d'*A. pyrethrum* contre *S. aureus* et *E. coli* ont trouvé des concentrations inhibitrices supérieures. Dans une autre étude sur la même espèce, les valeurs de la CMI étaient également supérieures à celles que nous avons enregistrées (Subasri & Ahmed John, 2016).

Des concentrations minimales inhibitrices de 125 et de 62,50 µl/ml en IVH ont été évaluées pour l'inhibition de l'ensemble des souches. Pareillement à IVM, IVH s'est avérée plus active contre les bactéries à G+ ce qui est en concordance avec d'autres résultats (Kheyar *et al.*, 2014). En revanche, dans l'étude réalisée par Berhail Boudouda (2014), l'huile essentielle d'*I. viscosa* a montré une activité plus importante sur les bactéries à G-. Cette sélectivité d'action pourrait être

attribuée à la présence d'acide linoléique qui s'oppose à la croissance des bactéries à G+ en inhibant la synthèse du métabolisme intermédiaire de ces bactéries (Zheng *et al.*, 2005).

Concernant les huiles essentielles, AVH a montré une bonne susceptibilité contre les sept souches bactériennes. Les CMI sont comprises entre 31,25 et 62,50 µl/ml.

En effet, plusieurs travaux (Souza *et al.*, 2006a ; Bari *et al.*, 2010 ; Derwich *et al.*, 2010) ont confirmé la résistance des bactéries à G- par rapport aux bactéries à G+. Ce constat pourrait être lié à la présence des lypopolysaccharides chez les bactéries à G-, mais aussi à la perméabilité des principes actifs (Abdul Rahman *et al.*, 2010).

V.2. Détermination de la CMB et le rapport CMB/CMI

Les résultats de l'évaluation des effets bactéricides des extraits végétaux sont repris ci-dessous (tableau 15). Dans ce tableau sont incluses d'une part les concentrations minimales bactéricides (mg/ml, µl/ml) de l'ensemble des extraits et d'autre part les valeurs du rapport entre la CMB et la CMI.

Tab.15. Concentrations minimales bactéricides des extraits végétaux et rapport CMB/CMI

	CMB (mg/ml, µl/ml)				Rapport CMB/CMI			
	Extraits méthanoliques		Huiles essentielles		Extraits méthanoliques		Huiles essentielles	
	IVM	AVM	IVH	AVH	IVM	AVM	IVH	AVH
<i>E. coli</i>	50	25	125	250	2	8	1	8
<i>S. typhi</i>	50	25	250	125	1	2	2	4
<i>Shigella sp.</i>	50	25	250	125	2	2	2	2
<i>B. subtilis</i>	50	50	250	62.50	2	8	4	2
<i>Clostridium sp.</i>	50	50	250	125	2	4	2	2
<i>St. aureus</i>	50	50	250	125	4	4	4	4
<i>En. faecalis</i>	25	50	250	250	4	8	4	4

Sur l'ensemble des souches, une concentration de 50 mg/ml d'IVM est capable de tuer plus de 90% de la population bactérienne initiale.

A propos d'AVM, les CMB varient entre 25mg/ml contre les bactéries à G- (entérobactéries) et 50 mg/ml contre les bactéries G+.

L'activité bactéricide de l'huile essentielle d'*I. viscosa* a été évaluée à une concentration de 250 µl/ml, une exception pour *E. coli*, où la CMB était de 125 µl/ml.

Les CMB enregistrées pour AVH étaient de 125 µl/ml contre la plupart des souches. En outre, *B. subtilis* a montré une sensibilité accrue à cette huile où la CMB voire même la CMI étaient les plus faibles.

Suite au tableau 15 et étant donné que le rapport CMB/CMI n'excède pas 32 pour la totalité des essais, nous pouvons conclure que les bactéries testées ne présentent pas une tolérance aux extraits méthanoliques et aux huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*.

Les valeurs de la CMB étaient plus proches de celles des CMI pour tous les extraits. D'après Canillac & Mourey (2001), lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4, l'agent antibactérien est considéré comme bactéricide. Nous constatons que l'action de l'extrait méthanolique et l'huile essentielles d'*I. viscosa* est bactéricidique.

Cependant, pour *A. valentinus*, l'action varie. Sur la totalité des souches, AVM possède une action statique sur trois souches (*E. coli*, *B. subtilis* et *Enterococcus faecalis*) et une action bactéricide contre le reste des bactéries (*S. typhi*, *Shigella sp.*, *Clostridium sp.* et *S. aureus*). A l'exception d'*E. coli*, AVH est bactéricide.

L'activité biologique des extraits végétaux contre les bactéries testées peut être attribuée à leur propriétés physicochimiques et à la présence des flavonoïdes; des acides phénoliques et des terpénoïdes (Laghrifi *et al.*, 2013).

L'action des principes actifs contenus dans les extraits étudiés pourrait être expliquée par le fait qu'ils sont capables de franchir la paroi bactérienne et se fixer sur certaines protéines et enzymes, modifiant ainsi leur équilibre et induisant la lyse cellulaire (Burt & Rinders, 2003).

VI. Etude des interactions entre les extraits et les antibiotiques (FIC)

La possibilité d'interactions synergiques entre les extraits et entre ces derniers et les antibiotiques a été évaluée chez trois souches *E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus*.

VI.1. Test de synergie

Les interactions synergiques entre deux agents signifient que leur effet combiné est plus fort que la somme des effets des agents individuels.

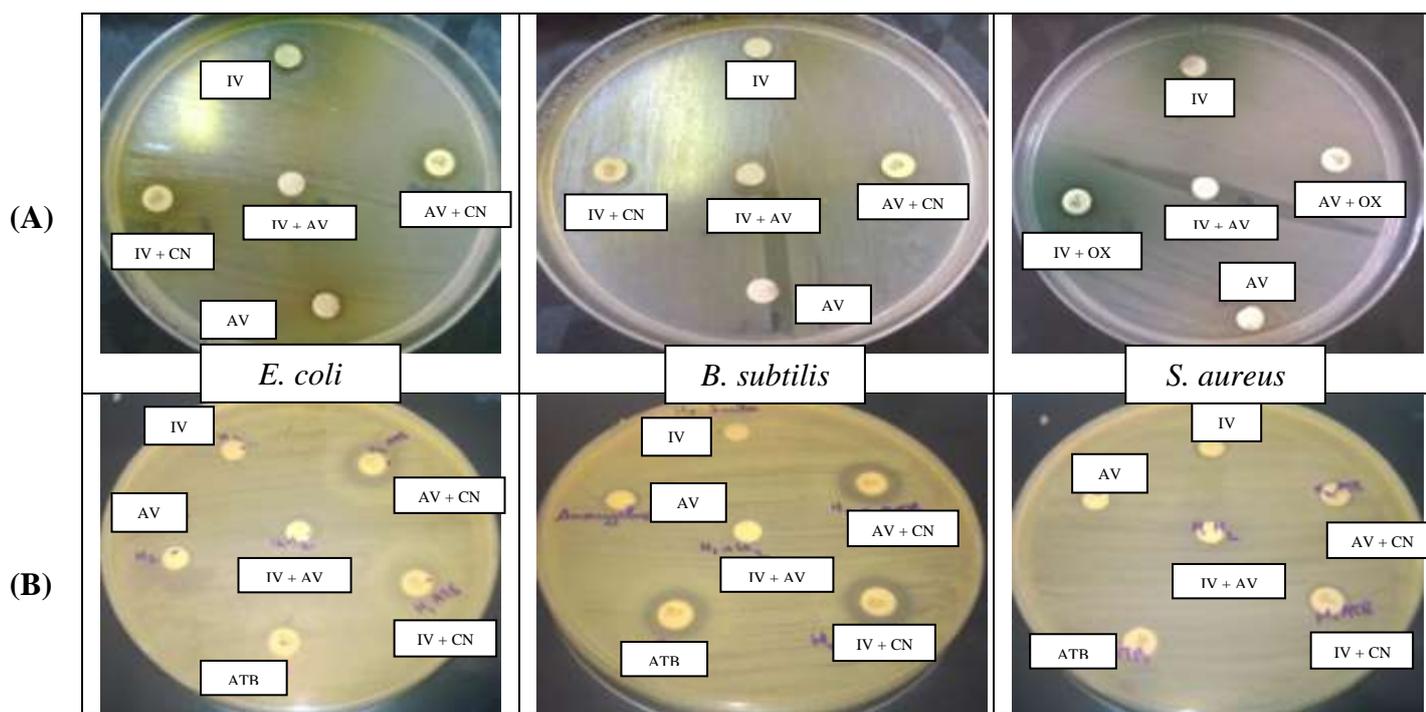


Fig.32. Zones d’inhibition (mm) des agents antibactériens seuls et en combinaison (A): extraits méthanoliques, (B): huiles essentielles

Lorsque nous avons ajouté les extraits méthanoliques et les huiles essentielles aux antibiotiques, le diamètre des zones d’inhibition a généralement augmenté pour toutes les combinaisons sur toutes les souches.

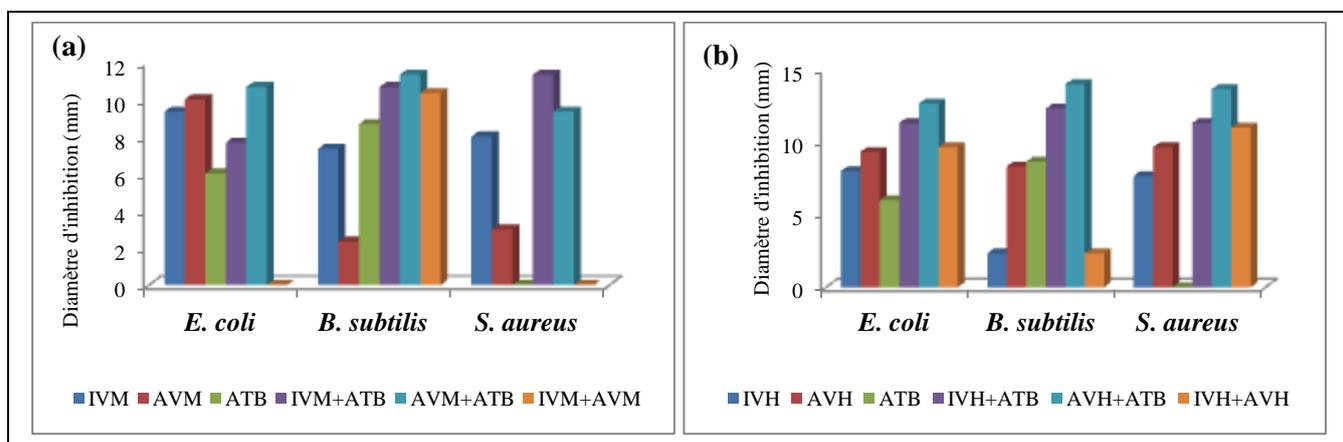


Fig.33. Diamètre de la zone d’inhibition (mm) des agents antibactériens seuls et en combinaison (a): extraits méthanoliques, (b): huiles essentielles

▪ **Sur *E. coli***

L’exposition d’*E. coli* à la gentamicine forme une zone d’inhibition moyenne de 6 mm de diamètre, alors que les mélanges IVM+CN, AVM+CN ont donné des diamètres respectifs de $10,66 \pm 1,15$ et $11,33 \pm 0,57$ mm.

Des zones de $11,33 \pm 1,52$ et de $12,66 \pm 1,52$ mm de diamètres ont été formées suite à l'action d'IVH + CN et d'AVH+CN.

- **Sur *B. subtilis***

Les associations ont généré des zones d'inhibition plus élevées par rapport à celles de chaque agent seul. Le diamètre le plus élevé a été noté pour la combinaison AVH+CN avec une valeur de $14 \pm 1,52$ mm.

- **Sur *S.aureus***

Cette bactérie est totalement résistante à l'oxacilline. Cependant l'addition des extraits méthanoliques et des huiles essentielles a modifié l'effet tout en augmentant les zones autour des disques. Les valeurs moyennes des diamètres varient entre 9,33 et 13,66 mm.

A propos des combinaisons entre les extraits méthanoliques des deux plantes, les résultats n'étaient pas encourageants. Ces associations n'avaient pratiquement pas d'effets contre *E. coli* et *S. aureus*. En plus, les associations entre les deux huiles essentielles augmenteraient légèrement les diamètres d'inhibition contre *E. coli* et *S. aureus*.

Les résultats où le diamètre des zones d'inhibition diminue pourraient être à l'origine d'un antagonisme. Lorsque le diamètre augmente, la combinaison pourrait correspondre à une synergie ou une addition, mais également une indifférence. Cependant, le test de synergie sur gélose n'est que qualitatif (Jouda, 2013).

VI.2. Détermination des interactions fractionnaires inhibitrices

Une étude qui vient compléter la précédente est de mesurer les valeurs de CMI des agents antibactériens en association et de les comparer aux valeurs de CMI de ces agents seuls. C'est ainsi que le calcul des concentrations fractionnaires inhibitrices permet de juger si ces associations sont synergiques, additives, indifférentes ou antagoniques (tableaux 16 a, b, c).

Tab.16a. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur *E. coli*

<i>Escherichia coli</i>					
Combinaisons	CMI individuelles	CMI En combinaison	FIC Individuelles	Index de FIC (FICI)	Interprétation
IVM/ATB	25/250	0,78/31,25	0,03/0,125	0,155	Synergie
AVM/ATB	3,125/250	0,048/15,62	0,02/0,06	0,080	Synergie
IVM/AVM	25/3,125	50/12,5	2/4	6	Antagonisme
IVH/ATB	125/250	3,90/7,812	0,03/0,03	0,060	Synergie
AVH/ATB	31,25/250	1,95/1,95	0,06/0,07	0,067	Synergie
IVH/AVH	125/31,25	3,90/1,95	0,03/0,06	0,090	Synergie

Au regard des valeurs de FICI ci-dessus, toutes les combinaisons sauf IVM/AVM ont une interaction synergique sur *E. coli*. Les meilleures valeurs de FICI soit 0,060 et 0,067, sont obtenues avec les combinaisons IVH/ATB et AVH/ATB.

Sur la bactérie *B. subtilis*, les résultats conciliés dans le tableau 16b montrent quatre interactions synergiques avec des valeurs de FIC voisines de 0,30 pour les combinaisons IVM/ATB et AVM/ATB et des valeurs de 0,09 pour IVH/ATB et AVH/ATB. L'action de l'association entre les extraits était indifférente, alors que celle des huiles essentielles était antagonique.

Tab.16b. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur *B. subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>					
Combinaisons	CMI individuelles	CMI En combinaison	FIC Individuelles	Index de FIC (FICI)	Interprétation
IVM/ATB	25/62,50	1,562/15,62	0,06/0,24	0,30	Synergie
AVM/ATB	6,25/62,50	0,78/15,62	0,12/0,24	0,36	Synergie
IVM/AVM	25/6,25	12,50/12,50	0,5/2	2,50	Indifférence
IVH/ATB	62,50/62,50	1,95/3,90	0,03/0,06	0,09	Synergie
AVH/ATB	31,25/62,50	1,95/1,95	0,06/0,03	0,09	Synergie
IVH/AVH	62,50/31,25	15,62/250	0,24/8	8,24	Antagonisme

Sur *S. aureus* (tableau 16c), le meilleur FICI soit 0,09 étant obtenu avec l'association IVH/AVH ; la seule action synergique révélée. Les combinaisons entre l'extrait méthanolique et l'huile essentielle d'*I. viscosa* avec l'oxacilline ont donné des interactions additives. En revanche, l'addition de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle d'*A. valentinus* à

l'antibiotique n'a pas changé l'effet. A une valeur de FICI égale à 9, la combinaison IVM/AVM était jugée antagonique.

Tab.16c. CMI, FICI et interprétations des combinaisons sur *S. aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Combinaisons	CMI individuelles	CMI En combinaison	FIC Individuelles	Index de FIC (FICI)	Interprétation
IVM/ATB	12,50/250	6,25/31,25	0,5/0,125	0,62	Addition
AVM/ATB	12,50/250	12,50/31,25	1/0,125	1,125	Indifférence
IVM/AVM	12,50/12,50	50/62,50	4/5	9	Antagonisme
IVH/ATB	62,50/250	3,90/250	0,06/1	1,06	Addition
AVH/ATB	31,25/250	62,50/1,95	2/0,007	2,007	Indifférence
IVH/AVH	62,50/31,25	1,95/1,95	0,03/0,06	0,09	Synergie

Les cibles métaboliques des molécules d'un genre étant probablement différentes de celles de l'autre genre. L'attaque de plusieurs cibles métaboliques à la fois dans les combinaisons rendrait plus vulnérable la bactérie d'où l'action synergique (van Vuuren & Viljoen, 2011). Les principes actifs des plantes sont soupçonnés de perturber la perméabilité de la membrane cytoplasmique et donc faciliter l'afflux d'antibiotiques (Burt et Rinders, 2003).

La valeur thérapeutique des interactions synergiques est connue depuis l'antiquité et plusieurs méthodes de traitements traditionnels se sont basées sur le fait que la combinaison thérapeutique pourrait augmenter l'efficacité. Cette même croyance a été scientifiquement prouvée, notamment l'association amoxicilline-acide clavulanique (van Vuuren & Viljoen, 2011 ; Inui *et al.*, 2007).

Il n'existe à notre connaissance aucune publication sur les interactions entre les plantes étudiées et les antibiotiques. Toutefois, d'autres auteurs ont montré que les combinaisons d'extraits à base de plantes médicinales ont des effets potentialisateurs de l'activité antibactérienne des antibiotiques (Olufunmiso & Anthony, 2012 ; Olgica & Ljiljana 2012).

- Les résultats présentés dans ce travail montrent le potentiel antibactérien des polyphénols et des huiles essentielles d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*.
- Les extraits végétaux ont également montré une action antibactérienne indirecte comme une source modifiant la résistance aux antibiotiques.

*Conclusion générale et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et la recherche des activités biologiques de deux espèces médicinales algériennes de la famille des *Asteraceae* : *Inula viscosa* L. et *Anacyclus valentinus* L. Ces plantes sont connues pour leurs multiples effets et traditionnellement utilisées pour traiter les affections courantes. L'objectif principal était d'évaluer la capacité des extraits méthanoliques et des huiles essentielles des deux plantes afin de restaurer et/ou de limiter les destructions du cartilage articulaire. Nous avons choisi comme pathologie : l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant complet de Freund (CFA) chez les rats Wistar. Nous avons également dépisté d'autres activités : analgésique centrale et antibactérienne.

A cet effet, nous avons effectué une quantification et une identification des constituants contenus dans les métabolites secondaires des deux espèces citées. En effet, la caractérisation phytochimique des feuilles d'*I. viscosa* a dégagé la présence des acides phénoliques, des flavonoïdes principalement de type flavonol et des lactones sesquiterpéniques. Quant à *A. valentinus*, la partie aérienne de cette plante est très riche en flavonoïdes de différentes classes. L'identification des huiles essentielles des deux plantes par GC-MS a mis en évidence la prédominance des composés terpéniques.

Par la suite, nous avons confirmé que les quatre extraits ne détiennent aucune toxicité aigue par voie orale. Le suivi clinique et biologique des rats malades a montré que les extraits agissent variablement et positivement sur l'inflammation, la récupération pondérale y compris l'absorption intestinale et le fonctionnement des organes internes et immunitaires. Toutefois, l'évaluation radiographique a révélé que l'extrait méthanolique d'*I. viscosa* (IVM) n'a indiqué aucune amélioration du cartilage, tandis que les huiles essentielles des deux plantes (IVH, AVH) ont ralenti ou limité l'usure de ce tissu. En contrepartie, l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* (AVM) a inhibé l'érosion du cartilage sur le plan préventif et l'a restauré sur le plan curatif.

Une étape complémentaire à celle précédente, est l'évaluation de l'action analgésique centrale des extraits par le test de Tail-Flick. Toutes les substances testées ont présenté une activité puissante par rapport à celle du paracétamol (antalgique de premier palier) et à celle du tramadol (antalgique de deuxième palier). Cette capacité à apaiser les douleurs constitue donc une addition aux effets positifs décelés sur l'arthrite rhumatoïde.

Le criblage antibactérien *in vitro* des substances testées sur *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sp.*, *B. subtilis*, *Clostridium sp.*, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis* a permis de déterminer que ces substances possèdent une action bactéricide contre la plupart des souches. Cependant, *I. viscosa* (IVM, IVH) a marqué une spécificité d'action sur les bactéries à G+.

Comme possibilité de modifier les résistances bactériennes aux antibiotiques, le criblage antibactérien a été suivi par une évaluation de l'association entre les différents extraits et les antibiotiques sur *E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus*. Les interactions étaient pour la plupart des combinaisons synergiques. Ces résultats demeurent donc prometteurs.

Bien que l'ensemble des résultats obtenus nous aient permis de contribuer à la valorisation d'*I. viscosa* et d'*A. valentinus*, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- L'isolement des principes actifs et l'étude de leurs effets isolément ;
- Etude approfondie de la toxicité ;
- Etude des mécanismes d'action et des facteurs influençant l'efficacité des extraits ;
- Evaluation de l'interaction entre ces extraits et d'autres agents synthétiques, notamment les anti-inflammatoires ;

Références bibliographiques

- Aalto-Korte K., Alanko K., Kuuliala O., Jolanki R. (2007).** Late reactions in patch tests: a year review from a clinic of occupational dermatology. *Contact Dermatitis*; 56: 81–86.
- Ababsa Z (2009).** Caractérisation Pharmacotoxicologique et Etude Phytochimique De *Centaurea Dimorpha*. Thèse de Magistère. *Université Mentouri* (Constantine, Algérie).
- Abdel-Moein N.M., Abdel-Moniem E.A., Mohamed D.A. and Hanfy E.A. (2011).** Evaluation of the anti-inflammatory and anti-arthritic effects of some plant extracts. *grasas y aceites*, 62 (4). 365-374.
- Aberer W.(2008).** Contact allergy and medicinal herbs. *Journal of the German Society of Dermatology* 6, 15–24.
- Abuhamdah Sawsan, Abuhamdah Rushdie, Al-Olimat Suleiman and Chazot Paul (2013).** Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan. *European Journal of Medicinal Plants* 3(3): 394-404.
- Abu-Qatouseh Luay F., Hanane Boutennoune, Lilia Boussouf, Khodir Madani, Penelope Shihab, Khaled Al-Qaoud. (2013).** In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to urease inhibitory effects of polyphenolic extracts of local herbs from Algeria. *The international arabic journal of antimicrobial agents*. Vol. 3 No. 4:4. 1 – 9.
- Abu Reidah Ibrahim M. (2013).** Characterization of phenolic compounds in highly consumed vegetable matrices by using advanced analytical techniques. Doctoral thesis. Department of analytical Chemistry, Faculty of SCIENCES; University of Granada. Spain.
- Abdul Rahman M.S., Thangaraj S., Salique S.M., Khan K.F. and Natheer S.E. (2010).** Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. *Internet Journal of Food Safety*, Vol.12, pp. 71-75.
- Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1998).** *J.Agric, Food Chem*, Vol 146: 1739-1745.
- Adnane M. Et Arbaoui A. (2008).** Etude de l'effet de l'extrait aqueux de l'*Anacyclus valentinus* L.
- AFNOR : Association Française de Normalisation (1986).** "Huiles essentielles", Paris. NF T 75-006
- AFNOR (2000).** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé AFSSAPS (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.
- Akhtar A., Deshmukh A.A., Raut C.G., Somkuwar A.P., & Bhagat S.S. (2012).** Prallethrin induced serum biochemical changes in Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 160-168.

- Alam M., Galav V. (2013).** Anti-inflammatory effect and toxicological evaluation of thymoquinone (volatile oil of black seed) on adjuvant-induced
- Alaoui, K., Lagorge J.F., Cherrah Y., Hassar M., Amarouch H., Roquebert J. (1998).** Activité Analgésique Et Anti-Inflammatoire Des Saponines D'*argania Spinosa*. Annale Pharmaceutiques Françaises ; 1998 ; Vol 56 ; Pp : 220- 228.
- Al-Dissi, N.M., Salhab, A.S., Al-Hajj, H.A. (2001).** Effects of *inula viscosa* leaf extract on abortion and implantation in rats. Journal of Ethnopharmacology **77**: 117–121.
- Aliboudhar Hamza & Tigrine-Kordjani Nacéra (2014).** Effect of extraction technique on the content and antioxidant activity of crude extract of *Anacyclus clavatus* flowers and their essential oil composition. Natural Product Research, Taylor & Francis Group.
- Allabouch Hafsa (2006).** Réparation des lésions traumatiques du cartilage articulaire. Thèse de Doctorat en Médecine. Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca, Université Hassan II, Maroc.
- Almança C. C.J., Saldanhab S.V., Sousaa D. R., Trivilin L. O., Nunesa L. C., Porfírio L.C., Marinhoc B. G. (2011).** Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. In mice. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 508– 512.
- Al namer R.M.M. (2014).** Valorisation pharmacologique de *Rosmarinus officinalis* et de *Lavandula officinalis*: toxicité aiguë, potentiel psychotrope et antibactérien. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences, Université Mohamed V AGDAL. Rabat, Maroc. P 51.
- arthritis in wistar rat. *Indian J.L.Sci.*2(2) : 17-22.
- Al-Nahain A., Jahan R. And Rahmatullah M. (2014).** *Zingiber officinale*: A Potential Plant against Rheumatoid Arthritis. *Arthritis*. Article ID 159089, 8 pages
- Al –Sobarry M., Alwashli A., Cherrah Y., Alaoui K. (2013).** Toxicité aiguë et action analgésique d'extrait éthanolique des feuilles d'*Aloe perryi*, plante endémique du Yémen. *Phytothérapie*. 11:17-21.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 (1), 141-148.
- Amorim M .H.R., Gil-Da-Costa R.M., Lopes C., Bastos M.M.S.M. (2013).** Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews Toxicology* 43, 559– 579.
- Andersson A.K., Li C., Brennan F.M. (2008).** Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*10 (2). p.204
- Andjelkovic M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., et al. (2006).** Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. 98: 23–31.

- Arafa H.M. (2005).** Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Med Sci Monit*, 11 (7): 228-234.
- Arnason J.T., Philogène B.J.R et Morand P. (1989).** Insecticides of Plants origin (ACS symposium series 387), American Chemical Society, Washington.
- Arumugam P., Murugan M. and Thangaraj N. (2012).** Evaluation of anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract obtained from root powder of *Inula racemosa* Hook. f. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(14), pp. 2801 - 2806.
- Bahmani Mahmoud, Shirzad Hedayatollah, Majlesi Maedeh et al. (2014).** A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*; 7(Suppl 1): S43-S53
- Bailleta A., Cornech D., et al. (2011).** Intérêt de la triple association méthotrexate, salazopyrine et hydroxychloroquine dans la polyarthrite rhumatoïde : analyse systématique de la littérature. *Rev Rhum*, 78 : 19-25.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol*. 46: 446-475.
- Bang S.Y., Lee K.H., Cho S.K., Lee H.S., Lee K.W., Bae S.C. (2010).** Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DBR1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum*. 62, (2), p.369-377
- Bannwarth B., Pehourcq F. (2003).** Pharmacological rationale for the clinical use of paracetamol : pharmacokinetic and pharmacodynamic issues. *Drugs*. 63 (2) : 5-13.
- Bardin T., Orcel P. et al. (2007).** *Traité de thérapeutique rhumatologique*. 2ème édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 760p
- Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A. (2010).** Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, 12: pp. 386-390.
- Bauerova K. & bezek A. (1999).** Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol biophys* 1999; 18: 15–20
- Bayer R.J., Starr J.R. (1998).** Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non coding chloroplast sequences. 85, 242-256.
- Belaiche P. (1979).** *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine.
- Bellakhdar J. (1997).** *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires* - Saint -Etienne, Edit. Ibis Press.
- Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. (2006).** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149.
- Benayache S., Banayache F., Dendoughi H. and Jay M. (1991).** Les Favomoïdes de *Inula viscosa* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome 25, n° 4 .p 170-176

- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, JM., Bernardini, J.F., Costa, J. (2007).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction : Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106, 132-139.
- Bengana B., Slimani S., Hachemi B. (2014).** Etiopathogénie de la polyarthrite rhumatoïde. *Batna J Med Sci.* 1:8-11.
- Benitez G., Gonzalez-Tejero M.R. and Molero-Mesa J. (2010).** Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J. Ethnopharm.*, 129: 87–105.
- Benkhniq O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. & Douira A. (2010).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53: 191-216.
- Benkhniq O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. & Douira A. (2010).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 2010; 53: 191-216.
- Bergaoui, A., Sakka, R.L., Benjannet, H., Ben Halima, K.M et Mighri, Z (a) (2006).** Activités antibactériennes, anti-insectes et composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de la plante *Anacyclus cyrtolepidioides* Poussant en Tunisie. International Symposium on Perfume, Aromatic and Medicinal Plants: From Production to Valorisation. SIPAM, 2-4 novembre, Jarba-Tunisia.
- Bergaoui, A., Sakka, R.L., Benjannet, H., Ben Halima, K.M et Mighri, Z (b) (2006).** Etude biologique et chimique de l'extrait chloroformique de la plante *Anacyclus cyrtolepidioides* Poussant en Tunisie. International Symposium on Perfume, Aromatic and Medicinal Plants: From Production to Valorisation. SIPAM, 2-4 novembre, Jarba-Tunisia.
- Berhail Boudouda H. (2014).** Etude Phytochimique Et Biologique Des Espèces *Biscutella Raphanifolia*, *Zilla Macroptera*, *Inula Graveolens* Et *Inula Viscosa*. Thèse De Doctorat. Faculté Des Sciences Exactes. Université De Constantine 1, Algérie. Pp 231.
- Beta T., Nam S., Dexter J. E, Sapirstein H. D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fraction. *Cereal chem.* 82 (4). Pp: 390 – 393.
- Betti H.A., Stein A.C., Dallegre E. et al. (2012).** Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. *Food and Chemical Toxicology* (In press).
- Bicha S. (2003).** Etude de l'effet de la pollution du sol par les métaux lourds sur l'accumulation des métabolites secondaires de l'exsudat chloroforme de *Inula viscosa* (compositae). Thèse de magister, Université de Constantine, (2003).
- Bimakr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M. (2011).** Comparison of different extraction method of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, *Food and Bioproducts Processing*, **89**, 67- 72.

- Blanc M.C., Bradessi P., Gonçalves M.J., Salguiero L., Casanova J. (2006).** Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. *Flavor Fragra. J.* 21: 324-332.
- Bobic, V., M.D. And Morgan C. D., M.D. (1998).** Osteochondral autograft – transfer System (OATS)TM - Surgical technique osteochondral autograft transfer Arthex 1998 p 22
- Boizot N. et Charpentier J-P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA. N°.* special. pp. 79-82.
- Boki K.A., Drosis A.A. , Tzioufas G.A , et al. (1993).** Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients. *Ann Rheum Dis* 52 : 517.
- Boumaza D. (2011).** Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : Inule visqueuse, Rosmarinus officinalis de la région d'Oran, thèse de magister.
- Boungab K., Tadjeddine A., Belabid L., Fortas Z., Lazrag F. (2011).** Activité antifongique des extraits d'*Anacyclus valentinus* L. sur des champignons phytopathogènes. 4^{ème} Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures. Evolution des cadres réglementaires européen et français. Nouveaux moyens et stratégies Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France 230- 238.
- Bousbia N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Alger), p
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F. (2009).** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chemistry*, 2009, **114**, 355-362.
- Bravo A., Anacona J.R. (2001).** Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Metal Chemistry.* 26: 20–23.
- Brandin H., Viitanen E., Myrberg O., and Arvidsson A.K. (2007).** Effects of herbal medicinal products and food supplements on induction of CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 in the human colon carcinoma cell line LS180. *Phytother. Res.*, **21**, 239-244.
- Brown J., Khodr H., Hider R., Rice-Evans C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal.* 330: 1173-1178.
- Brunet-Guedj E., Brunet B., Girardier J., Moyen B. (2006).** *Medecine du sport.* 7th ed. Masson; pp. 263–7.
- Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales.* pp 41-54. 2^o édition, Lavoisier, Paris.
- Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales,* (3^{ème} éd.). Paris : Editions médicales internationales. Edition Tec & Doc Lavoisier. Pp : 1120.

- Bssaibis F., Gmira N., Meziane M. (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., 3 (1) : 44-55.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. (1997).** Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. J Bone Joint Surg 79:600-11.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.
- Burt S.A. & Rinders R.D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157. Letters in Applied Microbiology. Vol 36. Pp: 162 – 167
- Cafarchia C., De Laurentism Mililloma, Puccimi Y. (1999).** Recherche of antifungal activity of flowers and leaves of *Inula viscosa*. Parasitologia- pp. 82
- Caillard J. (2003).** Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6 p.
- Camacho A., Fernandez A., Fernandez C., Altarejos J. (2000).** Compositions of essential oil of *Dittrichia viscosa*. Epos. 29: 3-8.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Akpulat H.A. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). J. Ethnopharmacol. 87: 215-220.
- Careri M., Elveri L., Mangia A., Musci M. (2001).** Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, *Journal of Chromatography A*, 881, 449-460.
- Çelik Tülay Aşkin and Özlem Sultan Aslantürk (2010).** Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with Allium Test,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 189252, 8 pages, doi:10.1155/2010/189252
- Chahmi Naima , Jaouad Anissi, Sanae Jennan, Abdellah Farah, Khalid Sendide, Mohammed El Hassouni. (2015).** Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of morocco. *Asian Pac J trop Biomed* 2015;5(3) 228/233
- Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. J. Essent. Oil Res.9: 67-75.
- Chebouti-Meziou Nadjiba (2016).** Contributions to Study of the Antimicrobial Activity of *Inula Viscosa* Harvested in Boumerdes (Algeria). *Int'l Journal of Advances in Chemical Engg., & Biological Sciences (IJACEBS)* Vol. 3, Issue 1. ISSN 2349-1507 EISSN 2349-1515
- Chemat S., Lagha A., Aitamar H., Bartels P.V., Chemat F. (2004).** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 188-195. (b)
- 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.

- Choudhary Manjusha, Vipin Kumar, Gupta Pankaj Kumar, Singh Surender (2014).** Anti-arthritic activity of *Barleria prionitis* Linn. Leaves in acute and chronic models in Sprague Dawley rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52:199–209.
- Chvátalová K., Slaninova I. et al. (2008).** Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*. 106(2): 650-660.
- Clevenger J.F., (1928).** Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, Vol. 17, pp : 336-341.
- Cofer (2011).** Item 121 : Polyarthrite rhumatoïde. *College Français des enseignants en rhumatologie*
- Collin G. (2000).** Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*. 13: 4-5.
- Combe B. (2007).** Polyarthrite rhumatoïde : diagnostic et aspects cliniques. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. 14-220-A-10.
- Cox P.A. (1994).** The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Found Symp.* 185, 25-36; discussion 36-41.
- Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013).** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* 2013; 52 (525) : 18-21.
- Cowan M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4). Pp: 564 – 582.
- Crouzet J. (1998).** Arômes alimentaires. *Techniques de l'ingénieur F 4 100*, pp : 1 – 18
- Cutolo M., Serio B., Villaggio B., Pizzorni C., Craviotto C., Sulli A.(2002).** Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002, 966, p.131-142.
- Cuoco G., Mathe C., Archier P., Chemat F., Vieillescazes C. (2009).** A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 75-82.
- Da Silva, R., de Souza, G.H. B., da Silva, A. A. de Souza, V. A., Pereira, A.C., Royo, V.A., Silva, M.L. A., Donate, P. M., Ara újo, A.L.S.M., Carvalho, J.C. T. and Bastos, J.K. (2005).** Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1033–1037
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, HJ., Oinonen, PP., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. (2008).** Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food and science technology LWT*. 41 (3), 391-400.
- De Billerbeck VG. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5 (5), 249-253

- Dehpour A., Ibrahimzadeh M.A., Seyed Fazel N. et Seyed Mohammad N. (2009).** Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. Vol 60. pp. 405-412.
- Deschner, J.; Hofman, C. R.; Piesco, N. P.; and Agarwal, S. (2003).** Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6(3): 289-93
- De Laurentis Nicolino, Losacco Vincenzo, Milillo Maria Antonietta, Lai Olimpia. (2002).** Chemical Investigations Of Volatile Constituents Of *Inula Viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) From Different Areas Of Apulia, Southern Italy. *Delpinoa*, N.S. 44:115-119.
- Derwich E., Benziane Z. & Boukir A. (2010).** GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.
- Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H. (2002).** Thermal Processing Enhances the nutritional Value of Tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 3010–3014.
- Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J. (2007).** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **109**: 458-463.
- Dougados M., Dijkmans B., Khan M. et al. (2002).** Conventional treatments for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 61 : 40-50.
- Dougados M., Kahan A., Revel M., et al. (2005).** Polyarthrite rhumatoïde en 100 questions. NHA communication, Paris, 2005.
- Dubucquoi S. & Fily-Nalewajk S. (2008).** Prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde en 2008 : la biologie peut-elle répondre aux attentes des cliniciens ? *Rev Fr Laboratoires* ;404:51-7.
- Durvelle J.-P. (1893).** Fabrication des essences et des parfums. Editeur J. FRITSCH, Paris.
- Durvelle J.-P. (1930).** Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, 807 p.
- Dykstra LA et Woods JH. A. (1986).** Tail withdrawal procedure for assessing analgesic activity in Rhesus monkeys. *Journal of pharmacological Methods*, 15:263-26.
- Eckersall P.D. & Nash A.S. (1983).** Isoenzymes of canine plasma alkaline phosphatase : an investigation using isoelectric focusing and related to diagnosis, *Res. Vet. Sci.*, 1983, 34, 310-314.
- Eddouks M., Maghrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.-L., Jouad H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology* 82, 97–103.
- Efraim L. & Zohar A. (2008).** “Fossils” of practical medical knowledge from medieval Cairo. *J Ethnopharma*, 119:24– 40

- El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F., Aberchane, M. (2008).** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc.* 12 (4), 345-351.
- Elazzouzi Hanane, Soro Aminata, Elhilali Fatima et al. (2014).** Phytochemical study of *Anacyclus pyrethrum* (L.) of Middle Atlas (Morocco), and *in vitro* study of antibacterial activity of pyrethrum. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 8(8) : 131-140.
- El Allaoui A, Rhazi Filali F, Oumokhtar B, & Ibijbijen J (2011).** Evaluation De La Toxicité Aigue Du Colorant (Rhodamine B) Utilisé Dans La Fabrication Des Saucisses Traditionnelles Dans La Ville De Meknès Au Maroc. *Science Lib*, 3: 1-15.
- El Hilaly J., Israili Z.H., & Lyoussi B. (2004).** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**: 43-50.
- El Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. (2006).** Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radical Research*. 40(3): 303-
- El morsi M. A. et Hassanein A. M. (1999).** Corrosion inhibition of copper by heterocyclic compounds. *corros. Sci.* , 41 2337
- El Ouriachi E. Et Bouyanzer A. (2014).** Antioxidant activity of solvent extracts of *Inula viscosa* from Morocco. *rabian Journal of Chemical and Environmental Research*. Vol.1 N°1 (2014) 33–40.
- Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T., Ferrero M. J. P. (2007).** Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society.*, **18** (5) : 891-899
- Escarpa A., Gonzalez M.C. (1998).** High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A*, **823**, 331 -337.
- Everdingen A.A, Siewertsz van Reesema D.R., Jacobs J.W., Bijlsma J.W. (2004).** The clinical effect of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis may be masked by decreased use of additional therapies. *Arthritis Rheum.* 51, (2), p.233-238
- FACCA Sybille (2012).** Développement de biomatériaux nano structurés pour la régénération osseuse et ostéo-articulaire. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement). Université de Lorraine, France.
- 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. *Compt. Rend. Biol.* Vol. 331. pp. 372-379.
- Fisher K., Phillips C. (2009).** In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycinresistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J.Biomed. Sci.* **66**: 180-185.
- Farong Yua , Fahong Yub , Rende Lic, Rui Wang (2004).** Inhibitory effects of the *Gentiana macrophylla* (Gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats. *Journal of Ethnopharmacology* 95 77–81

- Fauron R. & Moati R. (1983).** Guide pratique de phytothérapie. Ed. MALOINE. pp 811 .
- 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.
- Ferrari J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaires des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne. 242p.
- Fezai Myriam, Senovilla Laura, Jemaà Mohamed, and Ben-Attia Mossadok (2013).** “Analgesic, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Extra Virgin Olive Oil,” *Journal of Lipids*, vol. 2013, Article ID 129736, 7 pages. doi:10.1155/2013/129736.
- Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle, N°73 (2006).** Documents pour le médecin du travail N°105 1er trimestre.
- Filho, A.A.S., Costa, E. S., Cunha, W.R., da Silva, M.L. A., Nanayakkara, N. P. D. and Bastos, J.K., (2008).** *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.* **22**, 1307–1310
- Fletcher D. S., Widmer W. R., Luell S. et al. (1998).** “Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 284, no. 2, pp. 714–721, 1998.
- Franco-Mican S.X., Castro J., Campos M. (2008).** Observation du complexe parasitaire de l'inule visqueuse en Espagne et ses méthodes de propagation, *Le Nouvel Olivier*. n°66, nov-déc
- Fougère B.J. et Wynn S.G. (2007).** Herb manufacture, pharmacy and dosing. In: *Veterinary herbal medicine*, ed. Mosby Elsevier, St Louis, p. 221 -236.
- Fournier P. (1947).** Livre des plantes médicinales et veneneuses de France. Ed. LE CHEVALIER. Tome 1 pp 176-178.
- Franchomme P., Pénéol D., et al. (1999).** L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges
- Franz-xavier R., Bliefert C. et Perraud R. (2004).** Guide pratique de Toxicologie. *De Boeck*
- Funk & Wagnalls (2004).** Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls. URL <http://www.Funkandwagnalls.com>.
- Gad F.A., Abd Allah O.A., Farid A.S., Fararh K.M. (2013).** Biochemical, Histopathological And Immunohistochemical Changes In Paracetamol, Fish Oil And Thioacetamide Treated Rat. *Benha Veterinary Medical Journal*, Vol. 25, No. 1:18-28.
- Ganapaty S., Pannakal S.T., Srilakshmi G.V.K., Lakshmi P., Waterman P.G., Brun R. (2008).** Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Letters* **1**, 175–178

- Garneau Francois-Xavier (2001).** Le materiel vegetal et les huiles essentielles. Corporation: LASEVE-UQAC, Chicoutimi (Quebec) G7H 2B1 Huiles essentielles : de la plante à la commercialization.
- Gausсен H., Leroy H. F. (1982).** Précis de Botanique (végétaux supérieurs), 2ème Ed.426. Lavoisier, Paris
- Gazengel J-M., Orecchioni A-M. (2013).** Le préparateur en pharmacie. 2ème édition. Ed.
- Gebhard C., Stämpfli S.F., Gebhard C.E. et al. (2009).** Guggulsterone, an anti-inflammatory phytosterol, inhibits tissue factor and arterial thrombosis. *Basic Res Cardiol*;104 (3):285-94.
- Georgé S, Brat P, Alter P, & Amiot JM (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1370-1373.
- Gerhard W. (2014).** La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : stratégies thérapeutiques et concept du patient-expert. Thèse de Doctorat. Faculté de pharmacie, Université de Lorraine, France.
- Gettigan P., Henry D. (2004).** Cardio-vascular risk and inhibitor of cyclo-oxygenase. *Jama*, 296 (13). 1633-44.
- Ghfir, B., Dargent, R. (1995).** Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* sur *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) : Conséquences cytologiques et biochimiques. - Thèse de doctorat. Université de Toulouse 3. Toulouse, France, 213 p.
- Glauciemar D.V, Orlando V.S, Abreu M., et al. (2009).** Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Essential Oil from *Ageratum fastigiatum* Vol.52, n. 5: pp.1115-1121, September-October 2009 ISSN 1516-8913 Printed in Braz
- Glauciemar D. V. Orlando V.S., Celia H.Y. and Maria A.C. (2009).** Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Records of Natural Products Journal*. 3(1): 52-57.
- Gökbulut Alper, Özhan Onural, Basri Satılmışb, Kadir Batçioğlub, Selami Günalc and Engin Şarera (2013).** Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Phenolic Compounds of Selected *Inula* species from Turkey. *Natural Product Communications* Vol. 8 (4).
- Goldring M.B. (2012).** Articular Cartilage Degradation. *Hospital for Special Surgery Journal*, **9**, 7-9.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.
- Grassi-Zampieron Rafaela, França Leonardo V., Carollo Carlos A. et al. (2010).** Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. And *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(4): 575-579.
- Grigonis, D., Venskutonis, PR., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, CS. (2005).** Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*. 33 (3), 223-233.

- Guignard J.L. (1994).** Abrégé Botanique, 9ème Ed. 204.
- Guillemin F., Briançon S., Klein J.M., Sauleau E., Pourel J. (1994).** Low incidence of rheumatoid arthritis in France. *Scand J Rheumatol.* 1994, 23, (5), p.264- 268.
- Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S. (2009).** An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* **121**, 360–365
- Hacheimi I., Kadi O. (2009).** Effet de l'extrait aqueux de *L'Anacyclus Valentinus* 1 sur le cholestérol.
- HaH Y.S., Sung M.J., lim HS et al. (2011).** Dietary alpha lipoic acid supplementation prevents synovial inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritic mice. *Rheumatology international*, 31 : 1583-1590.
- Hagen K.B., Byfuglien M.G., Falzon L. et al. (2009).** Dietary interventions for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* (1): CD006400.
- Halliwell B., Gutteridge J. (1992).** Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters.* 307(1): 108-112.
- Hamimed S. (2009).** Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Département de chimie, faculté des sciences exactes. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Hammami Saoussen, Ben Salem Abdelkader, Mastouri Maha, Falconieri Danilo, et al. (2013).** Essential oil composition and antimicrobial activities of aerial parts from Tunisian *Anacyclus clavatus* (Desf.). *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 7(2), pp. 71 -75.
- Hamzi S., Belhadj K. (2008).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique des polyphénols extraits de deux plantes médicinales (*Anacyclus valentinus* 1 et *Anacyclus pyrèthum*).
- Hangody L, Karpati Z, Szerb I. (1996).** Autologous osteochondral mosaic-like graft technique for replacing weight bearing cartilage defects. Read at the 7th Congress of the ESSKA, Budapest .Book of abstracts ;99.
- Hanser C. (2009).** Les compléments alimentaires à visée anti-arthrosique chez le cheval. Thèse de Doctorat. Faculté de pharmacie, Université Henri Poincare, Nancy 1, France.
- Harald, G. (1978).** Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1978; 6: 11 –17.
- Harborne J.B. (1980).** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. New series. Vol. (8): 329-402.
- Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M.C. (2004).** Pharmacological investigation of pruning -6''-O-P coumarates: A flavonoid glycoside. *Indian J. pharmacol.* 36 (4). 244 – 250.
- Harrington C., Wischik C. et al. (1994).** Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *The Lancet.* 343(8904): 993-997.

- HAS, Haute Autorité de Santé (2007).** *Polyarthrite rhumatoïde : aspects thérapeutiques hors médicaments et chirurgie - aspects médico-sociaux et organisationnels.* Service communication,
- HAS Haute Autorité de Santé. (2011).** Décision n°2011.09.082/MJ du Collège de la Haute Autorité portant suspension de recommandation de bonne pratique.
- Haoui, I.E. et al., (2001).** Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.arabjc.2011.05.005
- Hayakawa F., Kimura T., Maeda T., Fujita M., Sohmiya H., Fujii M., Ando T. (1997).** DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1336(2): 123-131.
- Hayes A. and Markovic B. (2002).** Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* Part 1 antimicrobial activity and invitro cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 4: 949-964.
- Heinegård, D. (2009).** Proteoglycans and more – from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(6), pp. 575-586.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R. et al. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13(10):572-584.
- Hernández V, Recio MC, Manez S, Giner RM, Rios J.L (2007).** Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sci.* 80 : 480–488.
- Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugawa, K. (1996).** Effect of plant phenolics on the formation of spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking of hydroxyl radical. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 19: 558–563.
- 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-corpulence and anticancer *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 25–28
- Hmamouchi M. (1997).** Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. In : Heywood V.H. (ed.), Skoula M. (ed.). Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region. Chania : CIHEAM, 1997. p. 89-108 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 23)
- Hmamouchi M. (2001).** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. 2^{ème}. Ed. 389p.
- Hodge HC, Sterner JH (1943).** Determination of substances acute toxicity by LD B50B . *Amer. Industrial Hyg. Assoc.* 10: 93.
- Hoodgar F., Nasri S., Amin G. (2010).** Investigation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro-alcoholic extract of *Securigera securidaca* L. *Horizon Med Sci*; 17(1): 12-19.

- Hughes, C.; Wolos, J.A.; Giannini, E.H.; Hirsch, R. (1994).** Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **1994**, *153*, 3319–3325.
- Hungl D., Siebertl G., Changl P., et al. (2006).** Hepatic Pharmacokinetics of Propranolol in Rats with Adjuvant-Induced Systemic Inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**: G343-G351.
- Husson M.C., Dardelle D., Darque A., Jolivet I., Lecante V., Limat S., Sarrut B. (2003).** Polyarthrite rhumatoïde : stratégie thérapeutique. Dossier du CNHIM (centre national hospitalier d'information sur le médicament) XXIV, (5).
- Hyeun Choi Jeon, Na Park Young, Li Ying et al. (2010).** Flowers of *Inula japonica* Attenuate Inflammatory Responses. *IMMUNE NETWORK*. Vol 10 (5) : 145 – 152.
- Ibáñez E., López-Sebastián S., Ramos E., Tabera J., Reglero G. (1998).** Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction, *Food Chemistry*, **63**, 281-285.
- Ierna M., Kerr A., Scale S.H. et al. (2010).** Supplementation of diet with krill oil protects against experimental rheumatoid arthritis. *BMC musculoskeletal disorders*, **11** : 136.
- Insel, P.A. (1990).** Analgesic- antipyretic and anti inflammatory agents, drug employed in the treatments of Rheumatoid arthritis and gout. In: (Gilman A.G., Rall, T.W., Niels A.S. and Taylor, P. eds.) *The Pharmacological basis of Therapeutics* 8th ed. Pergamon Press. New York, pp. 638-681.
- Inui T., Wang Y., Deng S., Smith D.C., Franzblau S.G. and Pauli G.F. (2007).** Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A*, **1151**: 211–215.
- Jacquiera H., Cruaud P., Poilane I., Lachassinne E., Gaudelus J., Collignon A. (2007).** Activité in vitro de la moxifloxacine (8-méthoxyquinolone) seule ou en association avec le céfotaxime sur les streptocoques du groupe B, ScienceDirect. *Pathologie Biologie* **55**. 412–417.
- James T., Mukinda P., Eagles F.K. (2010).** Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **128** (1), 236-240
- Janssen P.A., Niemegeers C.J., Dony J.G. (1963).** The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittel Forschung/ Drug Research* **6**: 502-507, 1963
- Jothy S.K. et al. (2011).** Acute oral toxicity of methanolic seeds extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules* **16**, 5268–5282.
- Jouda M.M. (2013).** The Antibacterial Effect of Some Medicinal Plant Extracts and their Synergistic Effect with Antibiotic and Non-antibiotic Drugs, Biological Sciences Master Program, Faculty of Science, Islamic University-Gaza. P34.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998).** Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **247**: 60-64.

- Julve P.H. (2015).** ff- Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France
- Jungbluth G., Rühling I. et al. (2000).** Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* 2(9): 1946-1952.
- Justesen U., Knuthsen P., Torben L. (1998).** Quantitative analysis of flavonoids, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, **799**, 101-110.
- Kahn M.F., Bardin T., Meyer O., et Orcel P. (2007).** Cortisonothérapie et polyarthrite rhumatoïde : le point. *L'actualité humatologique*, 497 p.
- Kalemba D. & Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry.* 10: 813-829.
- Kamala T. (2007).** Hock Immunization: A humane alternative to mouse footpad injections. *J. Immunol. Methods* 328: 204-214.
- Kaneda I., Kubo F., Sakurai H. (2007).** Relationship between trace metal concentration and antioxidative activity of ancient rice bran (red and black rice) and a present-day rice bran (Koshihikari). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 21(1): 43-51.
- Kangralkar V.A., Biradar S., Mandavkar Y., Thakur M., Chougule N. (2010).** Anti inflammatory, antiarthritic, analgesic and anticonvulsant activity of Cyperus essential oils. *Int J Pharm Pharm Sci.* Vol 2, Issue 4, 112-115.
- Karaali A., Boyacıoğlu D., Günez G. et Özçelik B. (2004).** Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey
- Karaköse Hande, Müller Anja, and Kuhnert Nikolai (2015).** Profiling and Quantification of Phenolics in Stevia Rebaudiana Leaves. *J. Agric. Food Chem.* DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01944.
- Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., HadjipavlouLitina D.S. (2006).** Analysis of the Essential Oil of *Origanum dubium* Growing Wild in Cyprus. Investigation of its Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Planta Med.* 72(14):1330-1334.
- Karnati Mamatha, Chandra Rodda H., Veeresham Ciddi, Kishan Bookya (2013).** Anti-arthritic activity of root bark of *Oroxylum indicum* (L.) vent against adjuvant-induced arthritis. *Pharmacognosy Research* ; Vol 5 (2) : 121 – 128 .
- Kenny O., Smyth T.J., Walsh D., Kelleher C.T., Hewage C.M., Brunton N.P. (2014).** Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry* 161: 79 – 86.
- Khatabi A., Rhalem N., Chabat A., Skali S., & Soulaymani-Bencheich R. (2010).** Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc*, **2**: 3 -4.

- Kheyer Nawel, Dahia Meridja and Kamel Belhamer (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products* 2:1 18 – 26.
- Kim MS, Lee WK, Kim HY, Kim C, Ryu YW (1998).** Effect of environmental factors on flavonol glycoside production and phenylalanine ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Ginkgo biloba*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 237-244.
- Kim YK, Kim YS, Choi SU, Ryu SY (2004).** Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. *Arch. Pharm. Res.* 27:44 - 47.
- Kishor Kumar V. & Lalitha K.G. (2013).** Acute Oral Toxicity Studies Of *Anacyclus Pyrethrum* Dc Root In Albino Rats. *Int J Pharm Pharm Sci, Vol 5, Issue 4, 675-678.*
- Knudson C.B. and Knudson W. (2001).** Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12: 69-78
- Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev I.B.A. (2001).** Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 385(1): 129-137.
- Kremer J.M. (2004).** *Toward a better understanding of méthotrexate.* *Arthritis Rheum,* 50 : 1370-1382
- Kremer J.M., Lawrence D.A., Pettilo G.F. et al. (1995).** Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping non steroidal antiinflammatory drugs. Clinical and immune correlates. *Arthritis and rheumatism.* 38 : 1107-1114.
- Krimat Soumia, Dob Tahar, Lamari Lynda, Boumeridja Saida, Chelghoum Chabane, Metidji Hafidha (2014).** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine;* 2(6): 478-483.
- Kshirsagar A.D., Panchal P.V., Harle U.N., Nanda R.K. Shaikh, H.M. (2014).** Antiinflammatory and antiarthritic activity of anthraquinone derivatives in rodents. *Int. J. Inflamm.* 2014, 12690596.
- Kubo M., Matsuda H., Tanaka M., Kimura Y., Okuda H., Higashino M., Tani T., Namba K. and Arichi S. (1984).** Studies of *Scutellaria radix*. VII. Anti-arthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoid components from *Scutellaria radix*. *Chem. Pharm. Bull.,* 32, 2724-2729.
- Kulkarni S.K. (1999).** *Hand book of Experimental Pharmacology,* Vallabh Prakashan, New Delhi
- Kumar M., Agarwala R., Deyb K., Raib V., Johnsonc B. (2009).** Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* Retz. on Gram positive and Gram negative Microorganisms. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* Vol. 1 (1): 56-60.
- Kumar V.L., Roy S., Sehgal R., Padhy B.M. (2006).** A comparative study on the efficacy of rofecoxib in monoarticular arthritis induced by latex of *Calotropis procera* and Freund's complete adjuvant. *Inflammopharmacology* 14, 17–21.

- Kurkin V.A. (2003).** Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis and biological activities. *Chem. Nat. Compd.* 39 : 123.
- Lacoste E, Chaumont JP, Mandin D, Plumel MM, Matos FJ (1996).** Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. *Ann Pharm Fr* 54:228–230
- Laghrifi Khadija, Mostafa El Idrissi, Youssef Makoudi, Rachad Alnamer (2013).** *In Vitro* Antibacterial Activity Of The Methanolic And Ethanolic Extract Of *Inula Viscosa* Used In Moroccan Traditional Medicine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical SCIENCES* 2: 5 3963-3976.
- Lahouel M. (2005).** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine .
- Lai Jia-Ping, Lim Yew Heng, Su Jin, Shen Han-Ming, Ong Choon Nam (2007).** Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three *Compositae* plants by LC/DAD-APCI/MS. *Journal of Chromatography B*, 848 : 215–225.
- Lakhdar L. (2015).** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse de doctorat, faculté de médecine dentaire université Mohamed V de Rabat p 33 .34
- Lane D., Jenkins S.W.D. (1984).** 9th International Symposium on Polynuclear aromatic hydrocarbons, Columbus, Ohio, USA, 437-449.
- Lastra C., Lopez A., Motilva V. (1993).** Gastroprotection and prostaglandin E2 generation of rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica* 59: 497–501.
- Le Blanc GA. (2010).** Acute toxicity: A Textbook of Modern Toxicology. Hoboken, New Jersey.(4):125 -236.
- Lee S. E., Hyun J. H., Ha J. -S., Jeong H. S., & Kim J. H. (2003).** Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, 167–179.
- Lee Sarah, Oh Dong-Gu, Lee Sunmin et al. (2015).** Chemotaxonomic Metabolite Profiling of 62 Indigenous Plant Species and Its Correlation with Bioactivities. *Molecules*, 20, 19719–19734.
- Leonavičienė L., Bradūnaitė R., Vaitkienė D. et al. (2013).** Effect of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats: comparison with diclofenac. *Gerontologija* ;14(1): 7 – 15.
- Jean-François Léger (2007).** Noms vernaculaires des taxons de la BDTFX. In : *Téla Botanica* (2011). Fiche de eFlore de *Anacyclus valentinus*.
- Lin Long-Ze & Harnly James M. (2012).** LC-PDA-ESI/MS Identification of the Phenolic Components of Three *Compositae* Spices: Chamomile, Tarragon, and Mexican Arnica. *Nat Prod Commu*; 7(6): 749–752.
- Lorrain E. (2013).** 100 questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie.

- Lardry J-M, Haberkorn V. (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*; 61 : 14-7.
- Larousse médicale. (2001).** 3ème Ed Larousse, Boulogne, France.
- Leonavičienė L., Bradūnaitė R., Vaitkienė D., Vasiliauskas A., Zabulytė D., Jonauskienė I., Bižanov G., Normantienė T., Akramas L. (2013).** Effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats: comparison with diclofenac. *Gerontologija* 14(1): 7–15.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. and Kadota, S., (2008),** Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 5434–5440
- Lucchesi, ME., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. (2007).** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L : A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. of Food Engineer.* 79, 1079-1086.
- Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2010).** Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2383-2389.
- Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, 146 pages, thèse de troisième cycle, Chimie, Université de la Réunion, Saint Denis.
- Macheix J J., Fleuriet A., Jay–Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses poly-technologiques et universitaires romandes. p4-5.
- Madi A. (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Biologie et Ecologie. Université Mentouri Constantine.
- Mahmoudi Hela, Hosni Karim, Zaouali Wafa et al. (2016).** Comprehensive Phytochemical Analysis, Antioxidant And Antifungal Activities Of *Inula Viscosa* Aiton Leaves. *Journal of Food Safety*, 36 : 77–88.
- Maiza, K., Brac de la Perrière, R. A., Hammiche, V.** Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. *In: Schröder, E., Balansard, G., Cabalion, P., Fleurentin, J., Mazars, G. (1993).* Médicaments et aliments : L'approche ethnopharmacologique. Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^{ème} Conférence internationale d'Ethnomédecine. Heidelberg, pp. 169-171.
- Malešev D. et Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.*, **72** (10) : 921-939.
- Mamoci Erjon, Cavoski Ivana, Simeone Vito, Mondelli Donato et al. (2011).** Chemical Composition and In Vitro Activity of Plant Extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against Postharvest Fungi. *Molecules*, **16** : 2609-2625.
- Mancuso J.R., McClements D.J., Decker E.A. (2000).** Iron-accelerated cumene

hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurin emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(2): 213-219

Máñez S., Hernández V., Giner R-M., Ríos J-L., Recio M.C. (2007). Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia* 78: 329–331.

Mangena, T., and Muyima, N. Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosemarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 291–29

Mantle D., Anderton J.G., Falkous G., Barnes M., Jones P, Perry E.K. (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 1 21 (4): 385-391.

Maoz M., Neeman I. (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 479–482.

Marc B. (2012). La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, place et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge et la délivrance des biothérapies à l'officine. Thèse de Doctorat. U.F.R de Médecine et de Pharmacie de Rouen, France

Marc E.B., Nelly A., Annick D.-D., Frederic D. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 315–334.

Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., Dessi, A. (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. *Phytoter. Res.* 18, 789-792.

Martini MC., Seiller M. (1999). Actifs et additifs en cosmétologie. Procédés d'extraction des huiles essentielles. Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales p.563

Masi A.T., Feigenbaum S.L., Chatterton R.T. (1995). Hormonal and pregnancy relationships to rheumatoid arthritis: convergent effects with immunologic and microvascular systems. *Semin Arthritis Rheum.* 25 (1). p.1-27.

Maurya, R., Yadav, D. K., Singh, G., Bhargavan, B., Murthy, P. S. N., Sahai, M., Singh M. M., (2009). Osteogenic activity of constituents from *Butea monosperma* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 610–613

May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 639-643

Mayan M.D., Carpintero-Fernandez P., Gago-Fuentes R. et al. (2013). Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *The American Journal of Pathology*, 182(4), pp. 1337-1346.

Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed

- (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med.Biol. Res.* **40**: 839-847.
- Medic-Saric M., Jasprica I., Smolcic – Bubalo A., Mornar A. (2004).** Optimization of Chromatographic Conditions Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic acids. *Croatica Cihmica Acta.*77 (1 – 2), 361 – 366.
- Mengal, P., Beh, D., Bellido, G.M., Monpon, B. (1993).** VHMD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes.* 114, 66-67.
- Menkès C.J., Allanore Y., Giraudet-Le Quintrec J-S., Hilliquin P., Judet H., Kahan A. (2004).** *La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte.* Paris: Elsevier Masson.
- Merghem R. (2011).** Les plantes: sources de molécules d'intérêt pharmacologique ou nutritionnel. Laboratoire de Valorisation et Développement des Ressources Phytogéniques. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.
- Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M., Sætton M.F., Boldrini E. (2002).** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* **237**: 209-214.
- Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. (2003).** Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine.* 34(2): 243-253
- Mubashir Khan, Bashir A., Ganai Khalid Ghazanfar and Seema Akbar (2014).** Evaluation of Antiarthritic Potential of Methanolic Extract of *Gentiana kurroo* Royle. Hindawi Publishing Corporation Arthritis Volume 2014, Article ID 810615, 6 pages
- Mukhopadhyay M. (2000).** Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton, Floride: éd. CRC Press, 360 pages.
- Mukinda JT & Syce JA (2007).** Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 138-144.
- Murray R. (1984).** Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. *Clin chem the C.V. Mosby Co.* St louis. toronto. Princeto:1112-116. Cité par fiche technique SPINREACT. Ref: 1001160.
- Muthu C., Ayyanar M. Raja, N. & Ignacimuthu S. (2006).** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi:10.1186/1746-4269-2-43.
- Nasser M., Housheh S., Kourini A. And Maala N. (2014).** Chemical Composition Of Essential Oil From Leaves And Flowers Of *Inula Viscosa* (L.) In Al-Qadmous Region, Syria. *Ijpsr*, Vol. 5(12): 5177-5182.
- Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, **33** : 2-16.

- Naveed Muhammad, Muhammad Saeed and Haroon Kha. (2012).** Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12:59
- Németh, É. (2013).** Changes in Essential oil quantity and quality influenced by ontogenetic factors. *Acta*
- Nielen M.M.J., van Schaardenburg D., Reesink H.W. et al. (2006).** Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*;65(4):535-7.
- Nirmal Kumar Subedi, S. M. Abdur Rahman, and Mohammad Ahsanul Akbar (2016).** “Analgesic and Antipyretic Activities of Methanol Extract and Its Fraction from the Root of *Schoenoplectus grossus*,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 3820704, 8 pages.
- Nizard R. (2005).** Principes de la chirurgie dans la polyarthrite rhumatoïde. *La revue du praticien.* (55). p.2158-2159.
- Nostro A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea V., Flamini G., Morelli I. (2004).** Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett.* 230:191–195.
- Nowakowska, Z., (2007).** Mini-review, A review of anti-infective and antiinflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 125 -137
- Odontuya G., Hoult J. R. S., and Houghton P. J. (2005).** Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother. Res.* 19: 782 - 786.
- Olufunmiso O. Olajuyigbe & Anthony J Afolayan (2012).** Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. With Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences, Int. J. Mol. Sci. 13.* 8915-8932
- Okoli C. O., Akah P. A., and Nwafor S. V. (2003),** “Anti-inflammatory activity of plants,” *Journal of Natural Remedies*, vol. 3, no. 1, pp.1–30.
- Oksöz S. (1976).** Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Plantamed*, 29(4): 343-345.
- Okuda T. (1986).** Encyclopedia of natural medicine. Vol 1. Hirokawa, Tokyo. P 64.
- Olgica Stefanović & Ljiljana Comić (2012).** Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02:01 01-05.
- Olufunmiso O Olajuyigbe and Anthony J Afolayan (2012)** Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences, Int. J. Mol. Sci. 13.* 8915-8932.
- OMS (2002).** Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.
- OMS (2008).** Standardization of antimicrobial susceptibility testing in human medicine nationwide. 5th Edition

- OMS (2013).** Stratégie de l'OMS de la médecine traditionnelle pour 2014-2023. ISBN 978 92 4 250609 9.
- Paiva.Martins F., Gordon M.H. (2005).** Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7): 2704-2709.
- Pankaj S. Kothavade, Vipin D. Bulani, Dnyaneshwar M. Nagmoti, Padmini S. Deshpande, Nitin B. Gawali, and Archana R.J. (2015).** Therapeutic Effect of Saponin Rich Fraction of *Achranthes aspera* Linn. on Adjuvant-Induced Arthritis in Sprague-Dawley Rats. Hindawi Publishing Corporation. Autoimmune Diseases. Article ID 943645, 8 pages
- Paolini J., Leandri C., Desjobert J.M., Barboni T., Costa J. (2008).** Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species, *Journal of Chromatography A*, **1193**, 37-49. (a)
- Parvin N., Ansari Samani R., Shahinfard N., Reissi S., Alibabaie Z., Asgari A.A. (2012).** Effect of alcoholic extract of *Tanacetum parthenium* on acute pain in rat. *J Qazvin Univ Med Sci*; 16(1): 15-21.
- Pathak N, Priyanshee G, Natawar BP, Sanjay K, Nirruddin J, Yagnik B. (2009).** Curative effect of *Albizia lebeck* methanolic extract against adjuvant arthritis-with special reference to bone erosion. *IJPSDR* 2009;1:183-7.
- Patel K., Dixit V.D., Lee J.H. et al. (2012a).** Identification of ghrelin receptor blocker, D-[Lys3] GHRP-6 as a CXCR4 receptor antagonist. *Int J Biol Sci* 8:108–117.
- Patel V.D., Desai N.A., Shah P.V., Patel S.S. (2003).** Evaluation of anti-inflammatory potential of ayurvedic formulation Rheumacure in animal model of rheumatoid arthritis. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* , Vol 5 (2): 350 – 357.
- Patil C.R., Rambhade A.D., Jadhav R.B., Patil K.R., Dubey V.K., Sonara B.M., Toshmwal S.S. (2011).** Modulation of arthritis in rats by *Toxicodendron pubescens* and its homeopathic dilutions. *Homeopathy*; 100:131–7.
- Patil P. R., Dixit R., Ramabhimaiah S. (2015).** Effect of *Aurum Metallicum* on Adjuvant Induced Arthritis in Albino Rats. *American Journal of Pharmacy & Health Research*, 3 (5) : 114 – 118 ;
- Perez-Alonso, M.J., Velasco-Neguereula, A., Emin Duru, M., Harmandar, M., Garcia Vallejo, M.C. (1996).** Composition of the Volatile Oil from the Aerial Parts of *Inula viscosa* (L.)
Aiton. *Flavor Fragra. J.* 11: 349-351.
- Perron N.R., Brumaghim J.L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 53(2): 75-100.
- Pharmacopée européenne (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) Mai 2008

- Pibiri M. C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161
- Pincus T.; Marcum S.B.; Callahan L.F. (1992).** Long-term drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices: II. Second line drugs and prednisone. *J. Rheumatol.*19, 1885–1894.
- Piquemal G. (2008).** Les flavonoïdes (en ligne) : <http://www.detoursante.com/index.php?>
- Prete M., Racanelli V., Digiglio L., Vacca A., Dammacco F., Perosa F.(2011).** Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun*;11:
- Puéchal, R. Tubiana. (2004).** La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. Consulter prescrire. Masson, Paris.
- Pujol J.P. (1995).** *Le cartilage, Atlas de l'arthrose.* Lequesne, Menkès Eds, Negma, p 12.
- Pulcini C., Naqvi A., Gardella F., Dellamonica P., Sotto A. (2010).** Résistance bactérienne et prescription antibiotique : perceptions, attitudes et connaissances d'un échantillon de médecins généralistes. *Médecine et maladies infectieuses.* Vol 40. Pp : 703–709.
- Pulla Reddy A. Ch. & Lokesh B. R. (1996.)** Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Toxicology Volume*, **107**(1): 39-45.
- Queiroz A.C., Daysianne Pereira De Lira, Thays De Lima Matos Freire Dias et al. (2010).** The Antinociceptive And Anti-Inflammatory Activities Of *Piptadenia Stipulacea Benth.(Fabaceae)*; *Journal Of Ethnopharmacology*; 2010; Vol 128; Pp: 377-383.
- Qnais E. (2011).** The analgesic effect of the ethanolic extract of *Matricaria aurea*. *Turk J Biol* 35 (2011) 347-352.
- Radojević I., Stanković O., Topuzović M., Čomić L. and Ostojić A. (2012).** Great Horestail (*Equisetum telmateia* Ehrh.): Active Substances Content and Biological Effects. *Experimental and Clinical Sciences International Journal*, Vol. 11:59-67.
- Rai Mahendra et Carpinella Maria Cecilia (2006).** Naturally Occurring Bioactive Compounds. *Advances in Phytomedicine Series, Volume Three.* Elsevier.
- Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. (2014).** Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol.* 2014; 85(1):160-9
- Randhawa MA (2009).** Calculation Of LD50 Values From The Method Of Miller And Tainter, 1944 (Letter To Editor). *Journal of Ayub Medical College AbbottAbad*, 21: 184-185.
- Rasekh H.R., Nazari P., Kamli-Nejad M., & Hosseinzadeh L. (2008).** Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 21 -26.
- Raymond J., Bergeret M., Gendrel D. (2001).** Impact de la résistance bactérienne sur les infections graves. *Arch Pédiatr* 2001 ; 8 Suppl 4 : 697-704. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

- Reighard, TS., Olesik, SV. (2006).** Bridging the Gap between supercritical fluid extraction and liquid extraction techniques : alternative approaches of the extraction of solid and liquid environmental matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 26 (2 et 3), 1-39.
- Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, MG., Esquivel, MM. (2001).** *Melissa officinalis, L.*: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids*. 21, 51-60.
- Ricard-Blum S. and Ruggiero F. (2005).** The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 53: 430-442.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, et al. (2010).** "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." *Nat Immunol* 11(9): 785-797.
- Robert H. Waterman K.M., Peter G. (1993).** *Volatile Oil Crops, Their Biology Biochemistry and Production*. Longman Scientific & Technical, U.K. 185 p.
- Rose N. & Mackay I. (2014).** *The Autoimmune Diseases*, Fifth edition. Elsevier Inc. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00036-8>.
- Roulier G (1990).** *Traité pratique d'aromathérapie, propriétés et indications thérapeutiques des Essences de plantes*. Ed. Dangles . pp 64-65.
- Rozenblat S., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H., Cohen Y., Dovrat S. (2008).** Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 75: 369-382
- Rozzi, NL., Phippen, W., Simon, JE., Singh, RK. (2002).** Supercritical fluid extraction of essential oil components from Lemon-Scented Botanicals, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 35, 319-320
- Romani A., Pinelli P., Cantini C., Cimato A., Heimler D. (2006).** Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Food Chem.* Vol. 95. pp. 221-225.
- Rosalki, S. B., Foo, A. Y. And Burlina, A. (1993).** Multicentre Evaluation of Iso ALP test kit for Measurement of Bone Alkaline Phosphatase Activity in Serum and Plasma. *Clinical Chemistry*, 39: 648 – 652
- Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet F.P. (2005).** *Inflammation et Pathologie Inflammatoire*. Paris Maloine; 320-331.
- Saag K.G., Criswell L.A., Sems K.M., Nettleman M.D., Kolluri S. (1996).** Low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis. A meta-analysis of their moderate-term effectiveness. *Arthritis Rheum.* 39 : 1818-1825.
- Saber T., Veale D.J., Balogh E. et al. (2011).** Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 6:e23540.
- Sacher R.A. & McPherson R.A.(1991).** *Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test*. Pennsylvania, USA, pp. 416–443.

- Salah-Fatnassi BK., Salim-Bannour A., Harzallah-Skhiri F., Mohamed-Ali M., Mighri Z., Chaumont J.P., Aouni M. (2010).** Activités antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*. 157 (3), 433-444.
- Salzer U.J. (1977).** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-acritical review. *C.R.C Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 9: 345-373.
324.
- Sany J. (1998).** *Methotrexate et polyarthrite rhumatoïde*. Paris : Expansion Scientifique Publications, 1998. 84p.
- Sany J.(2003).** Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : conception actuelle. John Libbey Eurotext, Montrouge,
- Saroux A. (2000).** Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde. *La Lettre du Rhumatologue*. 253 : 18- 21.
- Sarmi-Manchado P. et Cheymer V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. Pp2- 10.
- Satrani B., Ghanmi M., Farah A, Aafi A., Fougrach H., Boukhriss B., Bousta D., Talbi M. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146, 85-96.
- Sassi A.B., Harzallah-Skhiri F., Bourgougnon N., Aouni M. (2008).** Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research* 22, 53-65.
- Sawadogo WR, Boly R, Lompo M, et al. (2006).** Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Dicliptera verticillata*. *Int J Pharmacol*. 2 (4): 435–8.
- Schinor EC, Salvador MJ, Ito IY, Dias DA. (2007).** Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. *Braz J Microbiol* 2007;38:145-9.
- Schmeda-Hirschmann Guillermo, Quispe Cristina, Soriano Maria del Pilar C. (2015).** Chilean *Prosopis Mesocarp* Flour: Phenolic Profiling and Antioxidant Activity. *Molecules*, 20, 7017-7033.
- Schulz, R. M. and Bader A. (2007).** "Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes." *Eur Biophys J* 36(4-5): 539-68.
- Scott D.L. (2002).** The diagnosis and prognosis of early arthritis: rationale for new prognostic criteria. *Arthritis Rheum*. 46 : 289-90.
- Seignalet J., PautHe C., Reynier J. et al. (1989).** Preliminary results of a wheat-free and milk-free diet in rheumatoid arthritis. *Presse Med*.18 : 1 931-1 932.

- Selles C., Dib M.A., Djabou N., Beddou F., Muselli A., Tabti B., Costa J. & Hammouti B. (2013).** Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle, *Natural Product Research*, 11:46.
- SFR : Société Française de Rhumatologie (2006).** Dossier Polyarthrite rhumatoïde.
- Shah Biren N.; Nayak B.S.; Seth A.K. et al. (2006).** Search for medicinal plants as a source of anti-inflammatory and antiarthritic agents - a review. *Phcog. Mag.*, 2: 77-86.
- Shin S., Kim J.H. (2005).** In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* 28: 897-901
- Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O.J., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G., Henriques M.G. (1999).** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* 66: 57-69.
- Singh S., Majumdar D., Rehan H. (1996).** Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol.* 54 (1):19–26.
- Singleton V. L., Rossi J. R. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144–158.
- Srivastava S, Nigam R, Prakash S, Srivastava MM (1999).** Mobilization of trivalent chromium in presence of organic acids: a hydroponic study of wheat plant (*Triticum vulgare*). *Bull Environ Contam Toxicol* 63:524–530
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996).** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1202–1205.
- Skoldstam L., Hagfors L., JoHanSSon G. (2003).** An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 62 : 208-214.
- Slimani S., Ladjouze-Rezig A. (2014).** Prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Algeria: a prospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 53(3):571-3.
- Smallfield (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*. Number 45. Pp: 04
- Smegard G et Bjork J. (1995).** *Sulphasalazine : mechanism of action in rheumatoid arthritis*. *Br J Rheum.* 34 : 7-15.
- Simirgiotis M.J.; Benites J.; Areche C.; Sepúlveda B. (2015).** Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules*, 20, 11490–11507.
- Smith RL, Cohen SM, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, et al., (2005).** A procedure for the safety evaluation of natural flavour complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry. Toxicol* 43 345-363.

- Smyth T, Ramachandran V. N. and Smyth W. F. (2009).** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents* 33. 421 - 426.
- Snoussi S.A, Djazouli Z.E, Aroun M.E.F et Sahli Z. (2003).** Les plantes maraichères, industrielles, condimentaires, aromatiques, médicinales et ornementales. *Annexes sur « La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31.*
- Soeken K. L., Miller S. A., and Ernst E. (2003).** "Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review," *Rheumatology*, vol. 42, no. 5, pp. 652–659.
- Solau –Gervais E. (2010).** Enquête sur les pratiques alimentaires dans la polyarthrite rhumatoïde : étude de 112 patients. *Revue du rhumatisme et des maladies ostéo-articulaires.* 77 : O.10.
- Soltani A. (2010).** Effets des substances naturelles sur la santé des articulations. Thèse de Magister. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mascara, Algérie.
- Sook-Ha Fan, Noraisah Akbar Ali, and DayangFredalinaBasri (2014).** Evaluation of Analgesic Activity of the Methanol Extract from the Galls of *Quercusinfectoria* (Olivier) in Rats," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol., Article ID 976764, 6 pages;
- Soussy C.J. (1990).** Association d'antibiotiques *D.S. Bactéricidie*, Aspects théoriques et thérapeutiques. Pp 1173 – 82. Edition Maloine.
- Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E.O., Trajano V.N., Filho J.M.B. (2005a).** Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 549–558.
- Spiridon I, Nechita B, Niculaua M, Silion M, Armatu A, Teacă C, Bodîrlău R. (2013).** Antioxidant and chemical properties of *Inula helenium* root extracts, *Central European Journal of Chemistry*, 11: 1699-1709.
- Stalikas, C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids *Review. J. Sep. Sci.* 30, 3268 – 3295
- Stamp L.K., James M.J., Cleland L.G. (2005).** Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Seminars in arthritis and rheumatism.* 35 : 77-94
- Stephen G., Jenkins P., Audrey N., Schuetz MD, M.P.H. (2012).** Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Symposium on antimicrobial therapy, Mayo Foundation for Medical Education and Research, March; 87 (3):290-308.*
- Subasri G. and Ahmed John S. (2016).** Screening of phytochemical compounds, trace metals and antimicrobial activity of *Anacyclus pyrethrum*. *International Journal of Advances in Scientific Research ; 2(01): 032-037*
- Sujith K, Ronald D, Suba V. (2011).** Antioxidant activity of ethanolic root extract of *Anacyclus pyrethrum*, *International Research Journal of Pharmacy; 222-226.*

- Syversen S.W., Goll G.L., Van Der Heijde D., Landewe R., Lei B.A., Odegard S., et al. (2010).** Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin : results from a 10-year prospective study. *Ann Rheum Dis.* 69, p.345-351.
- Tadjeddine A.L., Kambouche N., Medjdoub H., Meddah B., Dicko A. et al., (2013).** Antidiabetic effect of *Anacyclus valentines* L. aqueous extract in normoglycemic and streptozotocin induced-diabetic rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics.* AJPCT 5 424-43.
- Tahraoui A, Israili ZH, & Lyoussi B (2010).** Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 48-55.
- Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, PM., Sameza, ML., Nkouaya Mbanjo, EG., Tiako Fotso, BR., Amvam Zollo, PH., Menut, C. (2009).** Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc.* 13 (1), 77-84.
- Tela Botanica (2011).** *Anacyclus valentinus* L. Flore électronique. www.tela-botanica.org
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A and Khetani, V. (2002).** A 90 day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D, L-methylphenidate in Sprague dawley rats. *Toxicology.* 179: 183-190.
- Tison J.-M. & de Foucault B. (2014).** *Flora Gallica. Flore complète de la France.* Mèze, Editions Biotope.
- Tkachenko KG. (2006).** Antiviral activity of the essential oils of some *Heracleum* L. species. *Journal of Herbs, Spices. Medicinal plants.* 12 (3), 1-12.
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. (2010).** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine.* 17: 142-145.
- Tomi F & Casanova J. (2006).** ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* - a review. *Acta Horti.* 723: 185-192
- Trèves R., Perrot S. (2006).** Utilisation de la morphine en rhumatologie. In utilisation de la morphine dans les douleurs aiguës. Ed. Institut UPSA de la douleur, 175 p.
- Tuncay Agar Osman, Dikmen Miris, Ozturk Nilgun, Yilmaz Mustafa Abdullah et al. (2015).** Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L. Species Growing in Turkey. *Molecules*, 20, 17976-18000;
- Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B., Sokmen A. (2002).** Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 83: 117-121.
- Urquiaga I. et Leighton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64.

- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., Spencer J. P.E., (2009).** The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells 3 and protects against neuroinflammatory injury Archives of Biochemistry and Biophysics doi:10.1016/j.abb.2009.01.016
- Vanden B.D.A. et Vlietinck A.J. (1991).** Screening methods from antibacterial and antiviral agents from higher plants. Academic press. Vol 6. Pp: 46 – 57.
- Van Vuuren, S.F. and Viljoen, A.M. (2011).** Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med* 77, 1168–1182.
- Vanwanseele B., Lucchinetti E., Stüssi E. (2002).** The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 408-419.
- Vasiliauskas Audrius, Leonavičienė Laima, Vaitkienė Dalia, Bradūnaitė Rūta, Lukšienė Aloyza(2010).**Anti-inflammatory effects of *Aesculus hippocastanum* L. tincture and the pro-/antioxidant bodily state of rats with adjuvant arthritis. *ACTA MEDICA LITUANICA*. Vol. 17. No. 3–4. P. 123–132
- Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S. (2002).** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.*, **53** (377) : 209 -210.
- Vetal Sachin (2013).** “Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats, Beijing Academy of Food Sciences, Pages 59–67.
- Vian M.A., Fernandez X., Visinoni F., Chemat F. (2008).** Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils, *Journal of Chromatography A*, **1190**, 14- 17.
- W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J. (2007).** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, **137** (3 supp 1) : 718 s-737 s.
- Wade D., Silveira A., Rollins-Smith L., Bergman T., Silberring J., Lankinen H. (2001).** Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin A hybrid. *Acta Biochim Pol.* Vol. 48. Pp : 1185 – 1189.
- Wall R., Ross R.P., Fitzgerald G.F. (2010).** Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews.* 68 : 280- 289.
- Wang J. & Mazza G. (2002).** Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumors Necroses Factor α in LPS/IFN- γ - activated raw. 264.7. Macrophages J. Agric. Food Chem. 50, 4183 – 4189.
- Wang, I. X. and Wang, Z. J. (2003).** Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55, 949-965.

- Wang M., Li K., Nie Y., Wei Y. and Li X. (2012).** Antirheumatoid arthritis Activities and chemical compositions of phenolic compounds-rich fraction from *Urtica atrichocaulis*, an endemic plant to China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1155/2012/818230
- Wang Z, Ding L, Li T, Zhou X, Wang L, Zhang H, Liu L, Li Y, Liu Z, Wang H, Zeng H, He H (2006).** Improved solvent- free microwave extraction of essential oil from dried Cuminum luminum cyminum L and Zanthoxylum bungeanum Maxim.J chromatogr.,A 1102:11-47
- Wenqiao Wang, B, H, Ben Daniel et Yigal Cohen (2004).** Control of Plant Diseases by Extracts of *Inulaviscosa*, *Phytopathology*, PP: 1042-1047.
- Whidente G.T., Boulet J.M., Walker K. (2005).** The role of central peripheral μ opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA. *J. Pharmacol Exp Ther.* 314 (3), 1234-40
- Wichtel M. et Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- 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 *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 8653–8660
- Winder CV, Lembke LA, Stephens MD. (1969).** Comparative bioassay of drugs in adjuvant – induced arthritis in rats: Flufenamic acid, mefenamic acid, and phenylbutazone. *Arthritis Rheum* 1969;12:472-82.
- Wollgast, J., Anklam, E., (2000).** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423 – 447.
- Woode E., Boakye-Gyasi E., Danquah C.A., Ansah C., Duwiejua M. (2009).** Anti-arthritic effects of *Palisota hirsuta* K. Schum. Leaf extract in Freund’s adjuvant arthritis in rats. *International journal of pharmacology.* 5 (3): 181-190.
- Yeo L., Toellner K.M., Salmon M. et al. (2011).** Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 70:2022-8.
- Yoshino M., Murakami K. (1998).** Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry.* 257(1): 40-44.
- Zeggwagh N.A., Ouahidi M.L., Lemhadri A., Eddouks M. (2006).** Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. Aqueous extract in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 108: 223–227.
- Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of commercial oils of *Thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res.* 16(1): p. 69 - 74.
- Zardi-Bergaoui A., F. Harzallah-Skhiri, S. Hammami, I. Chreaif, J. Cheriaa-Issa , H. Ben Jannet and Z. Mighri (2008).** Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil

from Flowerheads of *Anacyclus cyrtolepidioides* Pomel from Tunisia. *Jeobp* 11 (6) 2008 pp 577 – 585.

Zatta P., Zambenedetti P. et al. (2004). A fatal case of aluminium encephalopathy in a patient with severe chronic renal failure not on dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 19(11): 2929-2931.

Zeguerrou R., Guesmia H., Lahmadi S. (2013). Recueil des plantes médicinales dans la région des Ziban. Edition Dar El Houda, Algérie. ISBN : 978-9931-438-00-7.

Zhang L.L., Wei W., Yan S.X., Hu X.Y., Sun W.Y. (2004). Therapeutic effects of glucosides of *Cheanomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 2004; 25: 1495–1501.

Zhao R.J., Koo B.S., Kim G.W., Jang E.Y., Lee J.R., Kim M.R., Kim S.C., Kwon Y.K., Kim K.J., Huh T.L., Kim D.H., Shim I., Yang C.H. (2005). The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 2323-2326.

Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 579: 5157- 5162.

Annexes

Nourriture des rats

Les rats sont nourris d'un régime complet standard sous forme de granules ("EL AALF"), composé de céréales, tourteaux de soja : issues de céréales, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline, plus un complexe minéralo-vitaminiques avec les pourcentages suivants : Glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 3,4%, cellulose brute 3%, cendre brute 4,9%, humidité 14%, vitamine 1,7%. L'eau et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

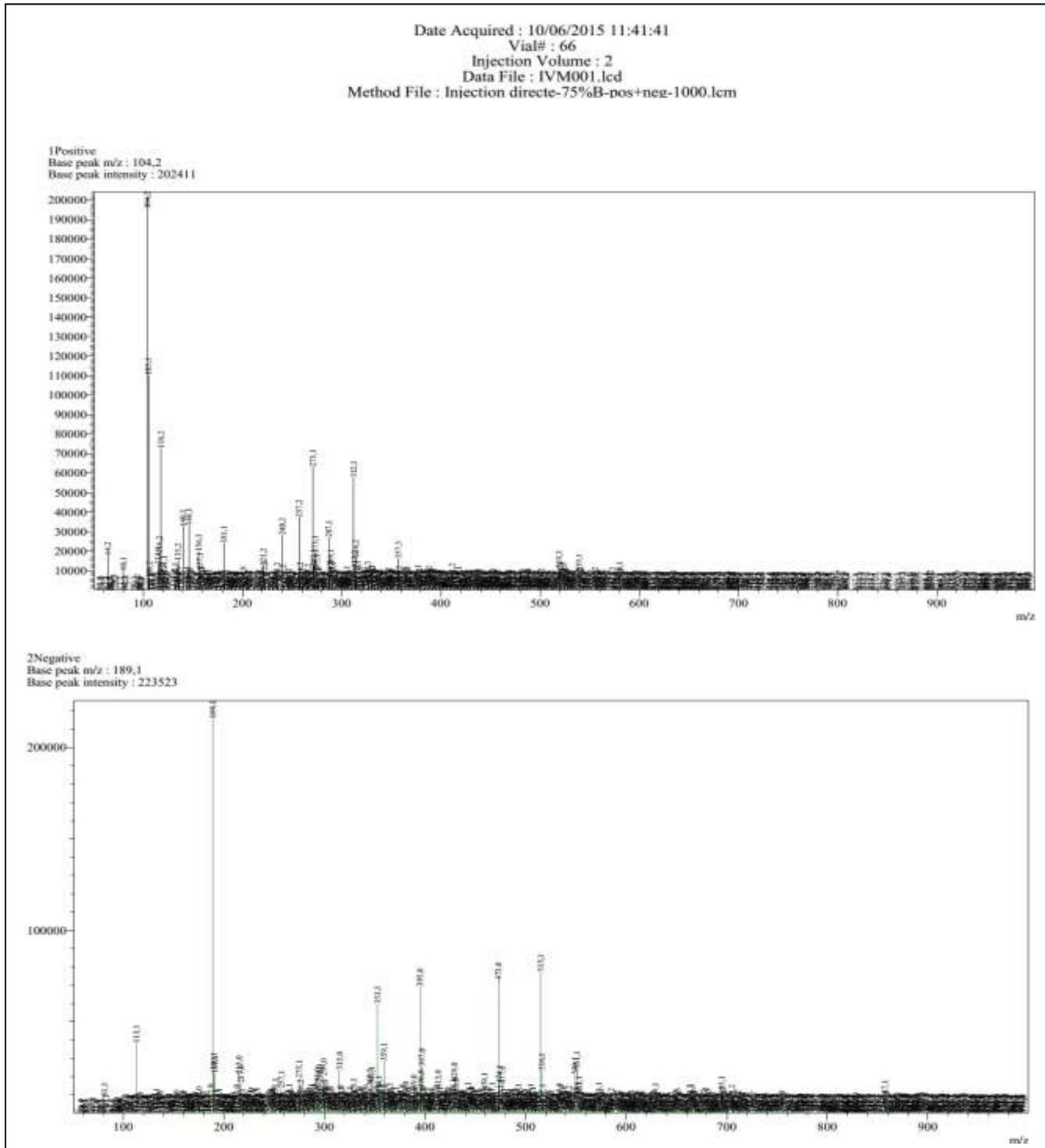


Fig. Spectre du LC-MS-ESI en positif et négatif de l'extrait méthanolique d'*I. viscosa* (IVM)

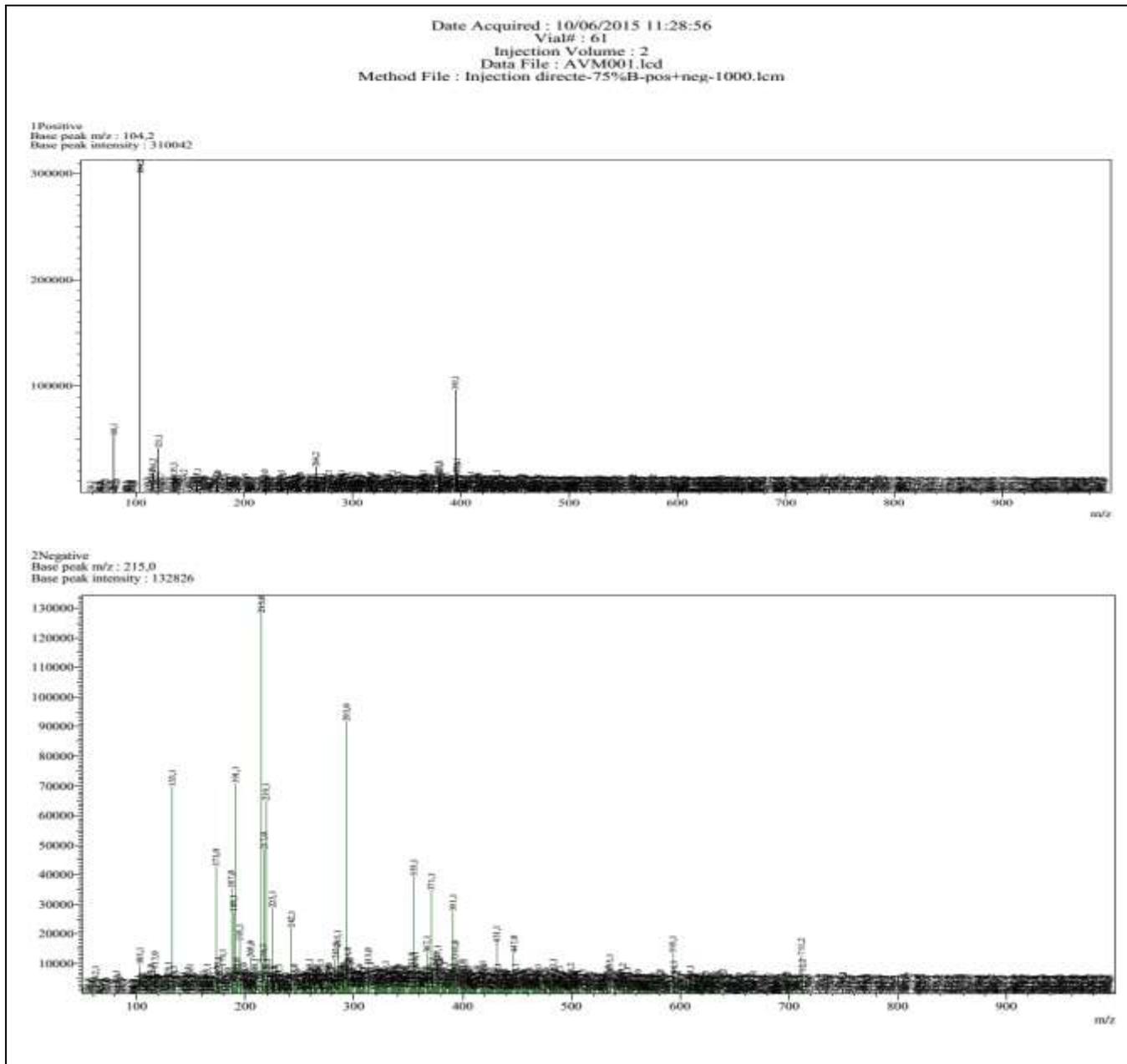


Fig. Spectre du LC-MS-ESI en positif et en négatif de l'extrait méthanolique d'*A. valentinus* (AVM)

I. Evaluation de la toxicité aigue des extraits méthanoliques

Tableau 1. L'effet des extraits méthanoliques sur le comportement des animaux et le taux de mortalité

Dose mg/Kg	Sexe	Mort	Signes de toxicité	Latence	Evolution de poids
300	M	0/5	Aucun signe de toxicité n'a été enregistré	-	Le poids évoluait de façon normale pareillement au témoin sain
	F	0/5		-	
600	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
1000	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
1500	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
2000	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
2500	M	0/5		-	
	F	0/5		-	

II. Evaluation de la toxicité aigue des huiles essentielles

Tableau 2. L'effet des huiles essentielles sur le comportement des animaux et le taux de mortalité

Dose mg/Kg	Sexe	Mort	Signes de toxicité	Latence	Evolution de poids
0.3	M	0/5	Aucun signe de toxicité n'a été enregistrée	-	Le poids évoluait de façon normale pareillement au témoin sain
	F	0/5		-	
0.5	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
1	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
1.5	M	0/5		-	
	F	0/5		-	
2	M	0/5	Isolement, convulsion, hypoactivité	-	30mn
	F	0/5		-	1h
3	M	0/5		-	30mn
	F	0/5		-	30mn

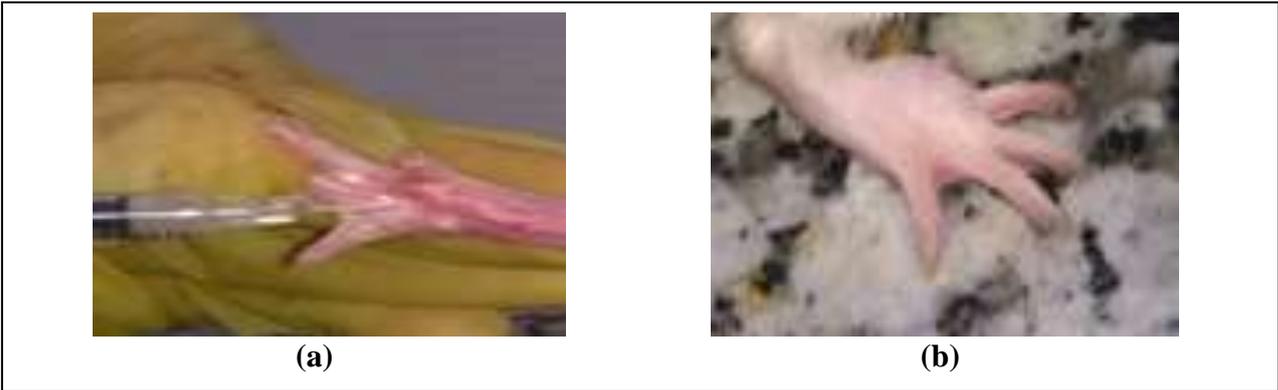


Fig. Induction de l'arthrite rhumatoïde (a) ; Après installation de la maladie (b)



Fig. Administration des substances par gavage



Fig. Mesure de l'épaisseur de la patte injectée

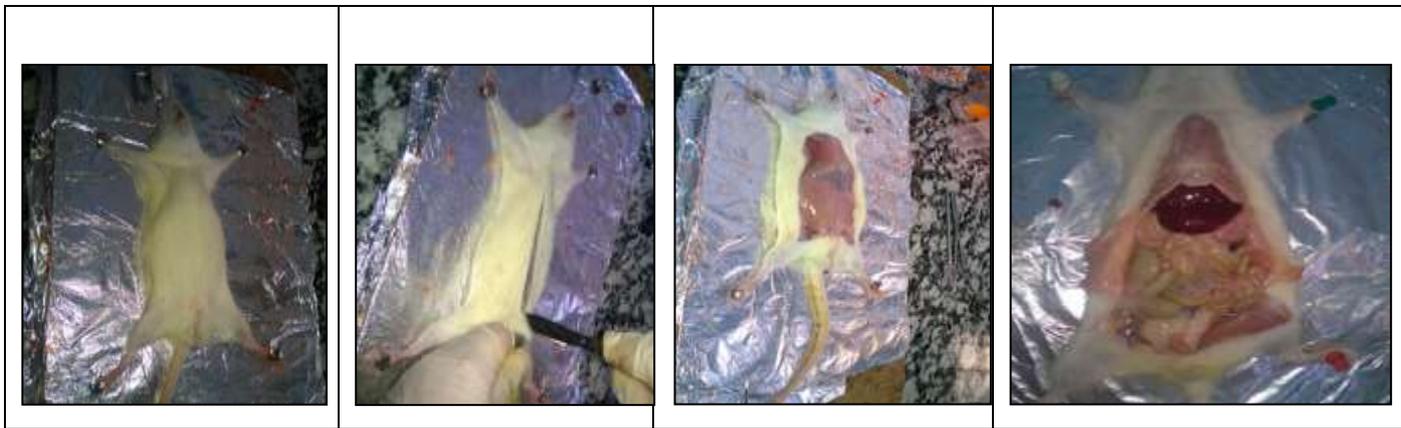


Fig. Les différentes étapes de la dissection

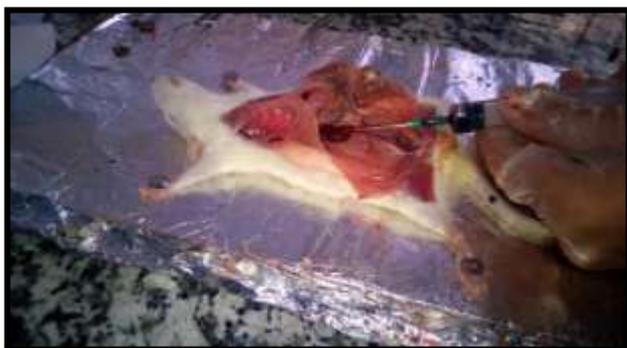


Fig. Prélèvement du sang

Protocoles du dosage des paramètres sériques

I. Dosage de la CRP

Latex anti-CRP : Suspension aqueuse de particules de latex sensibilisées, Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Contrôle positif : Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Contrôle négatif : Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Cartes : Cartes pour réalisation du test.

Agitateurs : Agitateurs à usage unique pour mélange réactifs-échantillons.

Méthode de dosage :

Ramener les réactifs et les sérums à tester à température ambiante (18-25°C).

Test qualitatif :

Déposer successivement sur la carte:

- 1 goutte du contrôle positif
- 1 goutte du contrôle négatif
- 1 goutte (50 µl) de sérum à tester.
- Placer à côté de chaque dépôt 1 goutte de Latex anti- CRP bien homogénéisé.
- Mélanger les 2 gouttes à l'aide d'un agitateur et les étaler.
- Imprimer à la carte un mouvement de rotation et observer l'apparition éventuelle d'une agglutination en 3 minutes.

Lecture :

Réaction négative : La suspension reste homogène

Réaction positive : agglutination nette en 2 minutes.

La sensibilité du test CRP LATEX étant de 6 mg/l. Les sérums donnant une réaction positive ont une concentration supérieure à 6mg/l de CRP.

Test Semi Quantitatif

Préparer une série de dilutions du sérum à tester en solution de NaCl 8,5 g/l. Répéter le test pour chaque dilution de la même manière que pour le test qualitatif et rechercher la dernière dilution donnant encore une agglutination. La concentration du sérum testé en CRP est estimée en multipliant le titre obtenu par le seuil de sensibilité du test 6mg/l.

II. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Solution de travail :

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif 1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 5 jours de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :

Solution du travail : 1,2 ml

Sérum : 20µl

- Mélanger, et attendre 1 min ;
- lire à 405 nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min ;
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : $\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{ALP (UI/L)}$

III. Dosages des transaminases

III.1. Transaminase Glutamo-oxalo-acétique(TGO)

Réactif 1 : tampon, pH 7.8

Réactif 2 : substrat (NADH, LDH, MDH, α -cétoglutarate).

Solution de travail :

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 72 heures de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :

Solution du travail : 1ml

Sérum : 100µl

- Mélanger, et attendre 1 min.
- lire à 340nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min.
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{TGO (UI/L)}$

III.2. Transaminase glutamopyruvique (TGP)

Réactif 1 : tampon, pH 7.8

Réactif 2 : substrat (NADH, LDH, MDH, α -cétoglutarate).

Solution de travail :

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 72 heures de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :

Solution du travail : 1ml

Sérum : 100 μ l

- Mélanger, et attendre 1 min.
- lire à 340nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min.
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{TGP (UI/L)}$

I. Etude de l'effet des extraits végétaux sur l'arthrite rhumatoïde *in vivo*

I.1. Evolution pondérale

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	4,12571429	1	4,12571429	0,15208004	0,70338885	4,74722534
A l'intérieur des groupes	325,542857	12	27,1285714			
Total	329,668571	13				

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,01142857	1	0,01142857	0,00040407	0,98429283	4,74722534
A l'intérieur des groupes	339,405714	12	28,2838095			
Total	339,417143	13				

I.2. Suivi de l'œdème

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,60680729	3	0,53560243	0,7873287	0,51278321	3,00878657
A l'intérieur des groupes	16,3266731	24	0,68027805			
Total	17,9334804	27				

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	6,61894286	3	2,20631429	4,96228426	0,00806322	3,00878657
A l'intérieur des groupes	10,6708	24	0,44461667			
Total	17,2897429	27				

I.3. Indice arthritique

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,21333333	1	0,21333333	0,12618297	0,72980112	4,9646027
A l'intérieur des groupes	16,9066667	10	1,69066667			
Total	17,12	11				

I.4. Masse relative des organes

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	51,1286353	5	10,2257271	2201,13753	1,0957E-43	2,47716867
A l'intérieur des groupes	0,1672436	36	0,00464566			
Total	51,2958789	41				

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	52,4262351	5	10,485247	2462,55629	1,4633E-44	2,47716867
A l'intérieur des groupes	0,15328336	36	0,00425787			
Total	52,5795185	41				

I.5. Indice thymus et indice rate

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	12,0410717	1	12,0410717	142,967363	5,0337E-08	4,74722534
A l'intérieur des groupes	1,01067025	12	0,08422252			
Total	13,051742	13				

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	12,6229046	1	12,6229046	167,121548	2,1007E-08	4,74722534
A l'intérieur des groupes	0,90637537	12	0,07553128			
Total	13,52928	13				

I.6. Paramètres sériques

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	24830,012	4	6207,50301	50,4157913	6,79E-13	2,68962757
A l'intérieur des groupes	3693,78494	30	123,126165			
Total	28523,797	34				

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	24936,9603	4	6234,24007	53,6834815	3,0027E-13	2,68962757
A l'intérieur des groupes	3483,88735	30	116,129578			
Total	28420,8476	34				

II. Etude de l'action analgésique centrale des extraits végétaux *in vivo*

II.1. Extrait méthanoliques

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	85,4155959	3	28,4718653	2,9326355	0,05394979	3,00878657
A l'intérieur des groupes	233,007057	24	9,70862738			
Total	318,422653	27				

II.2. Huiles essentielles

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	84,0447	3	28,0149	3,2695104	0,03864907	3,00878657
A l'intérieur des groupes	205,644735	24	8,56853062			
Total	289,689435	27				

Publications scientifiques

THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF TWO MEDICINAL PLANTS *INULA VISCOSA*, *ANACYCLUS VALENTINUS* (ASTERACEAE) AND THEIR SYNERGISTIC INTERACTION WITH ANTIBIOTIC DRUGS

K. Side Larbi^{1,*}, B. Meddah^{1,2}, A. Tir Touil Meddah¹ and P. Sonnet²

¹Bioconversion Research Laboratory, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of SNV, University of Mascara, Algeria

²Laboratory of Glucides-Team Thera- FRE-CNRS 3517, Faculty of Pharmacy, University of Picardie, Amiens, France

Received: 03 December 2015 / Accepted: 02 Mars 2016 / Published online: 01 May 2016

ABSTRACT

With the emergence of multidrug-resistant organisms, combining medicinal plants with synthetic medicines against resistant bacteria becomes necessary. In this study, Synergism between plants extracts (methanolic extract, essential oils) of *Inula viscosa* and *Anacyclus valentinus* and two commonly used antibiotics: gentamycin and oxacillin were investigated on three bacterian strains *Escherichia. coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In the first time, the antibacterial effect of extracts alone was tested against 7 strains by disc diffusion and microdilution methods. The minimum inhibitory concentrations of methanolic extracts ranged between 6.25 and 50mg/ml while that of the essential oils varied between 12.5 and 100µL/mL. The inhibitory concentrations of antibiotics varied between 125 and 31.25 µg/ml. Interactions extracts /antibiotics and extracts/extracts were determined by disc diffusion agar and by checkboard. The results show that the synergistic effect of combinations plant extracts/antibiotics was more important than extracts/extracts.

Keywords: antibiotic resistant; *Inula viscosa*; *Anacyclus valentinus*; synergy.

Author Correspondence, e-mail: khadidja.sid@hotmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v8i2.5>



1. INTRODUCTION

The wide use of antibiotics in the treatment of bacterial infections has led to the appearance of resistant strains. The increase of this phenomenon threatens public health on a global scale as it reduces the effectiveness of treatments and increases morbidity, mortality and health care costs. As a result, the need for new antimicrobial agents becomes greater than ever. One of the strategies is to explore medicinal plants [1].

Healing potential of plants has been known for thousands of years. Plants produce a whole series of different compounds which are not of particular significance for primary metabolism, but can have a remarkable effect to other plants, microorganisms and animals. These organic compounds are defined as biologically active substances, and include polyphenols and essential oils [2]. Many plant extracts have been evaluated not only for direct antimicrobial activity, but also as resistance-modifying agents with an indirect effect against many species of bacteria, by enhancing the activity of a specific antibiotic [3]. In recent years there have been many studies about the beneficial role of bioactive plant extracts in increasing the *in vitro* efficacy of commonly used antibiotics against variety of microorganisms. The ability of plant extracts to act synergistically with antibiotics could be a new approach to solve the problem of bacterial resistance and less susceptible bacteria [2].

Inula viscosa L. Aiton (*Asteraceae*) also known as yellow fleabane or viscous elecampane is a perennial plant distributed in different regions of the Mediterranean Basin. In traditional medicine, it has many uses, including anti-inflammatory, antioxidant, anti-ulcerogenic, antipyretic, anthelmintic, antiseptic, and antifungal activities [4]. *Anacyclus valentinus* L. Aiton (*Asteraceae*) called valence anacycle is annual and perennial specie centred in North West of Africa but also found in other Mediterranean countries including Algeria [5]. This plant is known for its anti-diabetic [6] and antifungal [7] effects. It is also used in some parts of the country as a food condiment.

The purpose of the present work was to determine the antibacterial activity of the chosen medicinal plants and to investigate the synergistic effects of these plants combined with antibiotics, thereby throwing light on the potential role of plants in increasing the effectiveness of antibiotics.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling

Leaves and flowers of *I. viscosa* and *A. valentinus* were harvested at the specified regions shown in table 1. The choice of crop regions is based on the nature of the soil and climate required for plant growth. The sampling was done in a clean area, away from pollution impact and after the disappearance of the morning dew.

Table 1. Geographical situation of the two regions and characteristics of harvesting conditions

	Region	Geography	Altitude (m)	Date
<i>Inula viscosa</i>	Chorfa (SIG)/Mascara	North West	161	October - December
<i>Anacyclus valentinus</i>	El-Bayadh	South West	1135	October

2.2. Preparation of plant extracts and volatile oils

Plant material, divided into two groups, the first group was plant methanol extracts (*Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus*) was ground, extracted with 80 % methanol and filtered after 48 h. The plant residue was re-extracted with addition of 80% methanol, and after 24 h it was filtered again. Combined filtrates were concentrated on a rotary evaporator at 45°C for methanol elimination, and the extracts were kept under refrigerated conditions until use. The extracts dry weight was obtained by the solvent evaporation and used to determine concentration in mg/ml [8]. The second group of plant material was volatile oils of the same plants. The aerial parts of plants (100 g with 1l of distilled water) were hydrodistilled for 3 h. using a Clevenger-type apparatus to produce essential oils according to the method by [9]. The oils were in sealed vials at low temperature (4°C).

2.3. Bacterial strains and Antibiotic susceptibility test

Several bacterial strains were isolated from different environments and subjected to disk diffusion method using 06 different antibiotics according to Stephen G *et al* (2012). The antibiotic discs Amoxicillin (AX, 30µg), Oxacillin (OX, 5µg), Cefazolin (CZ, 30µg), Gentamycin (CN, 10µg), penicillin (P, 30 µg), and Spiramycin (SP, 10 µg) were used and the susceptibility was determined by the inhibition zone in mm.

In the end, seven strains were selected for their antibiotic resistance according to the standardization of susceptibility in human medicine at the national level [11] and the recommendations of the Committee on Antimicrobial the French Society for Microbiology (2008): three of them from Meslam Taib Hospital, Mascara (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*,

Enterococcus faecalis), three from wastewater (*Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Bacillus subtilis*) and *Clostridium* sp. from the great Sabkha Oran.

Table 2. Antibiotic resistance profile of tested bacterial strains

	P	AX	OX	CZ	SP	CN
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Shigella</i> sp.	R	R	R	R	R	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Clostridium</i> sp.	R	R	R	R	R	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	R

2.4. Disk diffusion assay of medicinal plants

The essential oils and methanolic extracts were screened for antibacterial activity using the agar diffusion technique against strains selected. Filter paper discs (Whatman No.1, 6 mm diameter) containing 10 µl of each essential oils and methanolic extracts were applied to the surface of agar plates that were previously seeded by spreading of 0.1 ml from overnight culture. 80 % methanol (v/v) and DMSO impregnated disc were used to check whether they have any inhibitory effect on bacterial growth. The plates were incubated at 37°C/18H and the resulting inhibition zone was measured in mm. Moreover, this area is great, more bacterial species are sensitive [10].

2.5. Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs)

The microtiter plate dilution method was used to determine the MIC of compounds under study. Sterile 96-well microplates were used for the assay. All wells were filled with 50 µL of Muller Hinton broth (MHB). Extracts were dissolved in DMSO and added to the first well (50 µL). Serial two-fold dilutions were made then. An over-night culture of bacteria suspended in MHB was adjusted to turbidity equal to 0.5 McFarland standards. The plates were inoculated with bacterial suspension (50 µL/well) and incubated at 37 °C for 24 h [10]. Each test included two growth controls consisting of the medium with the solvent (DMSO) and medium with bacterial suspension. Then the turbidity was measured every two hours using

micro-plate reader (TECAN brand) at 620 nm wavelength. The lowest concentration showing no culture was considered as the MIC and it's express as (mg/ml, µl/ml).

MBC were conventionally measured by subculturing in 10 µl of streaks without visible bacterial growth broth (from MIC) onto a trypticase soy agar or nutrient agar. The percentage of germs surviving compared to the initial inoculum was determined by comparing the number of colonies by streaking appeared after 24 hours of incubation at 37 ° C. The MBC is the lowest concentration of antibacterial agent allowing only 0.01% of survivors of the initial inoculum [10].

2.6. Tolerance to natural antibacterials tested

The calculation for each strain of the report MBC / MIC controls whether a strain has a tolerance to antibacterial agents (if the report exceeds 32) [12].

2.7. Synergy testing

Three strains were selected for this essay (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*). An over-night culture of bacteria was adjusted to turbidity equal to 0.5 McFarland standards and inoculated on the surface of Mueller-Hinton agar plates. Subsequently, the antibiotic disk was placed on the surface of each inoculated plate and then added 20 µl of plant extract (at a concentration of 50 mg/ml for methanolic extract and 250µl/ml for essential oils), to identify synergies effect between the plant extract and antibiotics. While to identify synergies between the two plant extracts, 20 µl of *I. viscosa* extract and 20 µl of *A. valentinus* extract were mixed and put together on a filter paper disk. Disks of plant extracts and antibiotics alone were used to compare effects. The plates were left for 15 minutes to dry at 4°C, and then incubated at 37° C for 24 h. The diameters of clearing zones were measured [13].

2.8. The checkerboard essay

The checkerboard method was used for the determination of synergy between the antibiotics and natural antimicrobials [10]. For each strain, the MIC of the extracts and the antibiotic used in combination were measured by crossing different concentration ranges of an agent with each other. The preparation of inoculums, sowing, incubations and readings were similar to those described for the CMI measures. Using this method, one is able to recognize synergistic, additive, indifferent, or antagonistic interactions occurring with the agents being tested. It is often combined with calculation of a fractional inhibitory concentration (FIC)

index which is the lowest concentration of drugs combination permitting no visible growth of the test organisms. The FIC is calculated and interpreted as follows:

$$\Sigma \text{ FIC} = \text{FIC of agent A} + \text{FIC of agent B} = \frac{\text{MIC of agent A in combination}}{\text{MIC of agent A alone}} + \frac{\text{MIC of agent B in combination}}{\text{MIC of agent B alone}}$$

Synergy is defined as $\Sigma \text{ FIC} \leq 0.5$, Indifference is defined as $0.5 < \Sigma \text{ FIC} \leq 4$, Antagonism is defined as $\Sigma \text{ FIC} > 4$, Additive when $0.5 < \Sigma \text{ FIC} \leq 1$.

2.9. Statistical analysis

Results obtained were subjected to statistical analysis using one way analysis of variance. All data were the average of three experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Characteristics of methanolic extracts and essential oils

Methanolic extracts of the two plants have a dark color and a strong odor, with a viscous aspect of AVME. The latter registered a higher yield (17.82%) than the IVME (12.46%). Essential oils from the aerial parts of the two plants have a liquid appearance, yellow color with strong and characteristic odors. In this case, the yield of essential oil of *A. valentinus* (0.63%) was lower than *I. viscosa* (1.49%). This may be due to the climatic conditions of the plant. The yield depends on the geographical origin of the plant, the season of harvest, method and conditions of the extraction. It is only relative [14].

3.2. Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs)

The results obtained from the analysis of antibacterial activity exhibited by studied plant extracts are summarized in Table 3. Among of antibacterial agents used, methanolic extracts and essential oils of *A. valentinus* showed the highest activity against strains tested with MIC ranged between 3.125 – 50 mg/ml and 31.25 – 125 μ l/ml respectively. *Inula viscosa* is more active against Gram + bacteria which is shown by [15, 16]. Comparing to the study of Chaouki Selles *et al* (2013) applied on *A. Pyrethrum*, our plant is more active.

The biological activity of *plant extracts* against tested bacteria could be attributed to the presence of biologically active components such as flavonoïds; phenolic acids and terpenoïds[17].

Table 3. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of plant extracts and the antibiotics used

	Methanolic Extracts (ME) mg/ml		Essential Oils (EO) µl/ml		Antibiotics (ATB) µg/ml	
	IVME	AVME	IVEO	AVEO	OX	CN
<i>E. coli</i>	25	3.125	125	31.25		250
<i>S. typhi</i>	50	12.50	125	31.25		125
<i>Shigella sp.</i>	25	12.50	125	62.50		125
<i>B. subtilis</i>	25	6.25	62.50	31.25		62.50
<i>Clostridium sp.</i>	25	12.50	125	62.50		62.50
<i>St. aureus</i>	12.50	12.50	62.50	31.25	250	
<i>En. faecalis</i>	6.25	6.25	62.50	62.50		125

Table 4. The minimum bactericidal concentrations (MBCs) and the report MBC/MIC of plant extracts

	MBC (mg/ml, µl/ml)				REPORT MBC/MIC			
	Methanolic Extracts (ME)		Essential Oils (EO)		Methanolic Extracts (ME)		Essential Oils (EO)	
	IVME	AVME	IVME	AVME	IVME	AVME	IVEO	AVEO
<i>E. coli</i>	50	25	125	250	2	8	1	8
<i>S. typhi</i>	50	25	250	125	1	2	2	4
<i>Shigella sp.</i>	50	25	250	125	2	2	2	2
<i>B. subtilis</i>	50	50	250	62.50	2	8	4	2
<i>Clostridium sp.</i>	50	50	250	125	2	4	2	2
<i>St. aureus</i>	50	50	250	125	4	4	4	4
<i>En. faecalis</i>	25	50	250	250	4	8	4	4

The MBC values were closer than MIC values for all extracts and the report MBC/MIC ranged between 1 and 2 for most strains. It reached 8 for *E. coli* in the presence of *A. valentinus* extracts (Table 4). The action of the whole extracts is bactericidal against all strains. These results are consistent with those obtained by Laghrifi *et al.* [17] on *I. viscosa* methanolic extract.

3.3. Synergy testing

Synergistic interaction between two agents means that their joint effect is stronger than the sum of effects of the individual agents. Combinations of antibacterial agents tested for possible synergistic interactions are demonstrated on figures 1, 2. In general, the zones of inhibition of combinations ATB/EO were remarkable than ATB/ME especially for *A. Valentines* with a diameter of 14mm.

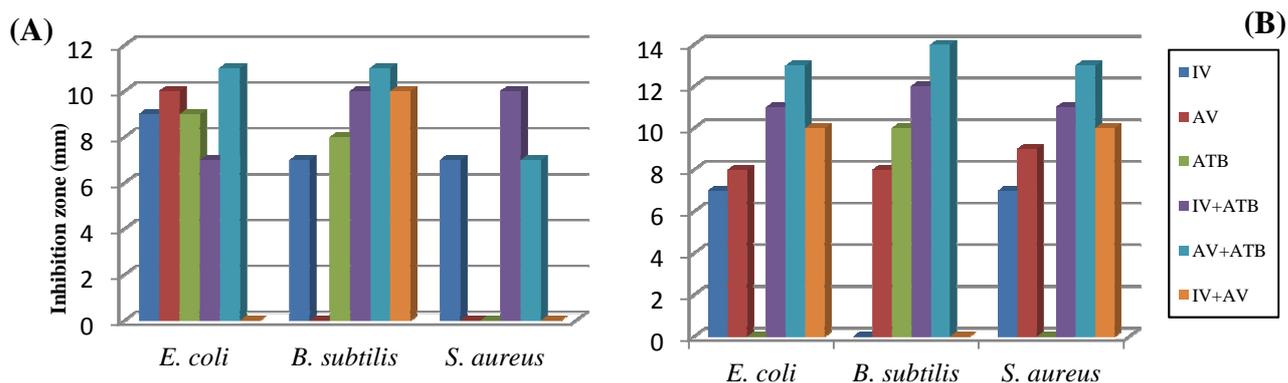


Fig.1. Inhibition diameters (mm) of antibacterial agent alone and with combination, **(A)**. Methanolic extracts, **(B)**. Essential Oils

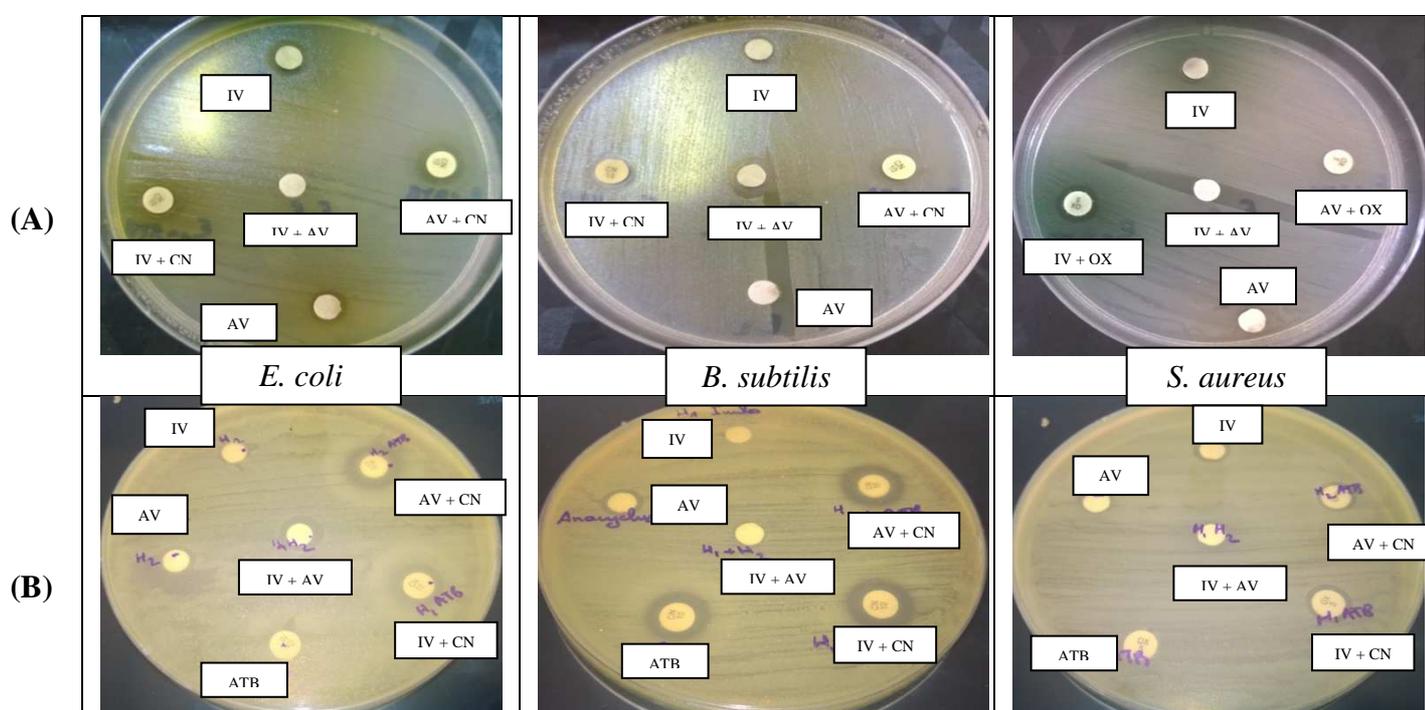


Fig.2. Inhibition zones (mm) of antibacterial agent alone and with combination on plate agar, **(A)**. Methanolic extracts, **(B)**. Essential Oils

Based on the FIC calculations (Table 5), the combinations of compounds involving plant extracts and antibiotics showed synergistic and additive/indifference effects. Therefore, an antagonism between plant extracts was demonstrated, except essential oils combinations which showed a synergistic effect.

Table 5. Fractional inhibitory concentrations (FIC Index) of different combination of plant extracts and the antibiotics

	METHANOLIC EXTRACTS			ESSENTIAL OILS		
	<i>IVME</i>	<i>AVME</i>	<i>IVME</i>	<i>IVEO</i>	<i>AVEO</i>	<i>IVEO</i>
	+ <i>ATB</i>	+ <i>ATB</i>	+ <i>AVME</i>	+ <i>ATB</i>	+ <i>ATB</i>	+ <i>AVEO</i>
<i>E. coli</i>	0.15 Synergy	0.08 Synergy	6 Antagonism	0.06 Synergy	0.067 Synergy	0.09 Synergy
<i>B. subtilis</i>	0.30 Synergy	0.36 Synergy	2.5 Indifference	0.09 Synergy	0.09 Synergy	8.24 Antagonism
<i>S. aureus</i>	0.6 Additive	1.125 Indifference	9 Antagonism	1.006 Additive	2.007 Indifference	0.09 Synergy

These beneficial interactions can be explained by the fact that the compounds contained in plant extracts are believed to disturb permeability of the cytoplasm membrane and there by facilitate the influx of antibiotics [18-19]. The results presented in this report highlight the potential of *I. viscosa* and *A. Valentinus* extracts to have a direct and indirect antibacterial activity as a source of antibiotic resistance modifying compounds.

In fact, several studies [3, 20, 21] showed that there are varied interactions between plant extracts and antibiotics. Therefore, our study was the first approach testing the synergistic effect of the plants used (*I. viscosa* and *A. valentinus*) and the interaction combinations of extract/extracts.

In conclusion, this work confirms the antibacterial activity of methanolic extracts and essential oils of *I. viscosa* and *A. valentinus*. It shows their potential use as agents which enhance antibiotic activity. This indicates that these plants may be useful for developing alternative compounds to treat bacterial infections. The use of extracts as antimicrobial agents shows allow risk of increasing resistance to their action, because they are complex mixtures, making microbial adaptability very difficult and it is also reported to have minimal side effects.

Further study can be made to isolate the pure compounds responsible for the activity from the extracts.

4. ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank all the individuals and institutions who made this survey possible

5. REFERENCES

- [1] Vanden BDA and Vlietinck AJ (1991) Screening methods from antibacterial and antiviral agents from higher plants. Academic press. 46 – 57.
- [2] Olgica Stefanović and Ljiljana Comić. (2012) Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (01): 01-05.
- [3] Hanan H Abd El-Kalek and Eman A Mohamed (2012) Synergistic effect of certain medicinal plants and amoxicillin against some clinical isolates of methicillin – resistant *staphylococcus aureus* (mrsa). International Journal of Pharmaceutical Applications. 3:3. 387-398.
- [4] Wamidh H Talib, Musa H Abu Zarga and Adel M Mahasneh (2012) Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*, *Molecules*, 17, 3291-3303.
- [5] Chaouki Selles, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou , Fawzia Beddou , Alain Muselli et al., (2013) Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters.
- [6] Aicha Lassouani Tadjeddine, Nadia Kambouche, Houria Medjdoub, Boumediène Meddah, Amadou Dicko et al., (2013) Antidiabetic effect of *Anacyclus valentines* L. aqueous extract in normoglycemic and streptozotocin induced-diabetic rats. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics. AJPCT 5 424-43.
- [7] K. Boungab, A. Tadjeddine , L. Belabid, Z. Fortas, F. Lazrag (2011) Antifungal activity of extracts of *Anacyclus valentinus* L. on phytopathogenic fungi. 4th International Conference on Alternative Methods in Crop Protection. Evolution of French and European regulatory frameworks. Innovative new means and strategies, New Century, Lille, France. 230- 238.
- [8] Sawsan Abuhamdah, Rushdie Abuhamdah, Suleiman Al-Olimat and Paul Chazot (2013) Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan. *European Journal of Medicinal Plants* 3: 3 394 – 404.
- [9] Fawzia Atik Bekkara, Nabila Benhammou and Tatjana Kadifkova Panovska (2008) Biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *Inula viscosa* from the Tlemcen region of Algeria. AFS 30: 3 132 – 139.

-
- [10] Stephen G, Jenkins, PhD, and Audrey N, Schuetz, MD, MPH (2012) Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. Symposium on Antimicrobial Therapy, Mayo Foundation for Medical Education and Research, March; 87 (3):290-308.
- [11] OMS (2008) Standardization of antimicrobial susceptibility testing in human medicine nationwide. 5th Edition.
- [12] H. Jacquiera, P. Cruaud, I. Poilane, E. Lachassinne, J. Gaudelus and A. Collignon (2007) In vitro activities of moxifloxacin (8-methoxyquinoline) alone or in combination with cefotaxime on group B streptococci, ScienceDirect. *Pathologie Biologie* 55. 412-417.
- [13] Mohamed Mahmoud Joude (2013) The Antibacterial Effect of Some Medicinal Plant Extracts and their Synergistic Effect with Antibiotic and Non-antibiotic Drugs, Biological Sciences Master Program, Faculty of Science, Islamic University-Gaza. P34.
- [14] Smith RL, Cohen SM, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, et al., (2005) A procedure for the safety evaluation of natural flavour complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry. Toxicol* 43 345-363.
- [15] Nawel Kheyer, Dahia Meridja and Kamel Belhamer (2014) Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products* 2:1 18-26.
- [16] Ali-Shtayeh MS, Reem MR Yaghmour, Faidi YR, Khalid Salem, Al-Nuri MA (1998) Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 60.265-271.
- [17] Khadija Laghrifi, Mostafa El Idrissi, Youssef Makoudi, Rachad Alnamer (2013) *In Vitro* Antibacterial Activity Of The Methanolic And Ethanolic Extract Of *Inula Viscosa* Used In Moroccan Traditional Medicine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* 2: 5 3963-3976.
- [18] Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA (2001) Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *J Ethnopharmacol*, 77: 117-121.
- [19] Alarcon De L, Lopez C and Motilva V (1993) Gastroprotection and Prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica*, 59. 497-501.
- [20] Olufunmiso O Olajuyigbe and Anthony J Afolayan (2012) Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. With Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences, Int. J. Mol. Sci.* 13. 8915-8932.

- [21]Olgica Stefanović and Ljiljana Comic (2012) Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics, Journal of Applied Pharmaceutical Science 02:01 01-05.

How to cite this article:

Side Larbi K, Meddah B, Tir Touil Meddah A and Sonnet P. The antibacterial effect of two medicinal plants *inula viscosa*, *anacyclus valentinus* (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. J. Fundam. Appl. Sci., 2016, 8(2), 244-255.

Central Analgesic Property of Extracts and Essential Oils from *Inula viscosa* And *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) In Wistar Rats

Khadidja SIDE LARBI ^{a*}, Boumediene MEDDAH ^b, Aicha TIR TOUIL MEDDAH ^c, Pascal SONNET ^d

^{a,b,c} Bioconversion Research Laboratory, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of SNV, University of Mascara, Algeria

^d Laboratory of Glucides-Team Thera- FRE-CNRS 3517, Faculty of Pharmacy, University of Picardie, Amiens, France

Received: June 2, 2016

Accepted: August 4, 2016

ABSTRACT

The methanolic extracts and essential oils of *Inula viscosa* and *Anacyclus valentinus* were screened for their central analgesic activity by the tail immersion method *in vivo* using rats. Methanolic extracts at doses of 300 and 500 mg/Kg, essential oils at doses of 0.06 and 0.1ml/Kg and standard drugs (paracetamol and tramadol) were orally administered to animals. A significant ($p < 0.05$) analgesic effect comparable to the standard drugs was shown and the most important effect was recorded to the methanolic extract of *I. viscosa* (500mg/Kg) with a latency time of 15.76 ± 0.03 Sec and a percentage analgesia of 83%.

KEYWORDS: central analgesic, *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus*, tail immersion, polyphenols, essential oils.

1. INTRODUCTION

Herbal medicine has known for a few years back into favor. Today, natural products play an important role in the discovery of new drugs. Algeria is indeed recognized by its varietal diversity in medicinal and aromatic plants, the *Asteraceae*. Also known as *Compositae*, this family is one of the most important and largest plant families with over 1000 genera and 23000 species [1, 2].

Our choice fell on two annual medicinal plants in this family: The sticky fleabane (*Inula viscosa* or *Dittrichia viscosa*) and valence anacycle (*Anacyclus valentinus*). Traditional data report that these plants are known for their antifungal [3, 4], anti-diabetic [5, 6] and anti-inflammatory activities [7]. In some parts of the country, *A. valentinus* is often used in culinary preparations [8].

Pain is defined as an undesirable sensory and emotional experience associated with potential or actual tissue damage [9]. In many cases, it represents the only symptom for the diagnosis of several diseases. It is associated with necrosis, inflammation, spasm, asthma, surgical interventions, trauma and rheumatoid arthritis. In pain, motivational, affective, and cognitive aspects are involved [10, 11].

Drugs which are in use for the management of this disorder are peripheral analgesic (salicylic acid) and central analgesic (opioids) [12]. Opiate analgesic drugs, which are important for the treatment of chronic pain, are generally considered to act on specific receptors in different regions of the central nervous system [13].

However, the prolonged use of these modern drugs may cause side and toxic effects, such as hepatotoxicity and gastric disorders. In addition, opiates can develop dependence [13]. Consequently, there is a need to develop new analgesic agents with minimum side effects.

This study therefore aims at examining the central analgesic action of the methanolic extracts and essential oils of *Inula viscosa* and *Anacyclus valentinus* on male Wistar rats.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Paracetamol (Doliprane [®]) and Tramadol (Supramadol [®]) which is a centrally acting opioid analgesic were obtained from a local pharmacy and diluted in sterile normal saline.

2.2. Animals

The *in vivo* tests were carried out in accordance with ethical guidelines and were performed on male Wistar rats "*Rattus norvegicus*" (weighing 150 – 200 g). These animals were provided by the Experimental Station of the University of Mascara/Algeria. They were kept at a temperature of 24 ± 2 °C with a humidity of 50 - 60 % and a 12/24 hour photoperiod and were allowed for food and water *ad libitum*. The rats were fasted for 12 hours before administration of products.

*Correspondent author: Khadidja SIDE LARBI, Bioconversion Research Laboratory, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of SNV, University of Mascara, Algeria.
Email: khadidja.sid@hotmail.com, Phone: 00213558067425

2.3. Plant material

The plant material consists of leaves and flowers of *I.viscosa* from Chorfa in the region of Mascara and *A.valentinus* from El Bayadh/Algeria. Both plants were harvested in October- December under the control of botanists from the University of Mascara.

2.4. Preparation of methanolic extracts

The collected plants were dried under shade at room temperature (27- 30°C) for 15-30 days, and then pulverized to fine powder. The methanolic extract of both plants was obtained by maceration of 30g of powder in 300 ml of methanol (80%) for 24h at room temperature with constant stirring. The same powder was extracted two times. To remove the solvent, combined filtrates obtained were concentrated under reduced pressure and dried at 45°C [14, 15].

2.5. Isolation of essential oils

100g of collected parts mixed with 1000 ml were hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus for 3h [16]. Cyclohexane was used as a collecting solvent, which was removed under reduced pressure in a rotary evaporator [17].

The yields of methanolic extracts and essential oils of *I. viscosa* and *A. valentinus* were calculated according to [18] and both extracts were kept at (4°C) for bioassay.

2.6. Acute toxicity

The acute toxicity test for methanolic extracts and essential oils obtained from *I. viscosa* and *A. valentinus* were performed as per OECD guideline 423. Groups of ten rats (5 males and 5 females) received doses of 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500 mg/kg of methanolic extract and doses of 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ml/kg of essential oils from both plants, while the control group received saline (10ml/Kg) by orogastric route. The treated groups were observed for three hours following administration, and up to 14 days. During this period, mortality rate and all physical and behavioral changes were recorded [19, 20].

2.7. Tail immersion test

Rats were divided into groups of five each. Saline (10ml/kg), paracetamol (100mg/Kg), Tramadol (30mg/kg), methanolic extracts at doses of 300 and 500 mg/kg and essential oils at doses of 0.06 and 0.1 ml/Kg were orally administered.

The anti-nociceptive or the central analgesic activity of the methanolic extracts and essential oils was evaluated by the tail-flick test using thermal stimuli method [21]. About 5 cm from the distal end of the tail of each rat was immersed in warm water maintained at 55 ± 2 °C. The withdrawal time of the tail from hot water (in seconds) was noted as the reaction time or tail flick latency. The maximum reaction time was fixed at 16 sec in order to prevent the tissue damage [22]. The reading of reaction time was recorded 15, 30, 45 and 60 minutes after the administration of products [23]. Percentage analgesia at 30mn was calculated using the following formula [23]:

$$\% \text{ Analgesia} = \frac{\text{TL} - \text{BL}}{\text{ML} - \text{BL}} \times 100$$

Where: ML is the Maximum latency or cut off time, TL is the Test latency and BL correspond to the Basal latency or control latency

2.8. Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The statistical significance between control and treated groups were analyzed using ANOVA single factor for multiple comparisons and a value of $p \leq 0.05$ was taken to be significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Yields and organoleptic properties of methanolic extracts and essential oils

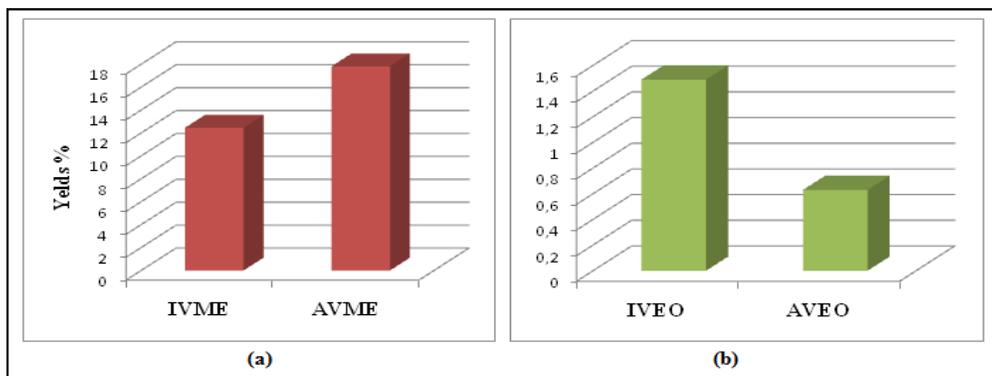


Fig. 1. Extraction yields of methanolic extracts (a) and essential oils (b) obtained from both plants

Methanolic extracts of the two plants have a dark color and strong odor, with a viscous aspect of *A. valentinus* (AVME), which registered the higher yield (17.82%) compared to the methanolic extract of *I. viscosa* (IVM) (12.46%). The yield of IVME obtained in this work is close to that obtained by Gökbulut and his collaborators in 2013[24], but it is lower to that obtained by Laghrifi *et al.* (2013) [25] using absolute methanol. Previous work on the species of the genus *Anacyclus* have registered lower yields varying between 1.12 and 3.72% [26, 27]. Essential oils of both plants have a liquid appearance, yellow color with strong and characteristic odours. In profitability side, essential oil of *I. viscosa* (IVEO) gave the highest proportion with 1.49%, while the essential oil of *A. valentinus* (AVEO) presented 0.63%. This may be due to the climatic conditions of the plant. The yield depends on the geographical origin of the plant, the season of harvest, method and conditions of the extraction. It is only relative [28, 29].

3.2. Acute toxicity

Oral administration of different doses of methanolic extracts (from 300 to 2500 mg/Kg) and essential oils (from 0.3 to 3 ml/Kg) of *I. viscosa* and those of *A. valentinus* did not change the behavior of animals and did not cause any death during the observation period. The LD50 is assumed therefore higher than 2500 mg/Kg for the methanolic extracts and 3ml/kg for essential oils. Hammouchi [30] by conducting investigations and ethnobotanical studies on food, aromatic condimental, medicinal and toxic plants in Morocco reported that *I. viscosa* is a non-toxic medicinal plant, while *A. valentinus* is a medicinal plant, aromatic, condiment and spice considered.

All extracts can be considered to be non-toxic up to the doses tested. This test was important to define the doses for pharmacological activity and it is also a preliminary step to value medicinal plants.

3.3. Effect of methanolic extracts and essential oils on tail immersion

The results of the central analgesic action exhibited by studied plant extracts are shown in figures 2 and 3.

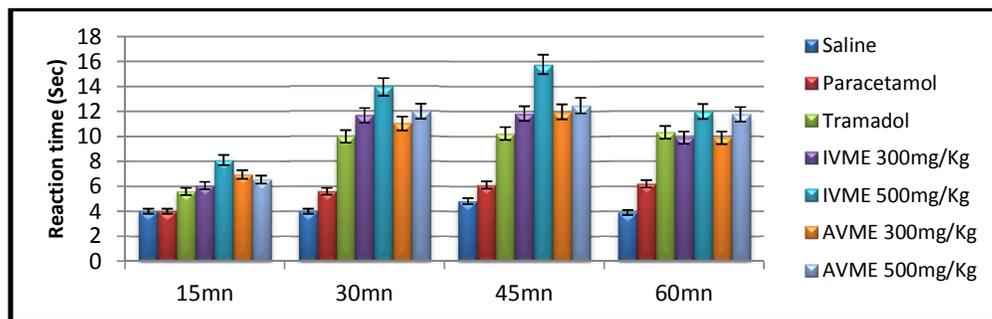


Fig.2. Reaction time of saline, standard drugs and methanolic extracts of *I. viscosa* and *A. valentinus* in tail immersion test on rats

The tail immersion method indicated that the central analgesic effect of the methanolic extracts of plants tested was significant and dose dependent as revealed by the increased reaction time after giving thermal stimulus to the rats.

For the tested drugs, analgesic action peaking at 45 min and the highest activity was recorded to IVME at 500mg/Kg with a latency time of 15.76 ± 0.03 Sec, followed by AVME at 500mg/Kg with a reaction time of 12.47 ± 0.034 Sec.

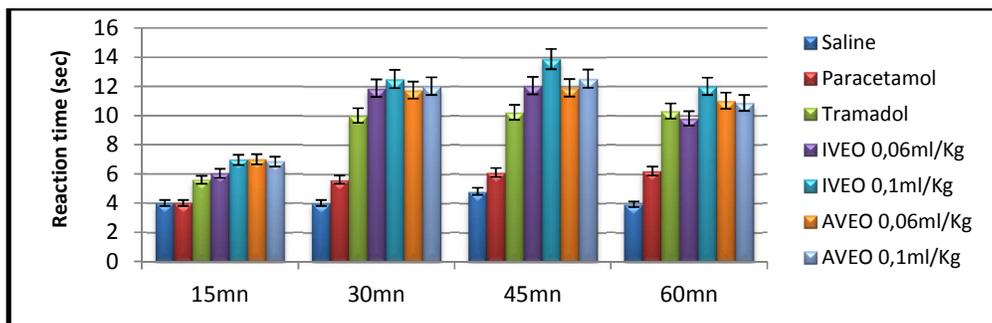


Fig.3. Reaction time of saline, standard drugs and essential oils of *I. viscosa* and *A. valentinus* in tail immersion test on rats

The analgesic activity was observed 30 min and up to 45mn after the oral administration of the essential oils obtained from *I. viscosa* and *A. valentinus* (60 and 100 µl/kg) which was practically higher than that seen with tramadol. This was evidenced by an increase in the latency of the avoidance response from 6.034 ± 0.030 to 12.05 ± 0.036 , 6.956 ± 0.032 to 13.87 ± 0.052 , 6.99 ± 0.026 to 11.9 ± 0.036 and 6.84 ± 0.033 to 12.52 ± 0.024 Sec for IVEO (0.06ml/Kg), IVEO (0.1ml/Kg), AVEO (0.06ml/Kg) and (AVEO) 0.1ml/Kg respectively.

3.4. Percentage analgesia

Table 1.Percentage analgesia of plants extracts and standard drugs

Groups		%analgesia
Standard drugs	Paracetamol	13.33
	Tramadol	50
IVME	300mg/Kg	64
	500mg/Kg	83
AVME	300mg/Kg	58.58
	500mg/Kg	66.66
IVEO	0.06ml/Kg	65.58
	0.1ml/Kg	70.9
AVEO	0.06ml/Kg	64.58
	0.1ml/Kg	66.75

The percentages analgesia of methanolic extracts and essential oils of *I. viscosa* and *A. Valentinus* were higher than that of tramadol and paracetamol (table 1). The highest percentage was registered for IVME at 500 mg/Kg (83%).

In fact, *I. viscosa* is more active than *A. valentinus*. They nevertheless present a central analgesic activity higher than that of Tramadol (30 mg/kg). This activity began at 30minutes after the administration of the drugs tested, which indicates a very rapid absorption from the gastrointestinal tract [31]. In contrast to peripheral analgesics, drugs which act mainly centrally, such as tramadol are actives on central nervous system [32]. It means that the analgesic effect of all extracts tested is due to the activation of the opioid receptor stimulation.

The strong analgesic activity of *I. viscosa* and *A. valentinus* in this study is often attributed to the phytochemicals presents in the extracts such as flavonoids, phenolic acids and terpenoids by inhibiting prostaglandins synthesis and central nervous system [33].

The antinociceptive effect of methanolic extracts and essential oils tested are consistent with those reported for the effects of extracts from medicinal plants especially that belonging to the family of Asteraceae such as *Matricaria aurea* [34] and *Ageratum fastigiatum* [35]. In fact, other studies describe the analgesic effects of medicinal plants [31, 36, 37].

4. Conclusion

The results of this study demonstrate potent central analgesic activity of methanolic extracts and essential oils obtained from *I. viscosa* and *A. valentinus* against thermal stimulus pain. Further, works like isolation, structural elucidation and screening of above active principles need to be done to pin the activity of this drug. Combination of these natural products with conventional drugs may also be done.

Acknowledgments

The authors are thankful to all the individuals and institutions who made this survey possible.

Declaration of interest: The authors declare no conflicts of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

REFERENCES

1. Souza V. C. and Lorenzi H., 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
2. Guignard J.L., 1994. Abrégé Botanique, 9ème Ed. 204.
3. Bssaïbis F., Gmira N., Meziane M., 2009. Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., 3 (1) : 44-55.
4. Boungab K., Tadjeddine A., Belabid L., Fortas Z., Lazrag F., 2011. Antifungal activity of extracts of *Anacyclus valentinus* L. on phytopathogenic fungi. In the proceedings of the 4th International Conference on Alternative Methods in Crop Protection. Evolution of French and European regulatory frameworks. Innovative new means and strategies, New Century, Lille, France. 230- 238.
5. Máñez S., Hernández V., Giner R-M., Ríos J-L., Recio M.C., 2007. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inulaviscosa*. Fitoterapia 78: 329–331.
6. Lassouani Tadjeddine Aïcha, Kambouche Nadia, Medjdoub Houria, Meddah Boumediène, Dicko Amadou et al., 2013. Antidiabetic effect of *Anacyclus valentinus* L. aqueous extract in normoglycemic and streptozotocin induced-diabetic rats. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics. AJPCT, 5 :424-43.
7. Hernández, V.M., R. Carmen, M. Salvador, M.G. Rosa and L.R. José, 2007. Effects of naturally occurring dihydro flavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sci.*, 81: 480–488
8. Hamzi S. & Belhadj K. 2008. Contribution à l'étude de l'activité antifongique des polyphénols extraits de deux plantes médicinales (*Anacyclus valentinus* L et *Anacyclus pyræthum*).
9. IASP, 2010. Pain Terminology. [http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_ Definitions & Template=/CM/HTML Display. Cfm & Content ID=1728#Pain](http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions_&Template=/CM/HTML_Display.Cfm&ContentID=1728#Pain) (Accessed on 8 December).
10. Bonica J.J., 1979. The need of a taxonomy. *Pain* 6(3): 247-248.
11. Raj P.P., 2007. Taxonomy and classification of pain. In: Kreitler S, Beltrutti D, Lamberto A, Niv D, editors. The handbook of chronic pain. New York: Nova Biomedical Books, p. 41-56.
12. Besra, S.E., R.M. Sharma. and A. Gomes, 1996. Anti-inflammatory effect of petroleum ether extract of leaves of *Litchi chinensis* Gaertn (Sapindaceae). *J. Ethnopharmacol.* 54 1-6.
13. Bannwarth B, Pehourcq F., 2003. Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues (in French). *Drugs* 63, 5–13.
14. Abuhamdah Sawsan, Abuhamdah Rushdie, Al-Olimat Suleiman and Chazot Paul, 2013. Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(3) :394 – 404.
15. Hemamalini K., Naik Om Prasad, Ashok P., 2010. Anti inflammatory and analgesic effect of methanolic extract of *Anogeissus acuminata* leaf. *Int J Pharm Biomed Res.*, 1(3) :98-101.
16. Atik Bekkara Fawzia, Benhammou Nabila and Kadifkova Panovska Tatjana, 2008. Biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *Inulaviscosa* from the Tlemcen region of Algeria. *AFS*, 30 (3) :132 – 139.
17. European Pharmacopeia (4th edition). Council of Europe: Strasbourg Cedex, France, 2002; pp.1 83-1 84.
18. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C., 2008. Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol. Vol.* 33: 372-379.
19. Khan H, Saeed M, Gilani AUH, Khan MA, Dar A, Khan I, 2010. The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models. *J Ethnopharmacol*, 127(2):521 –527.

20. Kangralkar V. A, Biradar Sandeep, Mandavkar Yuvaraj, Thakur Megha, Chougule Nilesh, 2010. Anti-inflammatory, Antiarthritic, Analgesic and Anticonvulsant Activity Of Cyperus Essential Oils. *Int J Pharm PharmSci.*, 2 (4) :112-115.
21. Dykstra LA, Woods JH. A., 1986. Tail withdrawal procedure for assessing analgesic activity in Rhesus monkeys. *Journal of pharmacological Methods*, 15:263-26
22. Kumar Subedi Nirmal, Abdur Rahman S. M., and Ahsanul Akbar Mohammad, 2016. "Analgesic and Antipyretic Activities of Methanol Extract and Its Fraction from the Root of *Schoenoplectus grossus*," Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2016, Article ID 3820704, 8 pages,
23. Sook-Ha Fan, Noraisah Akbar Ali, and Dayang Fredalina Basri, 2014. Evaluation of Analgesic Activity of the Methanol Extract from the Galls of *Quercus infectoria* (Olivier) in Rats," Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol., Article ID 976764, 6 pages,
24. Gökbulut A, Özhan O, Satilmis B, Batçıoğlu K, Günal S, Şarer E., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected inula species from Turkey. *Natural Product Communications*. 8(4):475-478.
25. Laghrifi Khadija, Mostafa El Idrissi, Youssef Makoudi, RachadAlnamer, 2013. *In Vitro* Antibacterial Activity Of The Methanolic And Ethanolic Extract Of *Inula Viscosa* Used In Moroccan Traditional Medicine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical SCIENCES*, 2 (5) : 3963-3976.
26. Hamimed S., 2009. *Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'Anacyclus pyrethrum* L. Département de chimie, faculté des sciences exactes. Université Mentouri Constantine, Algérie.
27. Sujith K, Ronald D, Suba V., 2011. Antioxidant activity of ethanolic root extract of *Anacyclus pyrethrum*, *International Research Journal of Pharmacy*; 222-226.
28. Smith RL, Cohen SM, Doull J, Feron VJ, Goodman JJ, et al., 2005. A procedure for the safety evaluation of natural flavour complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry. Toxicol.*, 43: 345-363.
29. Side Larbi K, Meddah B, Tir Touil Meddah A and Sonnet P., 2016. The antibacterial effect of two medicinal plants *inulaviscosa*, *anacyclusvalentinus* (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 8(2):244-255.
30. Hmouchi M., 1997. Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. In : Heywood V.H. (ed.), Skoula M. (ed.). Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region. Chania : CIHEAM, p. 89-108 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 23)
31. Naveed Muhammad, Muhammad Saed and HaroonKha., 2012. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*,
32. Shreedhara C. S., Vaidya V. P., Vagdevi H. M., Latha K. P., Muralikrishna K. S, and Krupanidhi A. M., 2009. "Screening of *Bauhiniapurpurea* Linn. For analgesic and anti-inflammatory activities," *Indian Journal of Pharmacology.*, 41(2):75-79.
33. Mahmoud Bahmani, Hedayatollah Shirzad, Maedeh Majlesi, Najmeh Shahinfard, Mahmoud Rafieian-Kopaei, 2014. A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*; 7(Suppl 1): S43-S53.
34. Esam QNAIS, 2011. The analgesic effect of the ethanolic extract of *Matricaria aurea*. *Turk J Biol* 35 (2011) 347-352.
35. Glauciemar, D. V., Orlando V. S., Celia H. Y and Maria A. C., 2009. Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Records of Natural Products Journal*. 3(1): 52-57.
36. Gulnur, T., Merve, M., Erdem, Y., Mustafa, A., 2004. Main Flavonoids of *Tilia argentea* DESF. ex DC. Leaves. *Turk. J. Chem.*, 28:745-749.
37. Bhujbal SS, Chitlange SS, Suralkar AA, Shinde DB, Patil MJ. 2008. Anti-inflammatory activity of an isolated flavonoids fraction from *Celosia argentea* Linn. *J Med Plants Res.*, 2:52-54.