

Université MUSTAPHA Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى أسطembولي
معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire.

THESE de DOCTORAT de 3^{ème} cycle

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Sciences, Technologie et Santé.

Intitulée

Evaluation et évolution du contenu phénolique et huiles essentielles de quelques plantes et fruits sélectionnés de la région de Mascara : application biologique

Présentée par : M^{elle} Maizi Yamina

Soutenue le : 30 /03 /2021

Devant le jury :

Président	Mm. Chouitah O.	Professeur	U. Mascara
Examineur	Mr. Berroukeche A.	Professeur	U. Saida
Examineur	Mr. Kihel M.	Professeur	U. Oran1
Examineur	Mr Hariri A.	Professeur	U. Mascara
Directeur de thèse	Mr. Meddah B.	Professeur	U. Mascara

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

{ يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ

آمَنُوا مِنْكُمْ

وَالَّذِينَ أُوتُوا

الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ {

[المجادلة : 11]

صَلَّى عَلَى اللَّهِ الْعَظِيمِ

Remerciements

*Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à **ALLAH** qui m'a donné la force, le courage et la patience lors de la réalisation de ce travail.*

Au Professeur MEDDAH B.

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.

Au Professeur TIRTOUIL A.

Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche, merci de m'avoir prodigué avec vos conseils judicieux et pour l'attention accordée à cette étude.

Au Professeur CHOUITAH O.

Je vous remercie d'avoir accepté de présider les membres du jury et pour l'honneur que vous me faite.

Aux Professeurs KIHIL M., BERROUKECHE A. et HARIRI A.

Je vous remercie d'avoir gentiment accepté de participer à l'évaluation de cette thèse, conscient du travail que cela représente, et pour leur patience lors de sa lecture.

Au Dr. BOUBAKEUR B.

Je tiens à vous remercier pour votre aide, vos orientations et vos conseils enrichissants.

*Mes vifs remerciements s'adressent aussi aux Mr **BERERHI El Hacem** et Mme **BENHAMZA L.** de l'institut des sciences vétérinaires d'El Kfroub pour leurs aides à la lecture des coupes histologiques.*

Un remerciement spécial à ma famille notamment à mes très chers parents, à mes frères et sœurs, et à tout ceux qui mon aidé et soutenu pour la réalisation de cet ouvrage, à Asoum, Soumia, Khadidja, Asma, Foufa, Ikram, Souhila, Sara, Houda.....

J'exprime également mes sincères remerciements au personnel de l'animalerie : Aziz, la directrice de la ferme expérimentale..., au personnel des laboratoires pédagogiques de l'université de Mascara (Djelloul, Aicha, Noura,...), et au personnel du laboratoire REM de l'université San Antonio de Murcia (Espagne), qui mon chaleureusement accueillit et aidée.

Merçi à vous tous...

Résumé

Notre objectif vise à la valorisation de plantes médicinales ; la plante *Teucrium polium* (TP) et le fruit *Punica granatum* (PG) récoltés de la région de Mascara. Cette thèse porte sur l'étude de l'efficacité des molécules bioactives « polyphénols et huiles essentielles » dans le traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

Cette étude a été entreprise pour étudier l'évolution des composants polyphénoliques et la variation de la composition chimique de l'huile essentielle dans les différents stades phénologiques et leurs activités antioxydantes utilisant la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et la méthode de piégeage du radical libre DPPH, et évaluer la toxicité et l'effet anti-inflammation intestinale de ces molécules actives dans le modèle d'inflammation intestinale induite chez le rat.

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne des *T. polium* L. par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement de $0.82 \pm 0.027\%$ pour le stade S1 et $0.56 \pm 0.023\%$ pour le S2. L'analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) des huiles essentielles révèle que les huiles essentielles de TP collectée dans la région de Mascara présentent un polymorphisme chimique très important, les composés majoritaires sont: limonène (29.87%), spathulenol (17.24%), camphor (8.20%), pinocarvone (7.76%), tau-cadinol (5.41% / 7.88%), oxyde de pinène (4.78%) et α -terpinéol (4.6%) pour la période végétative. Alors que, limonène (26.39%), spathulenol (13.29%), pinocarvone (5.60%), β -Myrcènes (4.02%), tau-cadinol (3.67%), et α - phellandrène (3.45%) sont les principaux constituants pour celles de floraison.

Les deux variétés de PG sont riches en flavonoïdes (catéchine, l'épicatéchine, le kaempférol glucoside, kaempférol, quercétine, myricétine, procyanidine, épigallocatechine gallate), identifiées par l'HPLC-DAD. L'analyse a révélé également la présence d'acide gallique, acide vanillique et acide caféique et resveratrol. Tandis que la TP est également riche en flavonoïdes.

Selon les résultats obtenus, tous les extraits présentaient une activité antioxydante importante, et c'est l'extrait acétonique de l'écorce de PG qui est doté d'une activité antioxydante très importante avec $IC_{50} = 0.06 \pm 0.02$ mg/ml par rapport à celle de l'antioxydant de synthèse (a. ascorbique) 0.0029 ± 0.0001 mg/ml. Ces premiers résultats suggèrent l'importance des composés phénoliques contenus dans l'extrait comme une alternative thérapeutique.

Les trois extraits sélectionnés sont dépourvus de toxicité chez le modèle rat. Les polyphénols de PG et TP ont montré une activité anti-inflammatoire significative par rapport l'huile essentielle de TP dans le modèle d'inflammation intestinale induite chez le rat. Cette activité est exprimée par le rétablissement des valeurs des marqueurs cliniques, biochimiques et microbiologiques avec une certaine différence dans le degré d'influence.

Mots-clés : *Teucrium polium* L., *Punica granatum* L., Mascara, antioxydante, anti-inflammatoire, CPG-SM, HPLC-DAD, toxicité, inflammation intestinale.

Abstract

Our goal is to valuing medicinal plants, the *Teucrium polium* plant and the *Punica granatum* fruit collected from the Mascara region. This work concerns the study of the effectiveness of bioactive molecules "polyphenols and essential oil" in the treatment of chronic inflammatory bowel diseases (IBD).

This study was undertaken to evaluate the evolution of polyphenolic components and the variation of the chemical composition of the essential oil in the different phenological stages and their antioxidant activities using the FRAP method (Ferric Reducing Antioxidant Power) and the trapping method of free radical DPPH, and evaluate the toxicity and anti-inflammation intestinal effect these active molecules in the intestinal inflammation model induced in rats.

The extraction of the essential oil from the aerial part of the TP by hydro distillation reached a yield of $0.82 \pm 0.027\%$ for the S1 stage and $0.56 \pm 0.023\%$ for the S2. Gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GPC / MS) of essential oils reveals that essential oils of *T. polium* L. collected from the Mascara region exhibit a very significant chemical polymorphism, the majority compounds are: limonene (29.87%), spathulenol (17.24%), camphor (8.20%), pinocarvone (7.76%), tau-cadinol (5.41% / 7.88%), pinene oxide (4.78%) and α -terpineol (4.6%) for the vegetative period. While, limonene (26.39%), spathulenol (13.29%), pinocarvone (5.60%), β - Myrcenes (4.02%), tau-cadinol (3.67%), and α -phellandrene (3.45%) are the main constituents for those of flowering stage.

Both varieties of PG are rich in flavonoids (catechin, epicatechin, kaempferol glucoside, kaempferol, quercetin, myricetin, procyanidin, epigallocatechin gallate), identified by HPLC-DAD. The analysis also revealed the presence of gallic acid, vanillic acid and caffeic acid and resveratrol. While TP is also rich in flavonoids.

According to the results all the extracts exhibited a significant antioxidant activity, and it is the acetone extract of peel of PG which is endowed with a very important antioxidant activity with $IC_{50} = 0.06 \pm 0.02$ mg / ml compared to synthetic antioxidant (a. ascorbic) 0.0029 ± 0.0001 mg / ml. These first results suggest the importance of the phenolic compounds contained in the extract as an alternative in therapy.

The three selected extracts are devoid of toxicity in the rat model. The polyphenols of PG and TP showed significant anti-inflammatory activity compared to the essential oil of TP in the model of intestinal inflammation induced in rats. This activity is expressed by the restoration of the values of clinical, biochemical and microbiological markers with some difference in the degree of influence.

Keywords: *Teucrium polium* L., *Punica granatum* L., Mascara, antioxidant, anti-inflammatory, CPG-MS, HPLC-DAD, toxicity, inflammatory bowel diseases,

ملخص

هدفنا هو تقييم النباتات الطبية، نبات *Teucrium polium* وفاكهة الرمان *Punica granatum* التي تم جمعها من منطقة معسكر. يتعلق بدراسة فعالية الجزيئات النشطة بيولوجيا "البوليفينول والزيوت الأساسية" في علاج أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة.

أجريت هذه الدراسة لتقييم تطور مكونات البوليفينول واختلاف التركيب الكيميائي للزيت العطري في المراحل الفينولوجية المختلفة وأنشطتها المضادة للأكسدة باستخدام طريقة FRAP (القدرة المضادة للأكسدة الحديدي) وطريقة الاصطياد الجذور الحرة DPPH. لتقييم سمية و تأثير مكافحة هذه الجزيئات النشطة في علاج التهاب الأمعاء في نموذج من التهاب الأمعاء الناجم في الفئران

سمح استخراج الزيت العطري من الجزء الهوائي من TP عن طريق التقطير المائي بالحصول على عائد $0.027 \pm 0.82\%$ للمرحلة S1 و $0.023 \pm 0.56\%$ لـ S2.

يكشف التحليل الكروماتوغرافي (CPG / MS) للزيوت الأساسية أن الزيوت الأساسية من *T. polium* L. التي تم جمعها في منطقة معسكر تُظهر تنوع كيميائي مهمًا للغاية، ومعظم المركبات هي: ليمونين (29.87٪)، سباتولينول (17.24٪)، كافور (8.20٪)، بينوكارفون (7.76٪)، تاو-كادينول (5.41٪ / 7.88٪)، أكسيد البينين (4.78٪) وألفا تربينول (4.6٪) للفترة الخضرية S1. بينما يعتبر الليمونين (26.39٪)، سباتولينول (13.29٪)، بينوكارفون (5.60٪)، بيتاميغسان (4.02٪)، تاو كادينول (3.67٪)، ألفا فيلاندين (3.45٪). المكونات لتلك S2 المزهرة.

كلا النوعين من الرمان PG غنية بالفلافونيدات (كاتشين، إبيكاتشين، كايمفيرول جلوكوزيد، كايمفيرول، كيرسيتين، ميريسيتين، بروسانيدين، إبيغالوكاتشين جالاتي) التي تم تحديدها بواسطة HPLC-DAD. وكشف التحليل أيضًا عن وجود حمض الغال وحمض الفانيليك وحمض الكافيين والريسفيراترول. بينما TP غنية أيضًا بالفلافونويد.

وفقًا للنتائج، أظهرت جميع المستخلصات نشاطًا مضادًا للأكسدة بشكل كبير، و المستخلص الأسيتون من غشاء الفاكهة رمان PG الذي يتمتع بنشاط مهم جدًا كمضاد للأكسدة مع $IC_{50} = 0.06 \pm 0.02$ مجم / مل مقارنة بمضادات الأكسدة الاصطناعية (أ. أسكوربيك) 0.0001 ± 0.0029 مجم / مل. تشير هذه النتائج الأولية إلى أهمية المركبات الفينولية الموجودة في المستخلص كبديل في العلاج.

المستخلصات الثلاث المختارات خالية من السمية في نموذج الفئران. أظهرت البوليفينول من *Punica granatum* و *Teucrium polium* نشاطًا كبيرًا مضادًا للالتهابات مقارنة بالزيت الأساسي لـ TP في نموذج التهاب الأمعاء المستحث في الفئران. يتم التعبير عن هذا النشاط من خلال استعادة قيم المؤشرات السريرية والكيميائية الحيوية والميكروبيولوجية مع بعض الاختلاف في درجة التأثير.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum* L، *Teucrium polium* L، معسكر، مضادات الأكسدة، السمية، مضاد للالتهابات، HPLC-DAD، CPG-SM، التهاب الأمعاء.

Table des Matière

Table des matières	I
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	X
Glossaire	XI
Introduction générale	1
Etude Bibliographique	
Chapitre I: Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	
1. Tube digestif: organisation, histologie et fonction	3
2. Barrière et perméabilité intestinale	4
2.1. Barrière mécanique	5
2.2. Barrière écologique : Microbiote intestinal	5
2.3. Barrière physique : Epithélium intestinal	6
2.4. Barrière immunologique : Système immunitaire intestinal	9
3. Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	10
3.1. Classification	11
3.2. Sémiologie des MICI	12
3.3. Épidémiologie	13
3.4. Étiologie	14
3.4.1. Facteurs génétiques	14
3.4.2. Facteurs environnementaux	15
3.4.3. Facteurs microbiens	15
4. Physiopathologie	15
5. Marqueurs de MICI	17
5.1. Biologie standard	17
5.2. Myéloperoxydase	18
5.3. Cytokines	18
5.4. Facteur de transcription NF-κB	18

5.5. Nitric oxyde synthase inductible	19
5.6. Cyclo-oxygénase-2	19
5.7. Statut stress oxydatif	19
5.8. Marqueurs microbiens	21
6.Complications à long terme : Développement de cancers	21
7.Stratégie thérapeutique	22
7.1. Traitements conventionnels actuels	22
7.2. Traitement symptomatiques	23
7.3. Traitement chirurgical	24
7.4. Futures approches thérapeutiques	24
Chapitre II : Phytothérapie : Polyphénols et huiles essentielles	
1.Polyphénols	27
1.1. Classification	27
1.2. Biosynthèse des Polyphénols	30
1.3. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols	30
1.4. Métabolisme & Biodisponibilité des polyphénols	31
1.5. Activités biologiques des polyphénols	32
2. Huiles essentielles	34
2.1. Localisation des HE	34
2.2. Biosynthèse et Chimie des HE	34
2.3. Méthode d'extraction	35
2.4. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles	35
2.5. Toxicité des HEs	36
2.6. Activités biologiques	36
Chapitre III : <i>Teucrium polium</i> & <i>Punica granatum</i>	
1. <i>Teucrium polium</i> L.	37
1.1.Noms vernaculaires	37
1.2.Systématique	37

1.3. Description botanique et répartition géographique	38
1.4. Utilisations en médecine traditionnelle	38
1.5. Données phytochimiques de la plante	38
1.6. Données pharmacologiques et biologiques	39
1.7. Données toxicologiques	39
2. <i>Punica granatum</i> L.	40
2.1. Nomenclature	40
2.2. Systématique	40
2.3. Description botanique	41
2.4. Répartition géographique	41
2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	42
2.6. Données phytochimiques	42
2.7. Données pharmacologiques et biologiques	43
2.8. Données toxicologiques	44
Etude Expérimentale <i>Matériels & Méthodes</i>	
1.Objectifs de l'étude	45
2.Matériels biologiques	46
2.1. Matériel végétal	46
2.2. Modèle animal	47
3.Données bioclimatiques	48
4.Screening phytochimique	48
Etude Phytochimique	49
5.Extraction des principes actifs	49
5.1.Huiles essentielles	49
5.1.1. Extraction	49
5.1.2. Analyse de la composition chimique des HE : CPG-SM	49
5.1.3. Caractéristiques physico-chimiques	50
5.2. Compsés phénoliques	50

5.2.1. Extraction	50
5.2.2. Dosage des polyphénols totaux	50
5.2.3. Dosage des flavonoides	52
5.2.4. Dosage des tannins hydrolysables (TH)	53
5.2.5. Dosage des tanins condensés (TC)	54
5.2.6. HPLC-DAD	54
Evaluation biologique	55
6. Activité antioxydante	55
6.1. Effet scavenger du radical DPPH	55
6.2. FRAP	56
Evaluation Pharmacologique	
7. Toxicité	57
7.1. Toxicité aigüe	57
7.2. Toxicité subaigüe	58
7.3. Suivi de la toxicité	58
8. Activité anti-inflammatoire intestinale	59
8.1. Induction de l'inflammation	61
8.2. Perméabilité intestinale	62
8.3. Sacrifices et Prélèvement des échantillons	63
8.4. Evaluation de l'inflammation	64
8.5. Exploration du stress oxydant	65
8.5.1. Préparation de l'homogénat	65
8.5.2. Peroxydation lipidique	65
8.5.3. Catalase	66
8.5.4. Superoxyde dismutase (SOD)	67
8.6. Evaluation de la translocation bactérienne	67
8.7. Analyse microbiologie	68
8.8. Identification	68

8.8.1. Identification biochimique	68
8.8.2. MALDI-TOF-SM	69
8.9. Etude Histopathologie	70
9. Analyses statistiques	70
<i>Résultats & discussion</i>	
<u>Etude phytochimique</u>	
1. Screening phytochimique	71
2. Extraction des HEs	71
2.1. Rendement & Analyse physico-chimique des HE	71
2.2. Composition chimique des HEs	73
3. Extraction des polyphénols	75
3.1. Rendement d'extraction	76
3.1.1. <i>Punica granatum</i> L	76
3.1.2. <i>Teucrium polium</i> L	77
3.2. Analyse quantitative des polyphénols : dosage colorimétrique & HPLC-DAD	77
3.2.1. <i>Punica granatum</i> L.	78
3.2.2. <i>Teucrium polium</i> L.	83
<u>Evaluation Biologique</u>	
4. Activité antioxydante	88
4.1. Huile essentielle	88
4.2. Polyphenols	89
4.2.1. <i>Punica granatum</i> L.	89
4.2.2. <i>T. polium</i> L.	92
<u>Evaluation Pharmacologique</u>	
5. Toxicité	94
5.1. Toxicité aigue	94
5.2. Toxicité subaigue	99
5.2.1. Chronologie de l'évolution pondérale	100
5.2.2. Poids des organes	101

5.2.3. Données hématologiques	102
5.2.4. Données biochimiques	104
5.2.5. Histopathologie	107
5.2.6. Conclusion	109
6. Anti-inflammatoire intestinale	110
6.1. Paramètres cliniques	110
6.1.1. Indice DAI, la consommation d'aliments & la perméabilité intestinale	110
6.1.2. Ration P/L & pH fécal	115
6.1.3. Analyses sanguines	121
6.2. Masse relative des organes (ROW)	125
6.3. Statut stress oxydatif	128
6.4. Translocation bactérienne (TB)	131
6.5. Etude Histopathologie	140
6.6. Conclusion	144
Conclusion générale	145
Références bibliographiques	147
Annexes	
Publication Scientifique	

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Structure des acides phénoliques	27
2	Activités biologiques de quelques composés phénoliques	33
3	Représentation schématique & Classification botanique de <i>Teucrium polium</i> L	37
4	Classification botanique de <i>Punica granatum</i> L	40
5	Les stations de récolte des plantes étudiées	47
6	Indice d'activité de la maladie (DAI)	65
7	Résultats du screening phytochimique	71
8	Analyse physico-chimique des HES de <i>Teucrium polium</i> L.	72
9	Composition chimique de l'HE de <i>Teucrium polium</i> L. récoltée dans S1 et S2	74
10	Rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs	77
11	Identification des composés phénoliques de 02 variétés (B ,F) de <i>Punica granatum</i> L.par HPLC-DAD	83
12	Identification de composée phénolique de <i>T. polium</i> par HPLC-DAD	87
13	Analyses biochimiques des rats traités par l'extrait acétonique de <i>Punica granatum</i> (P), l'extrait acétonique (TP) et l'huile essentielle (HE) de <i>Teucrium polium</i> dans les conditions de la toxicité aigüe	96
14	Paramètres hématologiques des rats traités avec les extraits phénoliques (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe	103
15	Paramètres hématologiques des rats traités avec l'huile essentielle de <i>T. polium</i> (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe	103
16	Paramètres biochimiques des rats traités avec les extraits phénoliques (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe	106
17	Paramètres biochimiques des rats traités avec l'huile essentielle de <i>T. polium</i> (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe	106
18	Consommation d'aliment et la perméabilité intestinale suivie durant l'inflammation aigüe	114
19	Aliments consommés par différents lots durant l'inflammation chronique	115
20	Perméabilité intestinale suivie durant l'inflammation chronique	115
21	Variation de pH fécal chez les rats témoins et traités durant l'inflammation intestinale	116
22	Variation de quelques paramètres sanguins	121

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Structure de l'épithélium intestinal	4
2	Composition de la flore intestinale	5
3	Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle	8
4	Les jonctions intercellulaires	8
5	Le système immunologique intestinal au niveau de l'intestin grêle et du côlon	9
6	Induction des voies Th1, Th2 et Th17	10
7	Localisation des altérations intestinales caractéristiques de la MC	11
8	Localisation des altérations intestinales caractéristiques de la RCH	12
9	Manifestations extraintestinales des MICI	13
10	Physiopathologie des MICI	17
11	Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO	19
12	Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au cours de l'inflammation intestinale	20
13	Relation schématique entre inflammation intestinale, stress oxydant et cancérogenèse	22
14	Place des thérapeutiques actuelles dans la physiopathologie des MICI	23
15	Récapitulatif du mécanisme d'action des probiotiques	24
16	Classification des polyphénols	28
17	Structure chimique du resvératrol	29
18	Structure générique de flavonoïdes	29
19	Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate	30
20	Métabolisme intestinal des polyphénols chez l'humain	31
21	Mécanismes antioxydante des polyphénols	33
22	Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	36
23	Fleurs et fruits du Grenadier Flora	41
24	Principaux constituants des différentes parties de la grenade	42
25	Effets bénéfiques de grenade	43
26	Représentation schématique des protocoles expérimentaux réalisés dans cette étude	45
27	Données bioclimatiques de la région de Mascara durant la période 2006-2015	48
28	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	52
29	Courbe d'étalonnage de catéchine à 510 nm	53
30	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	53
31	Courbe d'étalonnage de catéchine à 500 nm (TC)	54
32	Réduction d'un radical 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)	55
33	Dissection du rat et prélèvement du sang	57
34	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	60
35	Etude de la perméabilité intestinale	63
36	Sang occulte détecté dans les fèces	64
37	Principe du dosage du malondialdéhyde	66
38	Quelques étapes de l'autoxydation du pyrogallol	67
39	Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	69
40	Préparation et dépôt des échantillons sur une cible MALDI-TOF	70
41	Chromatogramme de l'HE de TP (S1/S2)	74
42	Rendements d'extraction de 02 variétés de <i>Punica granatum</i> L.	76

43	Rendement d'extraction de la plante <i>Teucrium polium</i> L.	77
44	Taux de polyphénols de différents extraits de <i>P. granatum</i>	79
45	Taux de flavonoïdes de différents extraits de <i>P. granatum</i>	79
46	Taux des tannins hydrolysables de <i>P. granatum</i>	80
47	Taux des tannins condensés de <i>P. granatum</i> (variété B et F)	80
48	Taux de polyphénols de <i>T. polium</i>	84
49	Taux de flavonoïdes de <i>T. polium</i>	84
50	Taux de TH de <i>T. polium</i>	85
51	Taux des tannins condensés de <i>T. polium</i>	85
52	IC ₅₀ de l'HE de <i>Teucrium polium</i> (S1 et S2)	88
53	IC ₅₀ des différents extraits de 02 variétés de <i>P. granatum</i>	90
54	Pouvoir réducteur des extraits de <i>P. granatum</i>	91
55	IC ₅₀ des extraits acétonique de <i>T. polium</i> (S1, S2)	92
56	Pouvoir réducteur des extraits acétoniques de <i>T. polium</i>	93
57	Evolution pondéral des rats dans les conditions de la toxicité aigue	94
58	Poids des organes internes chez les rats traités par <i>P. granatum</i>	97
59	Coupes histologiques des reins et des foies chez les rats traités avec les extraits acétoniques de <i>P. granatum</i> (EAP) et <i>T. polium</i> (EAT) dans les conditions de la toxicité aigue	98
60	Coupes histopathologie des reins et des foies chez les rats traités avec l'huile essentielle de <i>T. polium</i> (HET) dans les conditions de la toxicité aigue	99
61	Variation du poids corporel des rats durant le test de la toxicité subaigüe	100
62	Poids des organes des rats traités dans les conditions de la toxicité subaigüe	102
63	Coupes histopathologie des reins et des foies chez les rats traités par <i>P. granatum</i> et <i>T. polium</i> dans les conditions de la toxicité subaigüe	107
64	Comportement des rats durant l'expérimental	111
65	Score clinique DAI de différents lots durant l'inflammation intestinale	113
66	Effet de différents traitements sur la ration P/L des intestins	117
67	Observation macroscopique des intestins de témoin 1) TNT-IA ; 2) TNT14j	118
68	Observation macroscopique des intestins de témoins NT-28j	120
69	Observation macroscopique des intestins de différents lots traités	120
70	Masse relative des organes des rats témoins et des rats traités durant l'inflammation intestinale	127
71	Statut de stress oxydatif chez les différents lots durant l'inflammation intestinale	129
72	La translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-TH1	135
73	La translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-TH2	136
74	La translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-C1	136
75	La translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-C2	137
76	La translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-PRV	138
77	Chromatogrammes MALDI-TOF-SM de quelques souches appartiennent de la famille entérobactériaceae (groupe Indo)	140
78	Coupe histologique au niveau du duodénum	141
79	Villosité intestinale de l'iléon visualisée à faible grossissement (×50)	141
80	Plaques de Peyer (Follicule lymphatique) situé au niveau de la muqueuse de l'iléon, visualisée à moyen grossissement (×100)	141
81	Coupes histologiques des intestins	142

LISTE DES ABREVIATIONS

8-OH-G : 8-hydroxy-guanine ADN : acide désoxyribonucléique Ag : antigène AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens CAC : colitis-associated cancer CAT : catalase COX : cyclooxygénases CPA : cellules présentatrices d'antigène CRC : cancer colorectal CRP : C-reactive protein DAI : Disease activity index DSS : sulfate de dextran sodique EGCG : épigallocatechine-3-gallate EROs : espèces réactives dérivées de l'oxygène FAE : follicle associated epithelium FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations GALT : gut associated lymphoid tissue GPx : glutathion peroxydase GR : glutathion réductase GSH : glutathion GSH-Px : glutathion peroxydase GWAS : genome- wide association study H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène HE : huile essentielle HO• : radical hydroxyle HOCl : acide hypochloreux IFN-α/γ : interféron - α/γ IgA : immunoglobuline A IL : interleukine- iNOS : nitric oxide JAM : Junctional Adhesion Molecules LB : lymphocytes B LP : lamina propria LT : lymphocyte T, LTh : lymphocyte T helper, MALDI - TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation/ Time-Of-Flight MC : maladie de Crohn, MDA : malondialdéhyde MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin MPO : myéloperoxydase NF-κB : Nuclear Factor Kappa B NK : lymphocytes Natural Killer « tueur naturel » NO• : monoxyde d'azote NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain O.M.S : organisation mondiale de la santé O₂'- : anion superoxyde ; OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development	OH• : radical hydroxyle ; PAL : phosphatase alcaline PG : <i>Punica granatum</i> PGE : prostaglandine E PNB : polynucléaire basophile, PNE : polynucléaire éosinophile, PNN : polynucléaire neutrophile, PRR : Pathogen recognition receptor, RCH : rectocolite hémorragique ; RO₂• : radical superoxyde ROS : radicaux libres oxygénés, ROW : relative organ weight SOD : superoxyde dismutase STAT : signal transducers and activators of transcription TBARs : thiobarbituric acid reactive substances TGF-β : Transforming growth factor beta TLR : toll-like receptor TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique TNF-α/β : tumor necrosis factor-α/β TP : <i>Teucrium polium</i> T-régs : T-régulatrices ZO : Zonula Occludens
---	--

- **Autophagie** (du grec « autodigestion ») est un mécanisme mis en évidence en 1963 par De Duve. D'abord caractérisé comme une forme de mort cellulaire, ce mécanisme a été depuis défini comme un processus de maintien de l'homéostasie cellulaire
- **Cellules caliciformes** sont considérées comme des glandes exocrines unicellulaires. Ces cellules assurent la synthèse des différents composants du mucus, comme les mucines.
- **Cellules de Paneth** sécrètent des peptides antimicrobiens comme les défensines dans la lumière et participent au système immunitaire inné.
- **Cellules entéroendocrines** sont plus petites et beaucoup moins nombreuses. En réponse aux nutriments, elles sécrètent dans la circulation générale des hormones et des peptides.
- **Cellules M** sont des cellules épithéliales aplaties dépourvues de microvillosité qui présentent une invagination ou poche dans leurs membranes contenant des cellules B, des cellules T, des macrophages et des cellules dendritiques CD, elles sont retrouvées au niveau des plaques de Peyer.
- **Cellules présentatrices d'antigènes (CPA)** sont les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. Elles vont capter les antigènes pour les présenter aux lymphocytes B. Ces CPA produisent des cytokines qui sont des messagers de l'information à destination des autres cellules de l'immunité. Elles ont également pour rôle de transformer les lymphocytes neutres (Th0) en lymphocytes de type Th1 ou de type Th2.
- **Cholangite sclérosante primitive** : une maladie immuno-inflammatoire des voies biliaires à l'origine de jaunisses, fatigues, pertes de poids et douleurs abdominales.
- **Cryptopatches** sont des amas de cellules lymphoïdes situés dans la LP (*lamina propria*) et divisés en deux sous-types de populations, des LTi (*Lymphoid tissue-inducer cell* – LT) retrouvés au centre du cryptopatche et ces LTi sont entourés de DC.
- **GALT ou MALT (Mucosa-associated lymphoid tissues)** : tissus lymphoïdes divisés en deux catégories suivant si ils sont organisés, comme les plaques de Peyer (PP), les ganglions mésentériques (MLN ou Mesenteric Lymph Nodes), ou plus diffus comme c'est le cas des follicules lymphoïdes isolés (ILF), des cryptopatches, des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) ou des cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMC).

- **Ganglions mésentériques** sont des structures lymphoïdes organisées, groupées aux jonctions des vaisseaux lymphatiques et contenant des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques.
- **Plaques de Peyer** sont des organes lymphoïdes bien délimités composés de nombreux follicules lymphoïdes. Ces follicules comprennent un centre germinatif, composé principalement de lymphocytes B, entouré par des lymphocytes T, et des cellules présentatrices d'antigènes.
- **Sclérite** : une maladie caractérisée par une inflammation de l'épiscière, membrane entourant l'œil, est aussi liée aux crises inflammatoires et est à l'origine des troubles de la vision et des douleurs oculaires.
- **Sténose de l'artère carotide**, c'est un rétrécissement des artères carotides qui est habituellement causé par l'*athérosclérose*, c'est-à-dire par une accumulation de la plaque d'athérome sur la paroi interne des artères.
- **Tanins condensés** : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.
- **Tanins hydrolysables** : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.
- **Uvéite** antérieure est une inflammation de la chambre intérieure de l'œil causant des rougeurs oculaires accompagnées de douleurs, de vision trouble et de photophobie.

Introduction générale

L'importance de la consommation d'aliments d'origine végétale a été particulièrement mise en avant au cours du premier Programme National Nutrition Santé (PNNS) du Ministère de la Santé dans la désormais célèbre injonction « *Pour votre santé, mangez au moins cinq fruits et légumes par jour* ». De multiples constituants et micronutriments de ces aliments tels que les fibres, les vitamines, les minéraux, les polyphénols, limonène, spathulenol, camphor jouent potentiellement un rôle dans cet effet protecteur et thérapeutique.

Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinal récurrente avec des symptômes cliniques tels que la diarrhée, des douleurs abdominales, un saignement rectal et l'apparition d'ulcères dans la muqueuse (**Baumgart & Carding 2007; Engel & Neurath 2010**), conduisant à une augmentation du risque néoplasique (**Pariente et al, 2015; Beaugier & Itzkowitz, 2015**). Il n'existe pas de traitement radical de guérison des MICI. Les médicaments disponibles permettent toutefois un contrôle durable de la maladie et une qualité de vie acceptable.

Plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour améliorer les traitements des MICI. La nutraceutique et les aliments fonctionnels ont démontré depuis quelques années leur potentiel thérapeutique contre les maladies inflammatoires chroniques.

Les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (**Rollinger et al., 2004**). Cependant, les conditions climatiques ont une influence sensible sur l'activité physiologique et biochimique des plantes médicinales (**Tilman et al., 2001**).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont généralement pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (**Duraffourd et al., 1997**).

Les objectifs fixés sont d'étudier l'évolution des molécules bioactives (polyphénols et huile essentielles) de la plante *Teucrium polium* (khayata, j'ada) et du fruit *Punica granatum* (Roman) récoltés dans la région de Mascara, durant les stades de développement, ainsi que d'évaluer leurs propriétés chimique, et leurs effets biologique et pharmacologique, dans le double but de valoriser et de rationaliser leur usage traditionnel et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique.

Notre étude se focalise à la recherche d'une molécule à la fois anti-inflammatoire et antioxydante agissant au niveau intestinal et, bien entendu, ne causant pas d'effets secondaires chez des individus atteints de MICI.

Notre étude est scindée en deux parties :

La première partie de ce manuscrit constitue une étude bibliographique portant sur

- (1) l'inflammation intestinale, leur caractéristique physiopathologique et les marqueurs associés,
- (2) les molécules bioactives « polyphénols et huiles essentielles », leurs effets biologique ;
- (3) un rappel botanique sur la plante *Teucrium polium* et le fruit *Punica granatum*, et leurs effets biologiques et pharmacologiques.

Le travail expérimental est organisé en trois étapes :

- (1) une étude phytochimique : une analyse qualitative et quantitative des extraits phénoliques et huiles essentielles par HPLC-DAD et CPG-SM ;
- (2) Sélectionner les extraits le plus actifs selon leur activité antioxydante
- (3) Evaluation pharmacologique : une toxicité aigue et subaigüe des extraits sélectionnés est déterminée *in vivo*, sur des rats *Wistar*, puis on a évalué le potentiel anti-inflammatoire de polyphénols et huiles essentielles de TP et PG dans le modèle d'inflammation intestinale induite chez le rat

Enfin, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés et discutés à la lumière de la littérature.

Etude Bibliographique

*« Qu'il soit lent ou rapide celui qui cherche trouvera.
Tout ce que tu possèdes en fait de richesses et talents,
n'était-ce pas d'abord une recherche et une pensée?
Si ceux qui ont soif cherchent de l'eau dans le monde,
l'eau aussi cherche dans le monde ceux qui sont assoiffés »*

Jalâl al-Dîn Rûmî

Chapitre I

Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Le système digestif inclut le tractus gastro-intestinal ainsi que les organes accessoires de la digestion, notamment les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas exocrine (Reed & Wickam, 2009).

1. Tube digestif: organisation, histologie et fonction

Sur le plan anatomique, le tube digestif comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (caecum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde et rectum) et l'anus (Pocock *et al.*, 2004).

L'intérêt de notre travail est la partie inférieure du tractus gastro-intestinal constitué de l'intestin grêle et du côlon (figure 1).

Le tube digestif possède quatre couches fonctionnelles :

- ❖ *L'adventice* ou *séreuse*, la couche la plus externe, est constituée d'un tissu conjonctif jouant un rôle de soutien.
- ❖ *La musculuse*, paroi musculaire constituée de cellules musculaires, participe aux contractions péristaltiques impliquées dans la progression des aliments lors de la digestion. Cette couche musculaire est épaissie dans le côlon.
- ❖ *La sous-muqueuse* est constituée d'un tissu conjonctif lâche et contient du collagène, des fibrilles d'élastine, des vaisseaux de gros calibre, des vaisseaux lymphatiques et dans certains endroits des glandes sous-muqueuses ainsi qu'un réseau nerveux, le plexus de Meissner (Reed & Wickam, 2009), permettant le soutien de la couche en contact avec la lumière intestinale (Pocock & Richards, 2004 ; Heath *et al.*, 2008).
- ❖ *La muqueuse*, cette dernière est constituée de 03 couches : l'épithélium unistratifié, la *muscularis mucosae* composée de deux couches fines de muscles lisses, la longitudinale externe et circulaire interne, et la *lamina propria* (LP) (Heath *et al.*, 2008), est un tissu conjonctif, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus ainsi que des follicules lymphoïdes.

L'intestin grêle étant le site principal d'absorption des produits de digestion. La muqueuse intestinale présente des structures qui se projettent dans la lumière intestinale, les villosités pour maximiser la surface absorbante de l'intestin grêle (Peterson & Artis, 2014), tandis que les cryptes sont des invaginations épithéliales trouvées à la base de ces villosités (Clevers, 2013). Au niveau de l'iléon, le système immunitaire est complété par la présence des plaques de Peyer (Reed & Wickam, 2009).

Le gros intestin ayant un rôle dans l'absorption de l'eau et des électrolytes, la digestion terminale de la cellulose et autres polysaccharides non digérés par la flore intestinale (caecum et colon ascendant) et l'évacuation des déchets alimentaires (colon descendant, colon sigmoïde et rectum) (Nevière, 2005). La couche épithéliale du colon consiste en une couche simple de cellules épithéliales formant des invaginations en forme de doigts entourées par la lamina propria appelés cryptes de Lieberkühn (Potten *et al.*, 2003). Il est dépourvu de villosité et de cellules de Paneth (van der Flier & Clevers, 2009). Sa *lamina propria* est riche en tissus lymphoïdes.

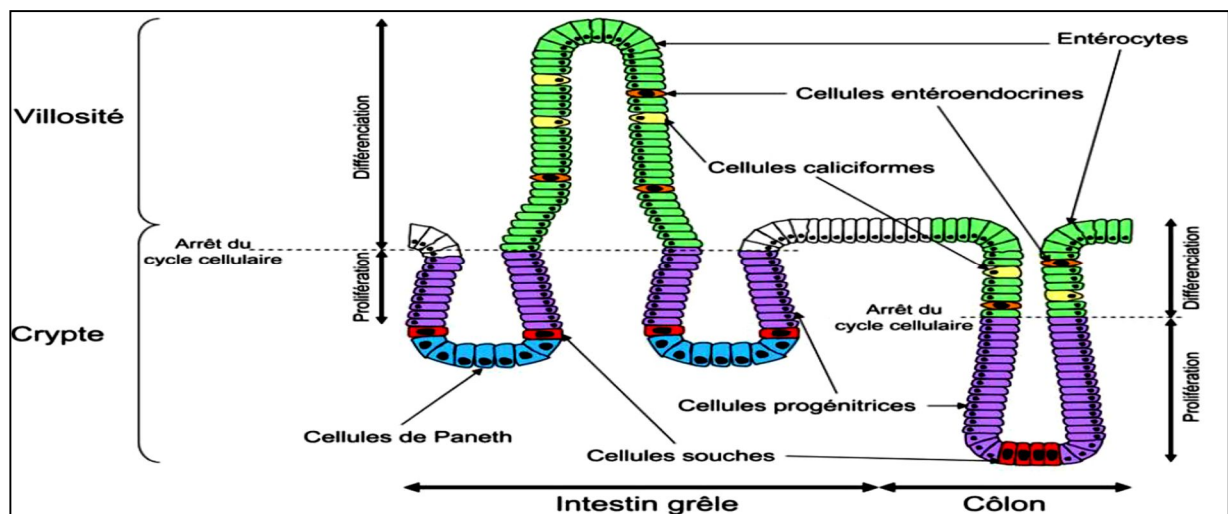


Figure 1 : Structure de l'épithélium intestinal (Sanchez *et al.*, 2004)

2. Barrière et perméabilité intestinale

La barrière intestinale est une barrière de défense organisée en quatre unités fonctionnelles : la barrière mécanique, la barrière écologique, la barrière physique et la barrière immunologique (Figure 2). Ces unités fonctionnelles entretiennent entre elles des relations permanentes, étroites et finement régulées, assurant le maintien de l'homéostasie générale de l'organisme (Salim & Soderholm, 2011).

La barrière épithéliale, le système immunitaire et la flore intestinale sont les éléments clés dans l'homéostasie de la fonction de barrière de l'intestin. Lorsque l'un de ces trois composants est altéré, il peut se produire un phénomène dit de **translocation bactérienne** (Balzan *et al.*, 2007).

2.1.Barrière mécanique

Les mouvements péristaltiques intestinaux représentent une barrière efficace dans le but de limiter la pénétration des bactéries intestinales dans l'organisme (leur translocation à travers la muqueuse intestinale) (Nieuwenhuijs *et al.*, 1998 ; Pardo *et al.*, 2000).

2.2.Barrière écologique : Microbiote intestinal

2.2.1. Généralité

Le microbiote intestinal est composé en grande majorité de bactéries anaérobies strictes qui dominent les bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, il est caractérisé par deux familles majoritaires parmi la cinquantaine référencée : les Firmicutes (*gram*-positives) sont impliqués dans la résorption d'énergie (Jandhyala, 2015), et les Bacteroidetes (*gram*-négatives) qui ont des rôles dans la dégradation des protéines et les carbohydrates (Thomas *et al.*, 2011). À l'âge adulte, six embranchements principaux composent le microbiote : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria, les Proteobacteria, les Verrucomicrobia et les Fusobacteria (Marchesi *et al.*, 2016) (Figure 2).

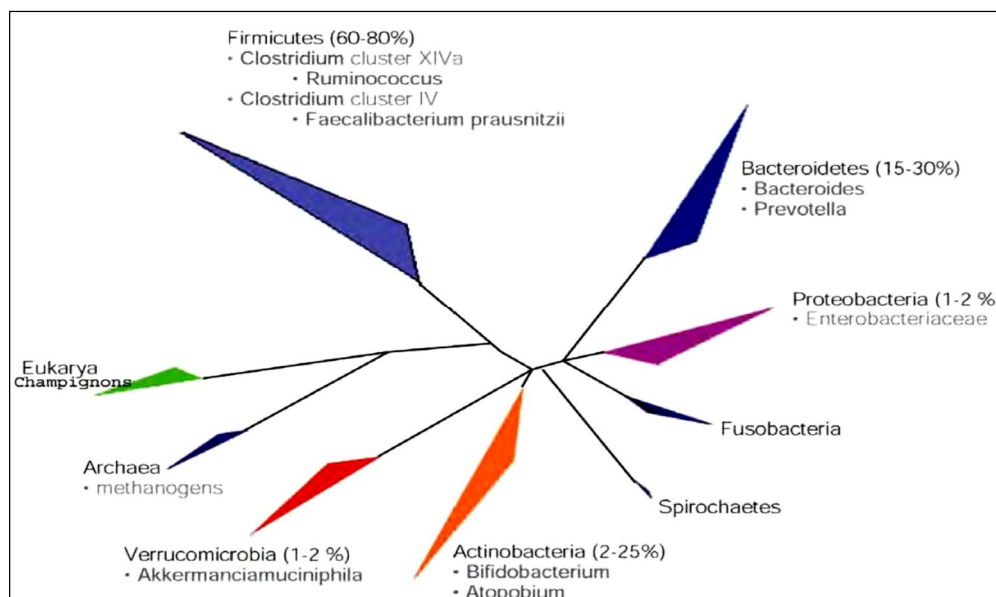


Figure 2: Composition de la flore intestinale (Cheng *et al.*, 2013)

2.2.2. Fonction de la flore intestinale

Le microbiote participe à de nombreuses fonctions physiologiques. En plus de participer à la digestion des nutriments et à la synthèse vitaminique (facteur de la coagulation sanguine vitamine K, B1, B8, B9 et B12) (Enders, 2015), le microbiote contribue au maintien

de l'homéostasie intestinale en exerçant des fonctions protectrices pour l'hôte et en participant à la maturation du système immunitaire *via* différents mécanismes :

- prévenir de la colonisation de l'épithélium par des agents pathogènes : Par compétition avec le métabolisme des nutriments, la production des molécules antimicrobiennes (bactériocines, acide lactique) aux propriétés antibiotiques, la sécrétion de peptides antimicrobiens tel que le microcine et la colicine par *Escherichia coli* ou encore par adhérence à la muqueuse intestinale (Stecher *et al.*, 2013 ; Langella & Bouix, 2016) ;
- contribuer au maintien de l'étanchéité en régulant les jonctions serrées. Par exemple, *L. plantarum* augmente l'expression de zonula occludens-1 et de l'occludine dans le duodénum (Ulluwishewa *et al.*, 2011) ;
- le peptidoglycane des bactéries Gram positives induit la formation de follicules lymphoïdes (Bouskra *et al.*, 2008) au niveau de l'épithélium intestinal par exemple il a été montré que le polysaccharide A de *Bactéroïdes fragilis* était capable, à lui seul, d'induire la maturation du système immunitaire de souris axéniques (Mazmanian *et al.*, 2005);
- l'interaction entre les bactéries commensales et les cellules dendritiques induit la production d'IgA par les lymphocytes B en limitant la pénétration des bactéries pathogènes dans la muqueuse (immunité humorale) (Lin *et al.*, 2012) ;
- De plus, le butyrate et les autres métabolites bactériens, propionate et acétate (acides gras à chaîne courte) jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose, indispensable au renouvellement de l'épithélium intestinal (Pardo *et al.*, 2000) ;
- Plus récemment il a été suggéré que le microbiote intestinal prendrait part à la communication entre l'intestin et le cerveau, et influencerait ainsi le développement et le fonctionnement cérébral. Des voies de communication humorales et neuronales seraient impliquées (Doré *et al.*, 2013).

2.3. Barrière physique : Epithélium intestinal

L'épithélium intestinal est constitué de différentes cellules servant de barrière physique protectrice de l'organisme vis-à-vis des agents potentiellement délétères présents dans la lumière intestinale. Il contribue aussi au maintien de la perméabilité intestinale par deux voies : la voie para-cellulaire et la voie trans-cellulaire (Turner, 2009; Ménard *et al.*, 2010).

- La voie trans-cellulaire est impliquée dans le passage passif ou actif de molécules au travers de la membrane plasmique par des canaux ou des transporteurs spécifiques (de pôle apical des entérocytes vers l'espace extracellulaire) (**Fasano, 1998**). Les composés lipophiles, comme les bisphénols, peuvent diffuser passivement alors que des transporteurs actifs sont nécessaires pour la diffusion des acides aminés et du glucose (**Ménard et al., 2010; Zalko et al., 2011**).
- La voie para-cellulaire est impliquée dans le transfert de molécules de petite taille (0,4 et 0,9 nm dans les villosités et de 5 à 6 nm dans les cryptes) par mouvement passif entre deux cellules par des jonctions intercellulaires (**Groschwitz & Hogan, 2009; Hu et al., 2013 ; Stewart et al., 2017**).

2.3.1. Cellules différenciées

L'épithélium intestinal est constitué de plusieurs types cellulaires (figure 3) :

Les entérocytes, les plus nombreux, principalement impliqués dans l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau (**Gerbe et al, 2012 ; Peterson & Artis, 2014 ; Bloemendaal et al, 2016**).

Les cellules caliciformes, qui sécrètent de mucine et des peptides dans la lumière intestinale, le mucus forme la première ligne de défense de l'épithélium contre les microorganismes pathogènes et les sucs digestifs (**Dharmani et al, 2009 ; Peterson & Artis, 2014; Bloemendaal et al, 2016**).

Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens et participent à la réponse immunitaire innée (**Noah et al, 2011 ; Peterson & Artis, 2014 ; Bloemendaal et al., 2016**).

Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones régulant les fonctions digestives (**Peterson & Artis, 2014**).

Les cellules M (Microfold cells) sont impliquées dans l'endocytose et dans la transcytose des antigènes du non-soi présentés aux lymphocytes, aux macrophages et aux cellules dendritiques (**Mabbott et al, 2013**).

Plus récemment, un autre type cellulaire issu du lignage sécrétoire a été décrit. Ce sont **les cellules tuft**, présentes dans tout le tractus digestif mais en très faible proportion (0,4%). Elles expriment des enzymes impliquées dans la biosynthèse des eicosanoïdes (cyclo-oxygenase-1 et cyclo-oxygénase-2), suggérant un rôle dans l'inflammation, la différenciation et la migration cellulaire (**Gerbe et al, 2012**).

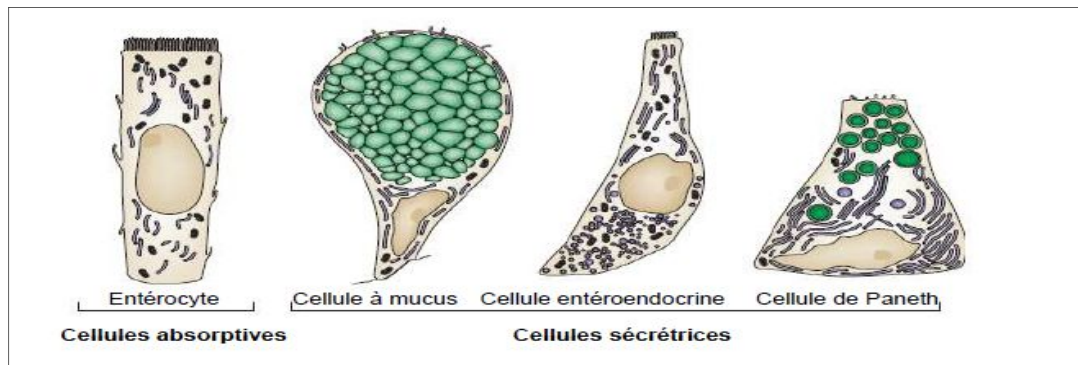


Figure 3 : Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle (Crosnier *et al.*, 2006)

2.3.2. Les jonctions intercellulaires

Les cellules de l'épithélium sont polarisées avec un pôle apical (vers la lumière intestinale) et un pôle basolatéral (vers la LP). Cette polarité est maintenue grâce aux différentes jonctions intercellulaires (figure 4) : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Groschwitz & Hogan, 2009; Stewart *et al.*, 2017).

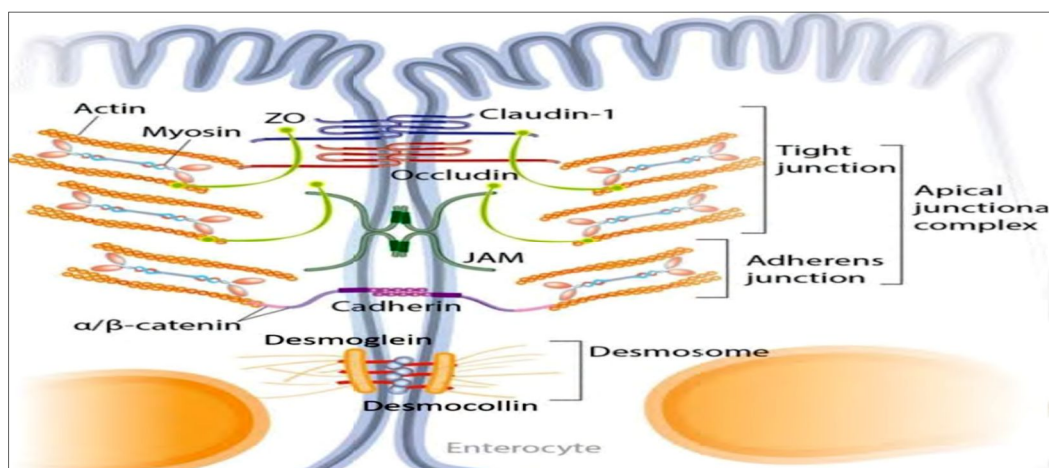


Figure 4 : Les jonctions intercellulaires (Stewart *et al.*, 2017)

Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires de la famille des claudines, des occludines et des JAM (*Junctional Adhesion Molecules*) auxquelles sont associées à des protéines cytoplasmiques de la famille des ZO (*Zonula Occludens*). Ce complexe multiprotéique est relié à l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine qui forme le cytosquelette des cellules épithéliales (Nusrat *et al.*, 2000; Suzuki, 2013).

Les jonctions adhérentes permettent l'adhésion cellule-cellule via la liaison de deux molécules d'E-cadhérine. Ces cadhérines sont reliées au cytosquelette d'actine grâce aux caténines α et β (Shapiro & Weis, 2009; Levayer, 2012).

Les desmosomes sont formés également d'un complexe de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines desmosomales (desmogléines et desmocollines) (Hulpiau & Van Roy, 2009). Ce complexe est relié au cytosquelette de kératine par les desmoplakines (South, 2004 ; Turner, 2009).

2.4. Barrière immunologique : Système immunitaire intestinal

Les cellules de l'épithélium intestinal, en collaboration étroite avec le contenu intraluminal, jouent un rôle crucial dans la stimulation et la modulation du système immunitaire inné qui correspond à la première ligne de défense de l'organisme face à une agression, et adaptatif (figure 05) qui correspond à une immunité acquise, spécifique envers un antigène (Ag) donné (Pickard *et al.* 2004).

Les cellules de l'immunité innée telles que les phagocytes, reconnaissent les bactéries grâce aux « Patterns Recognition Receptor » (PRR) (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Les PRRs les plus connus sont les TLR (toll-like receptor) et les NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), présents essentiellement à la surface des cellules épithéliales intestinales et des cellules immunitaires (Michelsen & Arditi, 2007). Tandis que l'immunité adaptative comprend deux types cellulaires majeurs : les lymphocytes T et B (LT et LB).

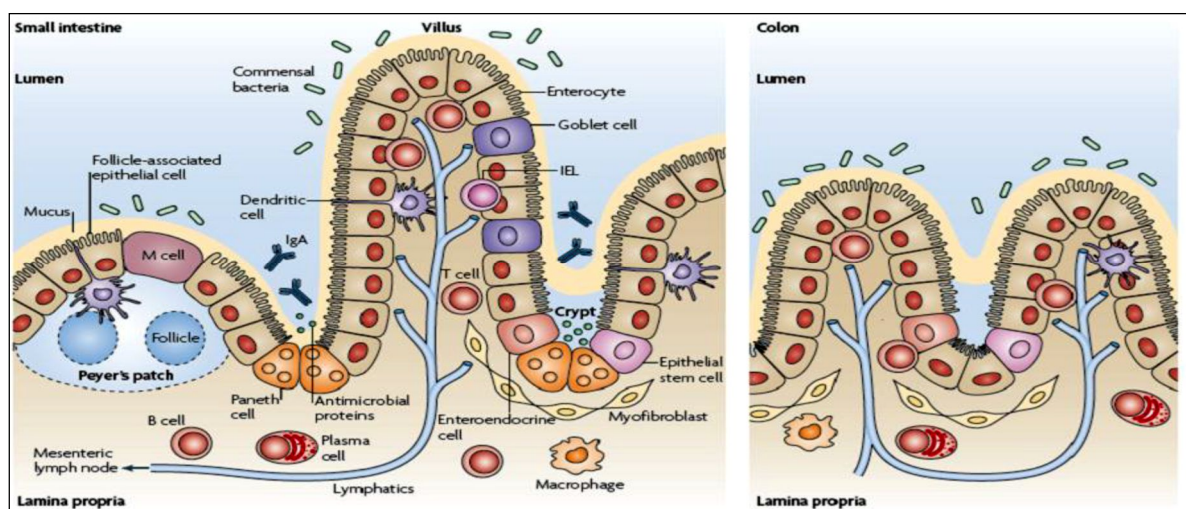


Figure 05 : Le système immunologique intestinal au niveau de l'intestin grêle et du côlon (Abreu, 2010)

Les antigènes étranger venant de la lumière aux MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue), peuvent être capturés par les cellules épithéliales intestinales, par les cellules dendritiques de la *lamina propria* et par les cellules M (Microfold cells) (Spahn & Kurchazik, 2004).

Alors que les cellules M reconnaissent les Ag et les transportent vers les cellules présentatrices d'antigènes CPA (Kucharzik *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2007) pour les endocytent dans le but d'induire la réponse immunitaire adaptative ou elles produisent des cytokines qui ont un rôle de transformer les lymphocytes neutres (Kapsenberg, 2003 ; Pulendran, 2005) en lymphocytes de type Th1 (réponse pro-inflammatoire), Th2 (produite de cytokines IL4 et IL13), Th17 (produite de cytokines IL-17 et IL-23) ou Treg (induite la production de cytokines anti-inflammatoire IL-10 et transforming growth factor beta « TGF- β ») (fig.6) (Medzhitov, 2007)

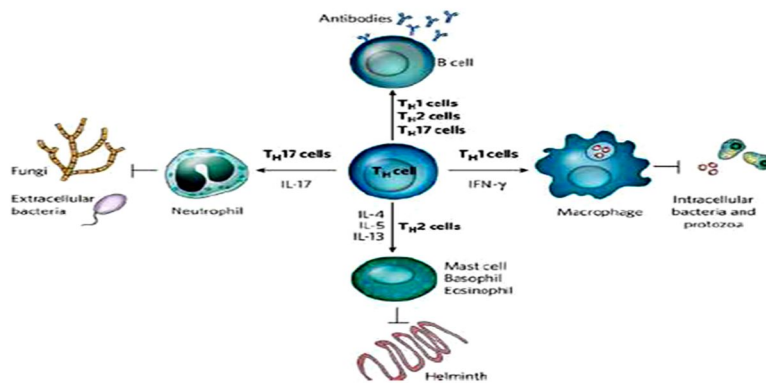


Figure 06: Induction des voies Th1, Th2 et Th17 (Medzhitov, 2007).

Les Ag ainsi transportés au sein des follicules lymphoïdes induisent la différenciation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes (Rodriguez-Pinto, 2005) qui migrent le long de la sous-muqueuse produisant alors des anticorps IgA au sein de la lumière.

3. Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont des pathologies digestives regroupant la maladie de Crohn (MC), la rectocolite hémorragique (RCH). Elles sont caractérisées par une inflammation chronique ainsi qu'une altération de la muqueuse intestinale avec des lésions visibles par endoscopie. On retrouve ainsi un déséquilibre du système immunitaire et de la flore intestinale avec une augmentation du nombre de bactéries pathogènes.

3.1. Classification

La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par Burril B. Crohn, médecin américain, qui lui a donné son nom suite à la description de 14 cas d'affection localisée au niveau de l'iléon. En 2006 lors du Congrès mondial de gastroentérologie à Montréal, une classification clinique de la maladie de Crohn basée sur quatre localisations distinctes (notées par L) a été proposée: L1-L'iléon terminal, L2 –le Colon, L3 -Iléo-colon de l'iléon terminal et toute localisation du colon, et L4-Tractus gastro-intestinal supérieur (Satsangi et al., 2006).

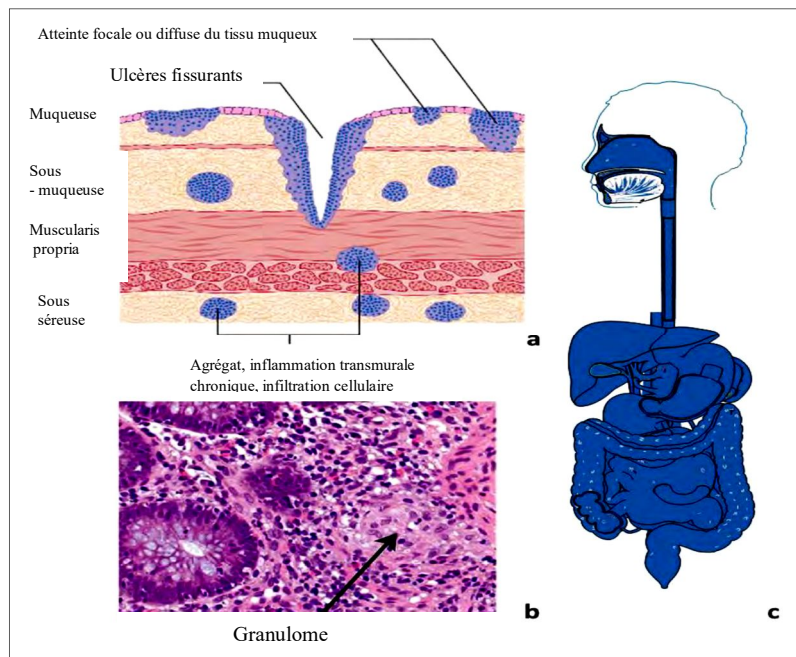


Figure 7: Localisation des altérations intestinales caractéristiques de la MC
 (a) Lésions inflammatoires au niveau de la paroi intestinale (Grabsch, 2013) (b) coupe histologique représentant un granulome secondaire à l'agrégation d'un grand nombre de macrophages (Xavier and Podolsky, 2007) (c) Localisation des segments du tube digestif touchés en cas de MC (apparaissent en bleu)

La RCH fut, elle, différenciée de la dysenterie bactérienne en 1859 par Samuel Wilks puis décrite par Arthur Hirst en 1931. Elle se caractérise par une atteinte continue et rétrograde (le rectum est toujours atteint), la localisation anatomique de l'inflammation permet d'établir trois phénotypes clinico-pathologiques de la RCH: la pancolite (E1) où l'inflammation atteint la totalité du côlon, la rectocolite gauche (E2) où l'inflammation atteint le côlon gauche et la recto-sigmoïdite (E3) où l'inflammation se situe au niveau du côlon droit (Baumgart & Sandborn, 2007).

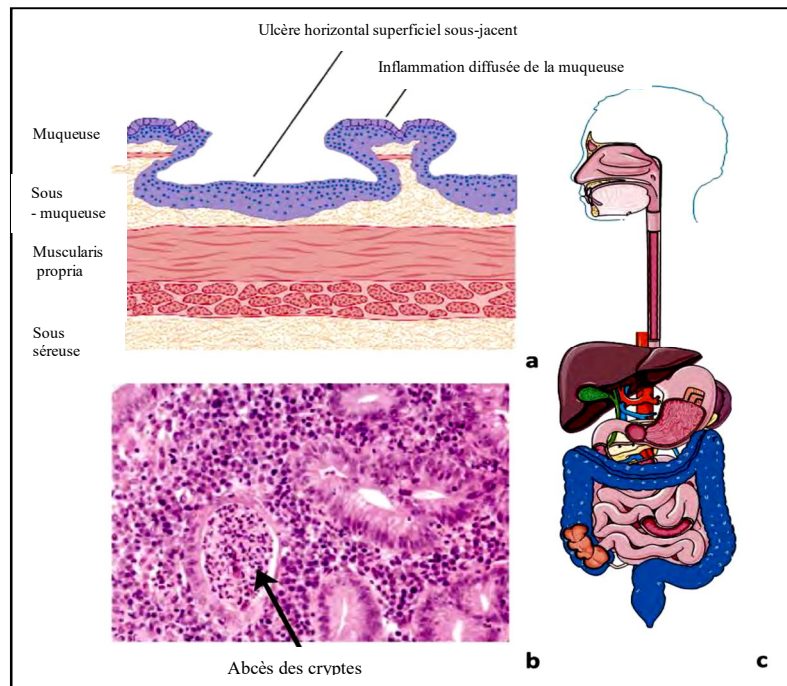


Figure 8: Localisation des altérations intestinales caractéristiques de la RCH

(a) Lésions inflammatoires au niveau de la paroi intestinale (Grabbsch, 2013) (b) coupe histologique représentant un abcès cryptique secondaire à une infiltration des PNN (Xavier and Podolsky, 2007) (c) Localisation des segments du tube digestif touchés en cas de RCH (apparaissent en bleu)

3.2. Sémiologie des MICI

Les patients atteints de MICI souffrent de façon fréquente et chronique de diarrhée, de douleurs abdominales, de saignements rectaux et de malnutrition (Cho, 2008 ; Cho & Brant, 2011), allant de la perte de poids à l'ulcération, à la perforation et à l'obstruction de tractus gastro-intestinal (Hendrickson *et al*, 2002; Shanahan, 2002).

La MC est caractérisée par une inflammation transmurale, discontinue (Fig.7) pouvant affecter l'ensemble des segments du tube digestif (Marteau & Jian, 2001; Xavier & Podolsky, 2007). Le tissu intestinal est touché par de nombreuses altérations : (1) infiltrations leucocytaire par foyers, (2) granulomes, (3) irrégularité focale des cryptes intestinales avec parfois des abcès, (4) hypertrophie neuromusculaire, (5) fissures et ulcérations (Evans, 2000; Marteau & Jian, 2001; De Saussure & Bouhnik, 2007).

Tandis que, le tissu intestinal chez les RCH est touché par de nombreuses altérations : (1) réduction de la population des cellules à mucus, (2) abcès des cryptes intestinales, (3), infiltrat immunitaire uniforme, (4) épaissement de la *muscularis propria*, (5) dilatation des capillaires sanguins avec hémorragies (Evans, 2000; Xavier & Podolsky, 2007).

Les MICI peuvent aussi présenter des signes extradigestifs « manifestations extraintestinales (MIE) » (**Fig.09**), avec des taux de prévalence allant de 6% à 47% (**Williams et al, 2008; Patil & Cross, 2013**).

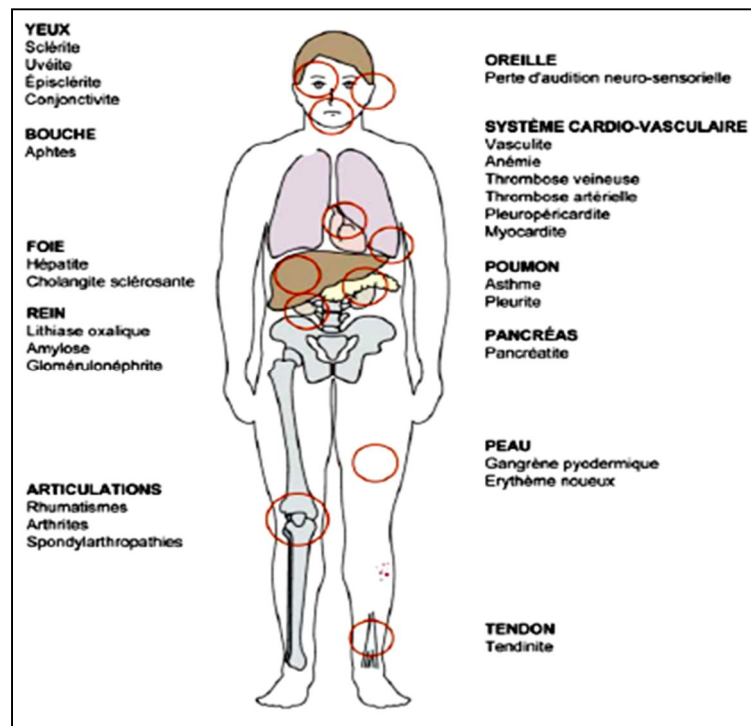


Figure 9 : Manifestations extraintestinales des MICI (Baumgart and Sandborn, 2007)

3.3.Épidémiologie

La MICI a été un problème de santé mondial avec une incidence croissante soutenue (**Xavier & Podolsky, 2007**). A l'échelle mondiale, on peut observer une différence entre l'hémisphère nord et l'hémisphère sud. Les MICI affectent aussi bien les hommes que les femmes, préférentiellement le jeune adulte entre 20 et 30 ans. Une plus forte incidence de RCH et de MC est observée dans les pays industrialisés avec une incidence moyenne de 0 à 19.2 nouveaux cas pour 105 habitants en Amérique du Nord et de 0,6 à 24,3/105 en Europe. Ainsi, environ 1,5 millions d'Américains et 2,2 millions d'Européens sont atteints de MICI actuellement (**Ananthakrishnan, 2015**).

Il est plus fréquent chez les israéliens, qui sont cinq à huit fois plus susceptibles de développer une MICI par rapport aux populations non israéliens (**Sands & Stacey Grabert PharmD, 2009**).

En Afrique et en Algérie, les études épidémiologiques sont très rares. Alors que **Hammada et al. (2011)** a trouvé que l'incidence annuelle moyenne (pour 100 000 habitants) brute était de 5,87 pour la MC et 3,29 pour la RCH dans une étude prospective

observationnelle descriptive de tous les patients adultes au niveau de la wilaya de Constantine.

3.4.Étiologie

Le développement des MICI est multifactoriel et reste à ce jour non élucidé (**Dignass, Van Assche et al., 2010**). La plupart des patients atteints de MICI affichent une réactivité immunologique locale et systémique particulièrement élevée face aux antigènes résultant en un dysfonctionnement du système immunitaire.

3.4.1. Facteurs génétiques

La susceptibilité génétique dans le développement des MICI joue un rôle primordial. En effet, des études d'association pangénomiques (GWAS) ont montré que parmi les 163 loci génétiques associés jusqu'à présent avec les MICI, 110 loci sont associés aux deux formes de la maladie, 30 sont spécifiques à la MC et 23 à la RCH (**Jostins, Ripke et al. 2012**).

Dans ce contexte, une variété de mutations génétiques divisées en 04 groupes de gènes est impliquée dans la perturbation des interactions hôte-microbiote (**Jostins et al., 2012; J. Z. Liu et al., 2015**), qui sont responsables de (a) la perte de fonction barrière (cadherin-1 *cdhl*, Hepatocyte Nuclear Factor 4 α *HNF4A*, Laminin subunit β -1 (LAMB1), *muc19*) (**Prager et al., 2015**), (b) l'incapacité à maintenir l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales (*xbp1*, *ormdl3*), (c) la perte des réponses immunes innées permettant la clairance microbienne, (d) la perte de tolérance (*tnfs15*, *il10rb* et *il-23r*) (**Jostins et al., 2012; J. Z. Liu et al., 2015**).

Par ailleurs, il a été montré que la MC est génétiquement associée à des mutations du gène NOD2/CARD15 (**Ogura et al., 2001**) qui code pour une protéine cytoplasmique de reconnaissance des bactéries, exprimé par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales (**Farmer & Michener, 1986**). En effet, ces mutations sont responsables de la réponse inflammatoire et immunitaire anormale vis-à-vis de la microflore intestinale déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux, chez des individus génétiquement prédisposés (**Girardin et al. 2003 ; Kökten et al., 2016**).

La prédisposition génétique seule n'est pas suffisante pour induire une MICI. En effet, cela n'explique que 20 à 25% des cas (**Zhang & Li, 2014**).

3.4.2. Facteurs environnementaux

L'augmentation progressive de l'incidence des MICI dans les pays industrialisés ou en voie de développement semble indiquer une influence très importante des facteurs environnementaux dans l'éthiopathologie de la maladie tel que l'hygiène, le stress, l'alimentation, l'utilisation d'antibiotiques, la pollution, le tabagisme et l'appendicectomie (Loftus, 2004; Zhang and Li, 2014 ; Ananthakrishnan, 2015; Cosnes, 2016 ; Saxena & Sharma, 2016).

La prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens peut provoquer aussi des lésions de la muqueuse intestinale et augmenter la perméabilité par deux mécanismes : (1) inhibition de la cyclooxygénase responsable de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine et (2) inhibition directe de la prostaglandine et donc de ses effets anti-inflammatoires (Molodecky & Kaplan, 2010; Zhang & Li, 2014).

3.4.3. Facteurs microbiens

Plusieurs éléments essentiels mettent l'accent sur le rôle du microbiote dans la pathogenèse des MICI. Les modèles animaux d'iléite et de colites chroniques nécessitent la présence d'un microbiote intestinal pour déclencher la pathologie (Hudcovic *et al.*, 2001). Cette proposition supporte le fait que l'iléon terminal et le côlon, les deux sites contenant la plus grande densité de microbiote, sont les sites fréquemment touchés par les lésions de la maladie de Crohn.

Les éléments concluant à une responsabilité microbiologique dans ces pathologies restent relativement faibles. Cependant certaines données permettent de proposer quelques souches bactériennes comme pouvant jouer un rôle dans les MICI tel que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ou encore *Mycobacterium paratuberculosis* (Marteau *et al.*, 2004 ; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004 ; Danese and Fiocchi, 2006).

4. Physiopathologie

Dans de conditions d'homéostasie, les APC résidents permettent de maintenir une tolérance intestinale vis-à-vis des antigènes de la lumière intestinale grâce à la production des Treg . Suite à une altération de la barrière intestinale, une réponse inflammatoire est mise en place. Cette réponse fait intervenir le système immunitaire innée et adaptative afin d'éliminer efficacement l'agresseur (Ramnik, 2014). Un équilibre homéostatique est toujours maintenu entre les cellules T-régulatrices (T-régs etc.) et les cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17).

Une fois le danger éliminée, une étape de résolution de l'inflammation est initiée. Notamment grâce à l'efferocytose des PMN apoptotiques par les macrophages, permet d'établir un microenvironnement plus tolérogène qui facilite l'initiation de la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie (Ramnik, 2014).

Une altération de la barrière intestinale est présente dès le stade précoce de MICI. Cette altération induit par la suite la translocation des bactéries commensales et des produits microbiens depuis la lumière intestinale, ce qui conduit à une activation des cellules immunitaires et la production de cytokines pro-inflammatoires (fig.10) (Ramnik, 2014). La réponse Th1/Th17 semble être impliquée dans la MC tandis que la réponse Th2 entrainerait la rectocolite hémorragique (Sanchez-Munoz *et al*, 2008).

Les effecteurs de type Th1 contribuent normalement à l'élimination des pathogènes intracellulaires (Zhang & Li, 2014). Alors que le profil Th2 est caractérisé par une production de cytokines (IL5, IL-13), de TGF- β et des lymphocytes NK (Matricon *et al*, 2010). Parallèlement à la présence des lymphocytes Th17 dans les MICI favorisé par la co-expression d'IL-23 et de TGF- β et qui aboutit à la production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22, le taux circulant des lymphocytes Treg ainsi que le taux de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-25...) sont réduits, contribuant ainsi à l'inflammation de la muqueuse intestinale (Xu *et al*, 2014).

Une réponse immunitaire humorale est également associée aux MICI. Elle est caractérisée par une infiltration de LB dans la muqueuse intestinale (Matricon *et al*, 2010). Des études ont également montré une augmentation massive du nombre de lymphocytes B et par conséquence de la quantité importante d'immunoglobulines libérées.

Par ailleurs, la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines est également augmentée de l'expression des molécules d'adhérence (les sélectines et les intégrines) exprimées sur la surface de l'endothélium cellulaire et aux niveaux des espaces intracellulaires, ce qui conduit à la liaison des polynucléaires neutrophiles circulants et des monocytes à l'endothélium inflammatoire (Briskin *et al*, 1997 ; Souza *et al*, 1999).

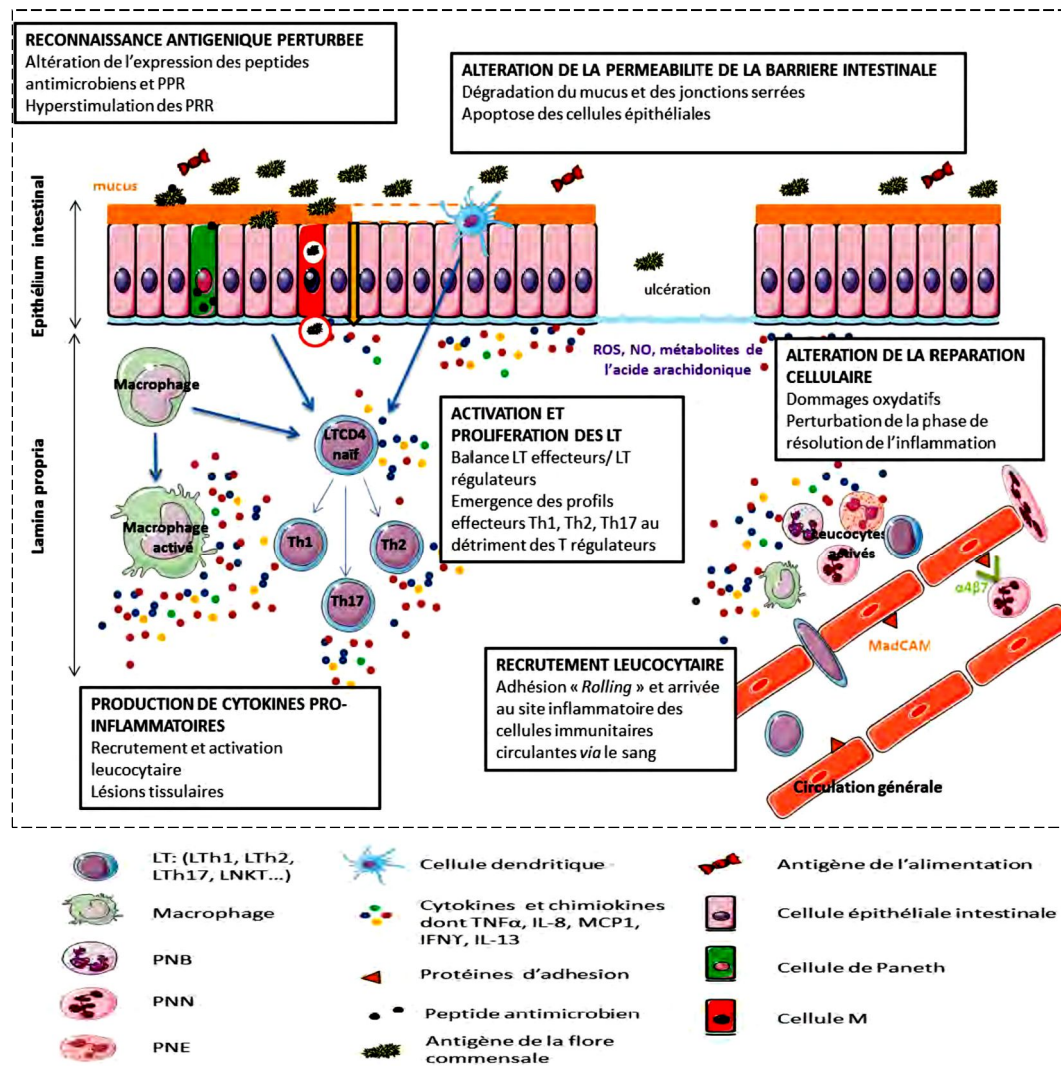


Figure 10: Physiopathologie des MICO (Nahon *et al*, 2001)

LT : lymphocyte T, LTh : lymphocyte T helper, PNB : polynucléaire basophile, PNE : polynucléaire éosinophile, PNN : polynucléaire neutrophile, PRR : Pathogen recognition receptor, ROS : radicaux libres oxygénés, NO : oxyde nitrique.

5. Marqueurs de MICO

Le diagnostic dépend fortement de la combinaison d'une large gamme de résultats cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques pour proposer le cadre approprié de traitement (Famularo & Minisola, 2010 ; Andreoli *et al*, 2010).

5.1. Biologie standard

Plusieurs tests de laboratoires biologiques sont potentiellement utiles dans la prise en charge des malades de la maladie de Crohn, la protéine C-réactive (CRP) étant la plus utilisée dans la pratique clinique.

D'autres tests tels que, la vitesse de sédimentation (VS), la numération et formule sanguine (NFS) à la recherche d'une anémie, et recherche de la présence du **fibrinogène** et/ou des **α_2 -globulines** et l'**hypo-albuminémie**, permettent d'évaluer l'activité de la maladie. Les niveaux fécaux de **calprotectine** et de **lactoferrine** sont des marqueurs prometteurs à utiliser dans un proche avenir dans ce domaine, mais des recherches plus approfondies sont nécessaires (Bernstein *et al.*, 2009 ; Famularo & Minisola, 2010).

D'un point de vue sérologique, les anticorps Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies (ANCA) sont plutôt positifs dans la RCH et les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) plutôt positifs dans la MC (Reese *et al.*, 2006).

Enfin, au diagnostic différentiel, les examens de laboratoire notamment la **coproculture**, les examens parasitologiques des selles sont indispensables, afin d'éliminer toute cause infectieuse ou parasitaire (Bernstein *et al.*, 2009).

5.2. Myéloperoxydase

Le dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) est considéré comme un marqueur de l'inflammation intestinale dans la mesure où il reflète l'infiltration de la muqueuse par les PNN (Okayasu *et al.* 1990).

5.3. Cytokines

Les cytokines les plus couramment recherchées lors de l'inflammation (TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-4, IL-5 et IL-10) assurent la communication entre les différentes cellules immunitaires. Par ailleurs, elles régulent la production de nombreux autres médiateurs de l'inflammation : les EROs, le monoxyde d'azote et les prostaglandines. Elles activent des voies de signalisation telles que NF- κ B et inhibent l'apoptose (Sanchez- Munoz *et al.* 2008).

5.4. Facteur de transcription NF- κ B

Lors de la réaction inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) par leur fixation sur leurs récepteurs ont la capacité d'activer les voies de signalisation résultant en l'activation de l'I- κ B kinase (IKK) qui va ainsi phosphoryler I- κ B ce qui permettra sa dégradation par le système du protéasome. Les sous-unités de NF- κ B ainsi libérées peuvent gagner le noyau et assurer leur fonction de facteur de transcription (Atreya *et al.*, 2008). Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans les phénomènes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et d'inhibition de l'apoptose, ceci pouvant conduire à des phénomènes de carcinogenèse associés à l'inflammation (Naugler & Karin, 2008).

5.5. Nitric oxyde synthase inducible

L'activation de NF- κ B induit également l'expression de l'iNOS induisant une augmentation de la production du monoxyde d'azote qui participe au phénomène du stress oxydant et a des effets anti-apoptotiques (Aktan, 2004).

5.6. Cyclo-oxygénase-2

La cyclo-oxygénase-2 (COX-2) est exprimée à la surface des cellules épithéliales ainsi que dans les cellules immunitaires de la *lamina propria* de patients atteints de MICI au cours des périodes actives d'inflammation (Singer *et al.*, 1998). Cette augmentation de COX-2 lors de l'inflammation se traduit par une augmentation du taux de PGE2, médiateur de l'inflammation aiguë (Okayama *et al.*, 2007).

5.7. Statut stress oxydatif

5.7.1. Généralité

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (fig.11) : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Sayre *et al.*, 2008; Power *et al.*, 2010).

Les antioxydants **enzymatiques** sont constitués de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase (Lehucher-Michel *et al.*, 2001)

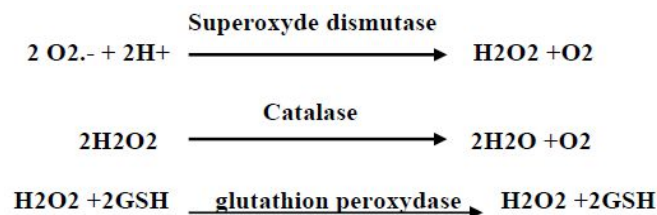


Figure 11 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO (Halliwell, 2006)

Les antioxydants **non enzymatiques** sont constitués de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO (Kohen & Nyska, 2002). On distingue des composés endogènes (le glutathion GSH, l'acide urique, la bilirubine et l'ubiquinol (coenzyme Q réduit)), et des composés exogènes (vitamines C et E, polyphénols...) qui sont principalement apportés à l'organisme par l'alimentation.

5.7.2. Marqueurs

Au cours des pathologies inflammatoires intestinales, l'infiltration de la *lamina propria* par les cellules inflammatoires (PNN et macrophages) provoque la libération d'une grande quantité des médiateurs du stress oxydant (fig.12) (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Les résultats des études menées sur les rongeurs sont plus homogènes et semblent indiquer que la **SOD**, la **CAT** et la **GPx** ont une activité diminuée au cours de la colite (Oh *et al.*, 2006; Ashokkumar *et al.*, 2008).

Achitei *et al.* (2013) ont trouvé une diminution de l'activité **SOD** et **GPx** chez les patients atteints de MICI.

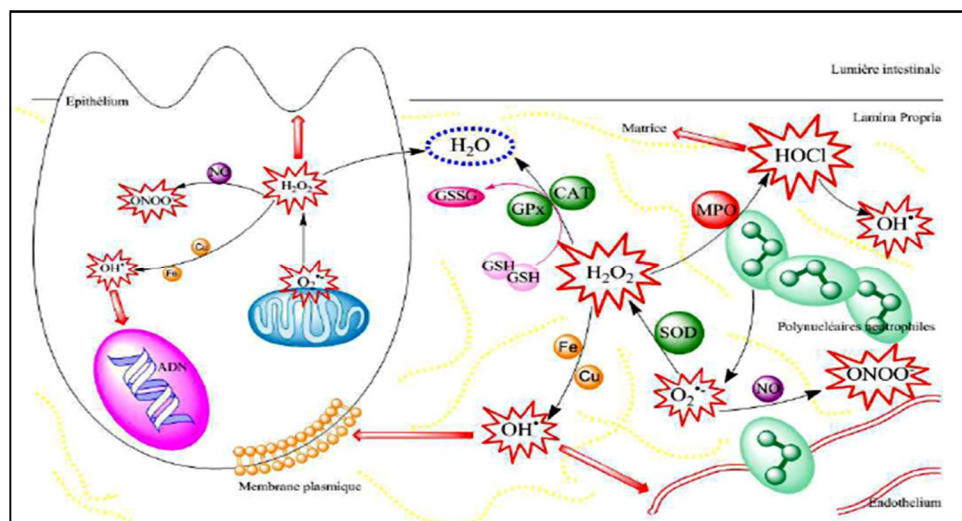


Figure 12: Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au cours de l'inflammation intestinale (Kruidenier *et al.*, 2002).

CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion ; GSSG, glutathion dissulfide ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; HOCl, acide hypochloreux ; MPO, myéloperoxydase ; NO, monoxyde d'azote ; $\text{OH}^\bullet$, radical hydroxyle ; $\text{O}_2^{\bullet-}$, anion superoxyde ; ONOO-, peroxynitrite

Au cours de l'inflammation intestinale, les altérations oxydatives touchent l'ensemble des macromolécules de la cellule :

L'oxydation de l'ADN se manifestant par l'augmentation du taux de **8-OH-dG** dans les urines (Baba *et al.* 2009) ou par l'augmentation des altérations oxydatives de l'ADN mesurées par le test des comètes (Jin *et al.* 2008). Alors que l'oxydation des protéines se traduit par la production des **groupements carbonyles** (Lih-Brody *et al.* 1996; Mercier *et al.* 2002). D'autres altérations oxydatives sont également détectées, C'est le cas du **MDA** issu de l'oxydation des lipides. Ainsi certains auteurs observent une augmentation du MDA dans le plasma de patients atteints de MC et de RCH (Alzoughaibi *et al.* 2007; Baskol *et al.* 2008).

5.8. Marqueurs microbiens

La diversité et la présence ou l'absence de taxons spécifiques pourraient être utilisés comme des biomarqueurs de pathologies ou de réponse au traitement (Bazin *et al.* 2018). Microbiologiquement on retrouve des modifications à la fois quantitatives et qualitatives de la composition du microbiote intestinal dans les MICI (H Sokol *et al.* 2009; Duboc *et al.* 2013).

La dysbiose au cours de MICI se caractérise par une perte de la diversité des bactéries du microbiote. On note au cours de la MC une augmentation du phylum des Bacteroidetes et des Proteobacteria, en particulier de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont *Escherichia coli*, y compris *E. coli* adhérente invasive, qui possède une action pro-inflammatoire (Nguyen *et al.* 2014), et une diminution du phylum des Firmicutes, en particulier *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol & Seksik, 2010 ; Gevers *et al.*, 2014) de la famille des *Clostridiaceae*, qui possède des propriétés anti-inflammatoires (Nguyen *et al.* 2014). Leur effet anti-inflammatoire est interprété par leur produit « le butyrate » (Sartor, 2008) qui maintient l'équilibre Th17/Treg par un mécanisme épigénétique (L. Zhou *et al.* 2018), et provoque ainsi l'inactivation de la voie NF-κB entraînant un blocage de la voie Th1 et donc une diminution des cytokines pro-inflammatoires.

La diminution du *Lactobacillus* et du *Bifidobacterium* (appartenant au phylum *Actinobacteria*, a également été rapportée dans plusieurs travaux, qui sont connu pour leurs effets probiotiques (Favier *et al.*, 1997).

6. Complications à long terme : Développement de cancers

Le CRC peut être classé en différentes catégories selon son origine. On observe des formes **héréditaires** de CRC qui représentent environ 20% des cas. Les formes les plus répandues sont les formes **sporadiques** (environ 80% des formes de CRC), en partie liées aux facteurs environnementaux incluant les mutagènes de l'environnement et d'origine alimentaire ou encore certaines souches de la flore commensale. Enfin, la troisième forme est **consécutif à l'inflammation intestinale** (Colitis-associated cancer : CAC), elle représente 1 à 2% de l'ensemble des CRC (Kraus *et al.* 2009; Terzic *et al.* 2010).

La fixation des cytokines à leurs récepteurs des cellules épithéliales induit l'activation des voies de signalisation oncogéniques telles qu'Akt ou mTOR. Les facteurs de transcription NF-κB et STAT3 ainsi que le gène COX2 jouent un rôle particulièrement important dans l'induction du CRC. Les cytokines principales jouant un rôle dans le développement de

tumeurs associées à l'inflammation intestinale sont le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 (Naugler *et al.* 2008 ; Kraus *et al.* 2009; Terzic *et al.* 2010; Terzic *et al.* 2010).

L'augmentation du stress oxydant au cours d'une inflammation persistante peut conduire à une dysplasie suivie de carcinome (fig.13) (Goodman *et al.* 2004).

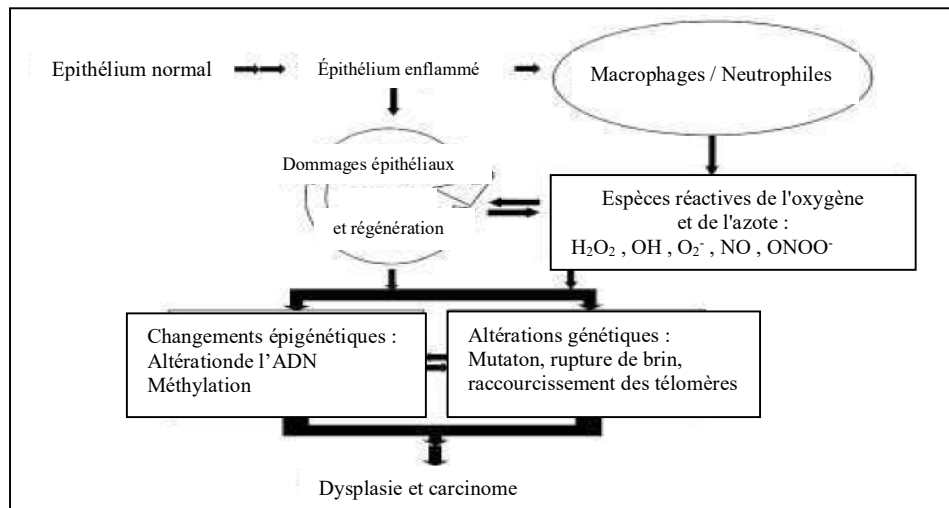


Figure 13: Relation schématique entre inflammation intestinale, stress oxydant et cancérogenèse (Seril *et al.*, 2003).

7. Stratégie thérapeutique

Les thérapeutiques indiqués dans ces pathologies sont nombreuses mais ne mènent pas à la guérison complète des patients. L'émergence de nouvelles molécules nécessite la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Actuellement, les traitements curatifs identifiés agissent sur les différentes phases de l'inflammation.

7.1. Traitements conventionnels actuels

Quatre classes médicamenteuses sont actuellement utilisées dans le traitement des MICI : les Amino-salicylés (5-ASA), les corticoïdes, les immunomodulateurs (thiopurine, méthotrexate, cyclosporine) et les biothérapies (anticorps [Ac] anti-TNF- α et anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$) (Annexe1, Fig.14). Toutefois, ces médicaments présentent des effets secondaires considérables tels que l'ostéopénie, l'ostéoporose, l'insuffisance corticotrop, l'hypertension artérielle, une insuffisance cardiaque congestive, des atteintes démyélinisantes centrales (sclérose en plaque) ou périphériques (syndrome de Guillain Barré), lupus érythémateux...etc (Dear *et al.*, 2001 ; Sarzi-Putini *et al.*, 2003 ; Silburn *et al.*, 2008; Stasi *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2011).

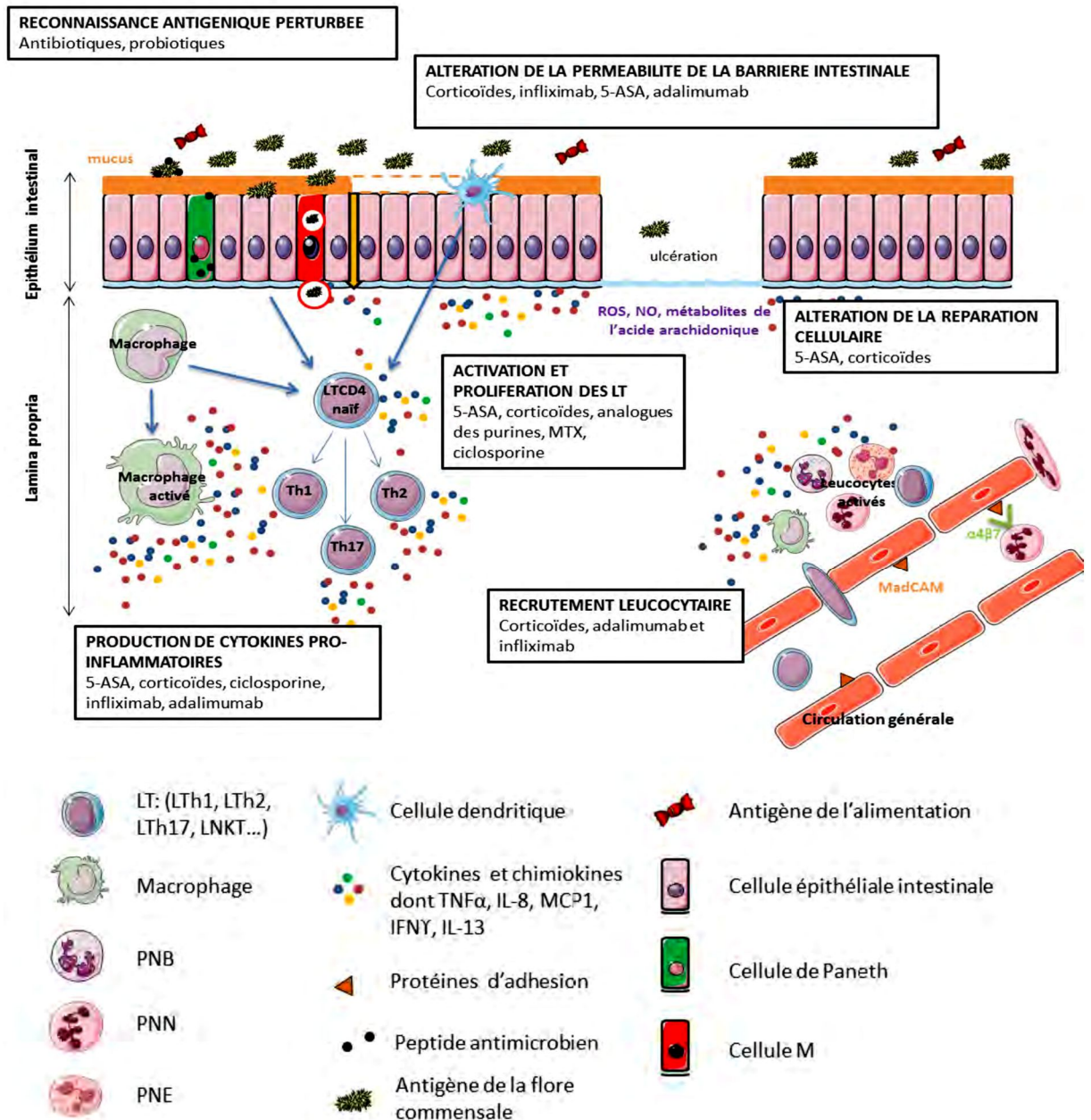


Figure 14 : Place des thérapeutiques actuelles dans la physiopathologie des MICI (Nahon *et al*, 2001)

7.2.Traitement symptomatiques

Ils comprennent le repos, une alimentation saine et la prise d'anti-diarrhéiques et anti-spasmodiques. On peut ajouter à cela des approches non conventionnelles telles que des approches psychothérapeutiques afin de maîtriser le stress qui peut favoriser l'apparition de crises (Frexinos *et al.*, 2003).

7.3. Traitement chirurgical

L'arsenal thérapeutique reste donc limité. En effet, la moitié des patients atteints de la MC sont encore opérés d'une résection intestinale dans les 10 premières années après le diagnostic de la maladie (Buisson *et al.*, 2012), et 20% des patients atteints de RCH subissent une colectomie au cours de leur vie (Solberg, Lygren *et al.* 2009).

7.4. Futures approches thérapeutiques

7.4.1. Pré- et probiotique

Des patients atteints de MC active traités avec un mélange de bactéries commensales VSL#3® (un probiotique composé majoritairement de *Streptococcus thermophilus* mais contient aussi *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* dans une moindre mesure et *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* et *L. bulgaricus* dans de faibles proportions) ont une réponse thérapeutique positive, apparemment sans effet systémique indésirable (Floch, 2003; Bibiloni *et al.*, 2005).

Différentes hypothèses (Fig.15) sont alors émises concernant leurs capacités à produire des composants anti-bactériens, anti-adhésions, ainsi que leurs capacités à diminuer le pH de la lumière intestinale ou à créer une compétition vis à vis des nutriments (Imaoka *et al.*, 2008). Par exemple, *Bifidobacterium infantis* réduit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12 et IFN- γ) en réprimant la translocation de NF- κ B dans un modèle de souris KO pour le gène de l'IL-10. De la même manière *Saccharomyces boulardii* inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammation en agissant sur NF- κ B. VSL#3 induit la production d'IL-10 par les cellules dendritiques isolées du sang périphérique et de la muqueuse intestinale, et réprime la réponse Th1 *in vitro* (Sartor, 2004; Seksik, 2007; Stephani *et al.*, 2011).

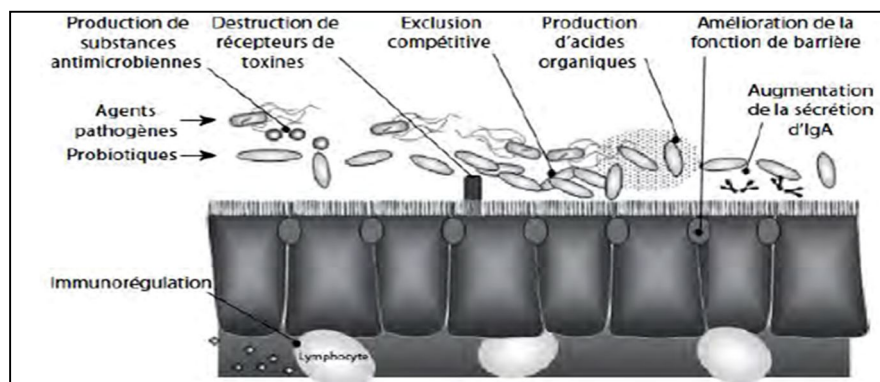


Figure 15 : Récapitulatif du mécanisme d'action des probiotiques (Chermesh and Shamir, 2009)

Les **prébiotiques** permettent la croissance et la prolifération de ces bactéries et peuvent modifier l'environnement intestinal, par exemple en acidifiant le pH colique. Les données cliniques restent limitées mais une étude pilote chez des malades atteints de MC a montré que l'ingestion quotidienne de FOS pendant trois semaines augmentait la concentration de bifidobactéries fécales tout en diminuant l'activité inflammatoire de la maladie. Les acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate) issus du métabolisme des oligosaccharides prébiotiques sont les principaux carburants du colonocyte et ont des effets trophiques et anti-inflammatoires sur le côlon adulte (**Segain, et al, 2000**). Les fibres alimentaires pourraient donc exercer un effet protecteur vis-à-vis des MICI en augmentant la production colique de ces acides gras (**Galvez et al, 2005; Tedelind, et al, 2007**).

7.4.2. Thérapie cellulaire

Les futures approches thérapeutiques devraient cibler la phase de résolution de l'inflammation aiguë. A ce jour, environ 28 essais cliniques sont en cours, incluant des thérapies cellulaires concernant la MC luminale et la RCH. Parmi les études les plus récemment publiées on retrouve les approches « Ovasave », développée par la société TxCell (lymphocytes Tr1 autologues) (**Desreumaux et al. 2012**), «le remestemcel : Prochymal® » de chez Osiris (CSM : cellules souches adultes mésenchymateuses) (**Kurtzberg et al. 2014**) qui est en cours d'évaluation pour le traitement de la MC, et « PDA-001 » de chez Celgene Cellular Therapeutics (cellules souches dérivées du placenta) (**Mayer et al. 2013**). Ces premiers essais cliniques montrent pour le moment une bonne tolérance de ces produits.

7.4.3. Phytothérapie

Plusieurs études démontrent que les polyphénols modulent l'inflammation intestinale par trois différents mécanismes anti-inflammatoires : *a)* en inhibant les enzymes proinflammatoires telles que la cyclooxygénase (COX-2), la lipoxigénase (LOX) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), et en activant des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ)) (**Yoon & Baek, 2005 ; Boivin et al., 2007; Denis et al., 2013**); *b)* en inhibant les cytokines/chemokines, la phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase), le NF- κ B, les MAP kinases (mitogen activated protein kinases) et les JAK/STAT (Janus kinase protein/ Signal Transducer and Activator of Transcription) (**Yang et al, 2001 ; Romier et al., 2009 ; Sergent et al, 2010; Denis et al., 2013; Barnett , 2013**); et *c)* en activant les mécanismes épigénétiques

(méthylation de l'ADN/histones et activité des sirtuines) (Verma *et al.*, 2004 ; Scarpa & Stylianou, 2012).

Cependant, le resvératrol et la génistéine ont montré une activité stimulatrice de NF- κ B dans les cellules Caco-2 (Romier *et al.* 2008), les polyphénols réduisaient la sécrétion de modulateurs pro-inflammatoires. Le kaempférol, la génistéine et l'EGCG diminuent la sécrétion d'IL-6 par les cellules Caco-2 (Paradkar *et al.* 2004). L'EGCG diminue également la sécrétion de TNF- α , de prostaglandine E2 et de COX-2 (Porath *et al.* 2005).

Chapitre II

Phytothérapie : Polyphénols et huiles essentielles

La phytothérapie est la médecine par les plantes, selon l'O.M.S (organisation mondiale de la santé) la phytothérapie est considérée comme médecine alternative.

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides, tels que les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes (Wink., 2003 ; Aharoni & Galili, 2011).

1. Polyphénols

Ce sont des métabolites secondaires des plantes (Garcia-Salas *et al.*, 2010) élaborés par deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (Lugasi *et al.*, 2003), et caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2015 ; Šaponjac *et al.*, 2016).

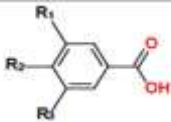
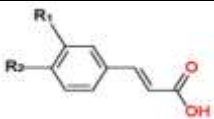
1.1. Classification

On distingue les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les stilbènes (C6-C2-C6) (fig.16).

1.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

C'est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Ignat *et al.*, 2011), et divisés en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxybenzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxycinnamiques (Tab.1). Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique, et l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (Heleno *et al.*, 2015).

Tableau1 : Structure des acides phénoliques (Ksouri *et al.*, 2012)

Acides phénoliques	Structure chimique	Exemples
Acides hydroxybenzoïques		R1= R2=R3 =OH : Acide gallique R1= H ; R2 =OH ; R3=OCH ₃ : Acide vanillique
Acides hydroxycinnamique		R1= OH ; R2 =H : Acide coumarique R1=R2 =OH : Acide caféïque R1= OCH ₃ ; R2 =OH : Acide férulique

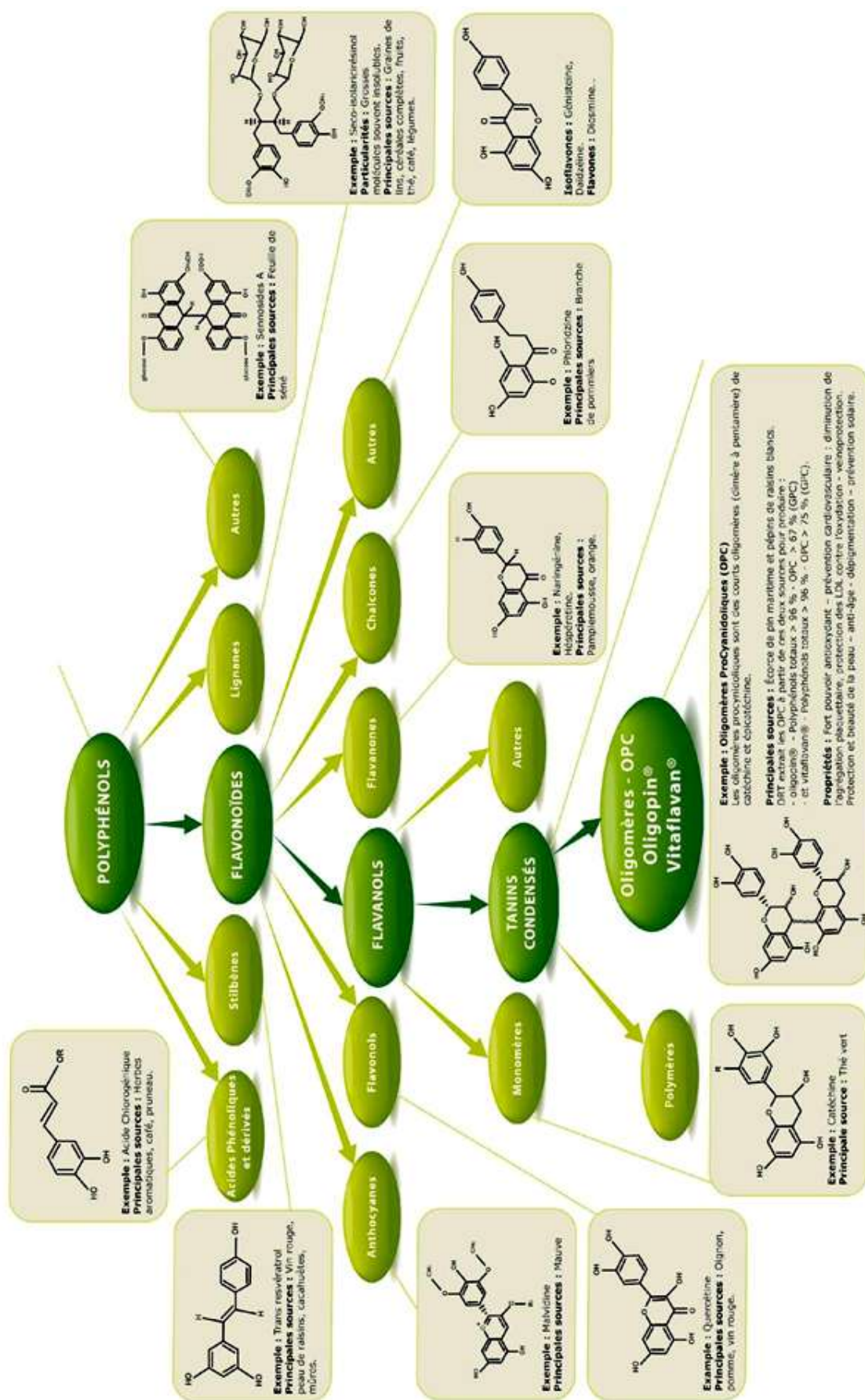


Figure 16 : Classification des polyphénols

1.1.1. Lignanes (C6-C3)₂

Ils ont été définis comme étant les dimères des phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C6-C3 sont liées par leur carbone 8 (**Sainvitu *et al.*, 2012**). Ces composés se retrouvent en quantité importante dans les graines de lin et en quantités moindres dans les légumineuses et dans les légumes (**Charles & Benbrook, 2005**).

1.1.2. Stilbènes (C6-C2-C6)

Ces composés sont en très petite quantité dans l'alimentation humaine. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol (fig.17) (**Manach *et al.*, 2004 ; El Gharas, 2009**).

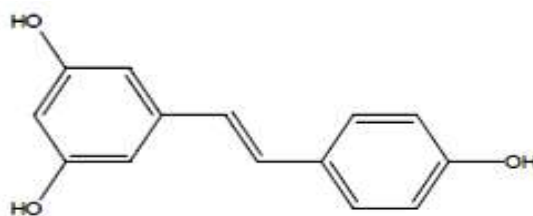


Figure 17 : Structure chimique du resvératrol

1.1.3. Flavonoïdes (C6-C3-C6)

Ces composés ont une structure de base formée de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle oxygéné « Cycle C » (fig.18) (**W- Erdman *et al.*, 2007**). Ils regroupent les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les anthocyanes, les chalcones et dihydrochalcones, et les flavan-3-ols ou flavanols (catéchines et proanthocyanidines « tanins condensés »), (**Crozier *et al.* 2009; Bruneton, 2015**).

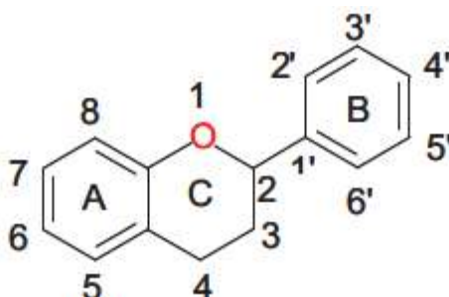


Figure 18: structure générique de flavonoïdes (**Crozier *et al.*, 2009**)

1.2. Biosynthèse des polyphénols

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Fig.19). C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques (la tyrosine et la phénylalanine). La désamination de la phénylalanine conduit à la formation de l'acide cinnamique qui est à l'origine de la voie des phénylpropanoïdes, qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine (**Bruneton, 1993 ; Macheix *et al.*, 2000; Macheix *et al.*, 2005**).

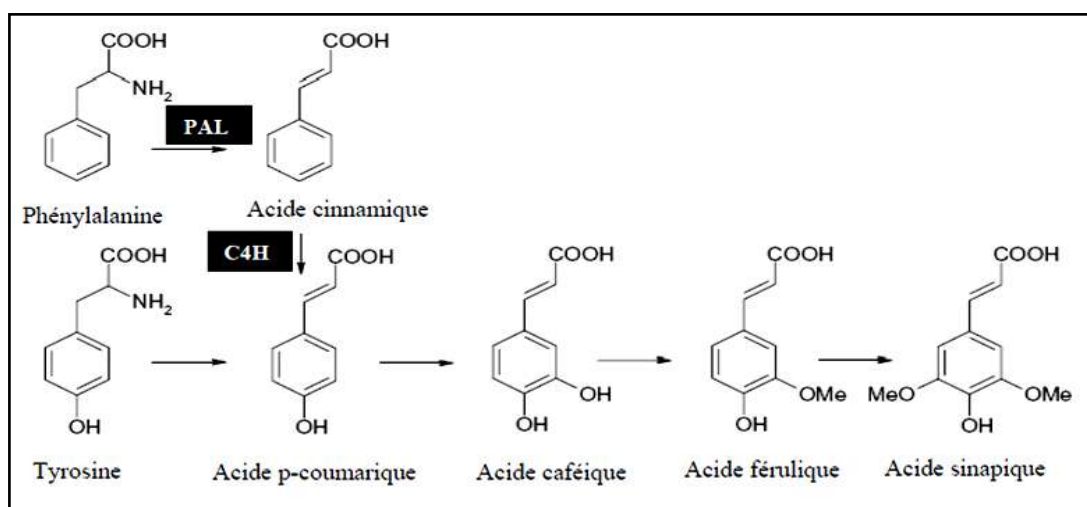


Figure 19: Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (**Crozier *et al.*, 2006**)

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase

1.3. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

Le taux de polyphénols est influencé par des facteurs externes comme le climat, la saison, les facteurs géographiques comme l'altitude, la nature du sol, la lumière, les microorganismes pathogènes et les traitements appliqués par l'homme, et des facteurs génétiques (**Fleuriet & Macheix, 2003 ; Dinelli *et al.*, 2006 ; Gori *et al.*, 2020**).

Il varie également en fonction du stade physiologique. Chaque groupe de composés phénoliques peut évoluer au cours de la croissance selon une cinétique qui lui est propre (**Macheix *et al.*, 2005**).

1.4.Métabolisme & Biodisponibilité des polyphénols

Les polyphénols ingérés peuvent pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie. La biodisponibilité des polyphénols dépend de trois facteurs essentiels : la capacité de transport à travers la bordure en brosse des entérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des polyphénols conjugués vers le sang et la capacité de la sécrétion biliaire.

En effet, les polyphénols peuvent être absorbés par l'intestin dans leur forme aglycone ou encore être conjugués par méthylation, sulfatation ou glucuronidation (**Manach et al., 2006**). Une partie de ces polyphénols est déversée dans le sang après leur transformation tandis qu'une autre est destinée à poursuivre le transit vers le grêle et le côlon (Fig.20). Les métabolites hautement conjugués, destinée finalement aux différents tissus, pourrait résulter en un effet biologique potentiel ou être éliminée dans les urines. Cependant, les petits conjugués pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les β -glucuronidases de la flore colique libérant ainsi de nouveaux aglycones qui peuvent être réabsorbés au niveau de la muqueuse colique établissant ainsi un cycle entéro-hépatique. Ce recyclage permettrait de maintenir une concentration de polyphénols non négligeable dans le sang (**Gee et al, 1998; Crespy et al., 2003 ; Manach et al., 2004 ; Crozier et al, 2009; Del et al, 2010**).

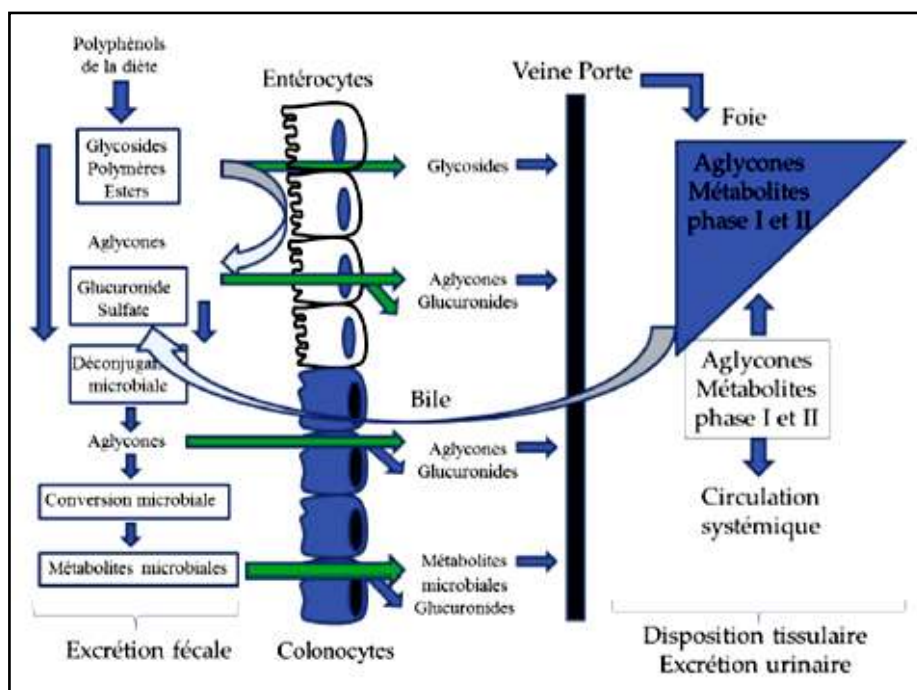


Figure 20 : Métabolisme intestinal des polyphénols chez l'humain (Scalbert et al., 2000)

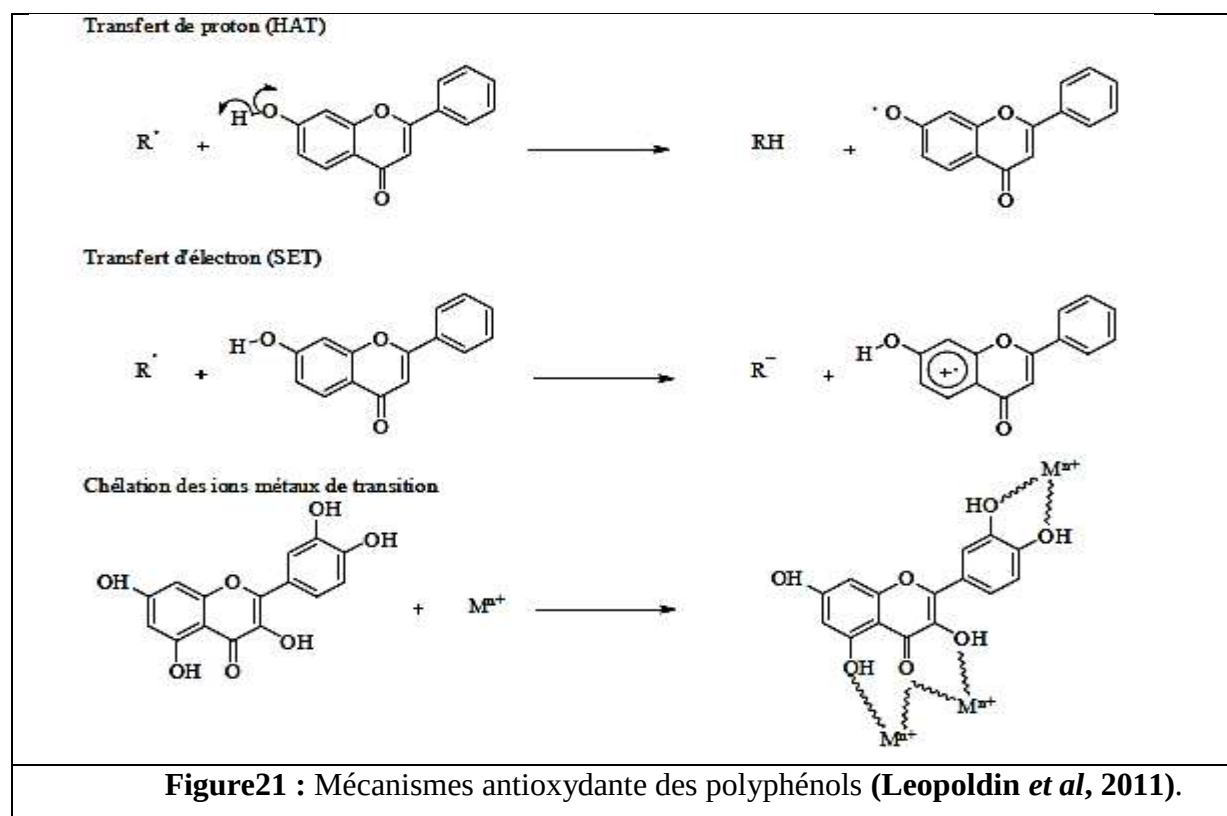
1.5. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique (Tab.2): Antioxydante (**Belmimoun et al, 2016**), antibactérienne (**Belmimoun et al, 2016 ; Side Larbi et al, 2016**), antifongique (**Belmimoun et al, 2020**), et anti-inflammatoire (**Brezani et al, 2018 ; Laganà et al, 2019**).

- **antioxydante** : soit par un transfert d'électron, un transfert de proton ou la chélation des ions métalliques (fig.21) (**Leopoldin et al, 2011**).
- **antimicrobienne** : peut être liée à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999 ; Kumar & Pandey, 2013**).
- **anti-inflammatoire** : par plusieurs mécanismes ; l'inhibition la cyclooxygénase et la lipoxygénase (les 02 enzymes sont responsable sur le métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandines et leucotriènes, pour induire les phénomènes inflammatoires), effet sur la production et la libération de cytokines liées à l'inflammation et la production d'oxyde nitrique, et l'effet sur l'inhibition de la libération d'enzymes et de médiateurs à partir des neutrophiles, des cellules mastocytes et les macrophages (**Rathee et al, 2009 ; Brezani et al, 2018**).
- **anticancéreuse** : elle est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes : piégeage des radicaux libres, l'inhibition du métabolisme d'acide arachidonique, la formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog, 1996**), la prévention de l'activation des métabolites carcinogènes, l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses, l'induction de l'apoptose, et/ou l'inhibition des processus d'angiogénèse (**Ren et al, 2003**).
- **autres activités** : antidiabétique (**Singh et al, 2014**), effets protecteurs dans plusieurs pathologies telle que les maladies cardiovasculaires, les troubles neurologiques, etc. (**Brunetti et al, 2013; Baskar et al, 2018 ; Fraga et al, 2019**).

Tableau 02 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques

	Composé phénolique	Activité	Référence
Flavonoïdes	epigallocatechin gallate (EGCG),	antimicrobienne	(Evensen & Braun, 2009 ; Ning <i>et al</i> , 2015)
	Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine ;	antivirale	(Tapas <i>et al</i> , 2008)
	baicalein, quercetin, quercetagenin et naringenin		(Cotin <i>et al</i> , 2012)
	Quercétine, kaempférol, myricétine ; Epigallocatechine, galocatechine	anti-inflammatoire	(Tapas <i>et al</i> , 2008) ; (Elgorashi & McGaw, 2019)
	lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline, épigallocatechine-3-gallate	anticancéreuse	(Brusselmans <i>et al</i> , 2005)
Tanins	galliques et catéchiques	Antioxydante	(Macheix <i>et al</i> ., 2005).
Acides Phénoliques	cinnamiques et benzoïques	Antifongique Antioxydante	(Lattanzio <i>et al</i> ., 2001), (Bouayed <i>et al</i> ., 2008) ;
	acide ellagique	antivirale	(Park <i>et al</i> , 2014)



2. Huiles essentielles

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.*

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (**Baser & Buchbauer, 2010**).

2.1. Localisation des HE

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule.

Elles sont stockées dans des cellules sécrétrices (Lauraceae, Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae, Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae, Asteraceae) (**Bruneton, 1993**).

L'accumulation des HEs peut être dans toutes les parties de la plante: les fleurs (bergamotier, rose,...), les feuilles (eucalyptus, laurier,...), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre, curcuma,...), les fruits (badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...) ou les graines (ambrette, muscade,...) (**Bruneton, 1999 ; Anton & Lobstein, 2005; Oussala et al., 2006**).

2.2. Biosynthèse et Chimie des HE

Les huiles essentielles peuvent contenir une centaine de composées différentes, appartenant à deux groupes : les **terpénoïdes** dérivant de la voie de mevalonate ou pyruvate via le précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP), et les **phénylpropanoïdes** dérivant de la voie de shikimate (**Clarkf, 2008**) :

Les terpénoïdes : Ils proviennent de l'isoprène répondant à la formule générale $(C_5H_8)_n$, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}) et moins fréquemment les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}) (**Calsamiglia et al, 2007; Benchaar et al, 2008 ; Baser & Buchbauer, 2010**).

Les phénylpropanoïdes : Ces constituants dérivent majoritairement de la phénylalanine.

Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle, et constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones. Les phénylpropanoïdes sont moins représentés dans l'HE que les terpènes (**Sangwan et al, 2001**).

2.3. Méthode d'extraction

L'hydrodistillation est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée où le matériel végétal à extraire est en contact direct avec l'eau en ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (**Bruneton, 1999; Baser & Buchbauer, 2010**). L'entraînement à la vapeur d'eau ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les huiles volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant, condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). (**Pharmacopée Européenne, 2007 ; Boukhatem et al., 2019**).

Cependant les composés volatiles sont connus comme étant thermosensibles et vulnérables aux réactions chimiques (**Boukhatem et al., 2019**). Des techniques plus récentes, d'un emploi très limité, comme celles assistées par micro-ondes, aux ultrasons ou encore les fluides subcritiques ou supercritiques, l'expression à froid, etc. (**Gavahian et al, 2015; Chemat et al., 2015; Mohammadhosseini et al, 2015, Ferhat et al, 2018**).

2.4. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons (la température et l'humidité), le saison, les facteurs géographiques comme l'altitude, la nature du sol (**Brada et al., 2007 ; Soni et al, 2015**).

Les facteurs intrinsèques regroupent le chimiotype (**Anton & Lobstein, 2005**), le cycle de la plante dont les poussées de biosynthèse engendrent une accumulation plus ou moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques au cours de la période de récolte (des saisons, des mois, voire des journées). Les diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, écorce, racine, etc.) peuvent produire des essences différentes (**Sallé, 2004 ; Simonet et al., 2006; Möller, 2008**).

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme les procédés d'extraction, l'état du matériel végétal (Smallfield, 2001; Cicile, 2002) et les conditions de stockage, influent sur la qualité et la composition chimique des huiles essentielles, et par conséquent leurs pouvoirs thérapeutiques.

2.5. Toxicité des HEs

Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature (Traoré, 2006). En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: une DL50 comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées: anis, eucalyptus, girofle....ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton, 1999 ; Benzeggouta, 2005).

2.6. Activités biologiques

Plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles: cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique (Bruneton, 1999), antimicrobienne (fig.22) (Burt, 2004 ; Side Larbi *et al*, 2016; 2020), antiinflammatoire (Kerbouche *et al*, 2015 ; Belkhodja *et al*, 2016) , désinfectante du système respiratoire (Inouye *et al*, 2001), antioxydante (Dorma *et al*, 2000 ; Belmimoun *et al*, 2016), acidifiante, tonicardiaque, oxydante des déchets du métabolisme, fluidifiante du sang, antivenimeuse, antispasmodique, pour la conservation tissulaire (embaumement vivant), pouvoir de protéolyse rapide, sédation épidermique locale, revitalisation par oxygénation et défloculation du sang (Bernadet, 2000). Ce sont les terpènes, parmi les constituants chimiques, qui sont responsables de ces vertus et par conséquent, usages médicaux des plantes aromatiques et médicinales (Dorman and Deans, 2000).

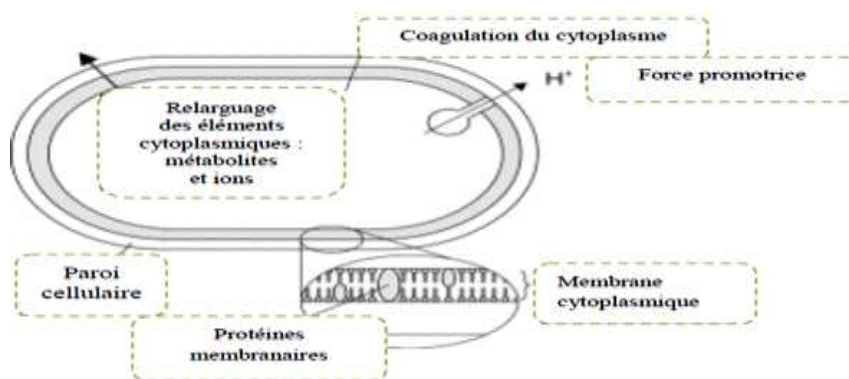


Figure 22: Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

Chapitre III

Teucrium polium

& Punica granatum

1. *Teucrium polium* L.

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales.

La famille des Lamiacée est l'une des plus répandues dans le règne végétal. Un très grand nombre de genre de la famille des Lamiacée sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridiodes glycosylés et composés phénoliques (Naghibi *et al.*, 2005).

Le genre *Teucrium* fait partir des genres les plus importants de la famille des Lamiacées, est réparti en 340 espèces et variétés environs. D'un point de vue taxonomique, elles sont identifiables grâce à la forme du calice et inflorescence (Velasco-Negueruela & Perez-Alonso, 1990 ; Grubestic *et al.*, 2007). Le genre *Teucrium* est présent en Algérie avec 22 espèce et 12 sous espèce (Quezel & Santa, 1963 ; Fertout-Mouri *et al.*, 2016).

1.1.Noms vernaculaires

Différents noms sont donnés à l'espèce en fonction de la population et du lieu où on la trouve. Les plus connus sont ; khayata, j'ada, Katabet ledjah (Arabe), hamzoucha, hamria, djertil, , Mezouqach, Takmazut (targui ou berbère), Jeadia (Jordan), germandrée tomenteuse (Français), Germander (Anglais), poliot (Italien) Poleo montano (Nom en espagnol) (Autore *et al.*, 1984; Tariq *et al.*, 1989; Krache, 2009; Wamidh & Adel, 2010).

1.2.Systematique

Selon Autore *et al.*, (1984), *Teucrium polium* L, est classée comme suit :

Tableau 3: Représentation schématique & Classification botanique de *Teucrium polium* L.

Embranchement :	Spermatophytes (plantes à graine)	
Sous embranchement :	Angiospermes (<i>Magnoliophyta</i> : plantes à fleur)	
Classe :	Dicotylédones (<i>Magnoliopsida</i>)	
Sous classe :	Asteridae	
Ordre :	Lamiales	
Famille	Lamiacées	
Genre :	<i>Teucrium</i>	
Espèce :	<i>Teucrium polium</i> L.	

1.3. Description botanique et répartition géographique

Teucrium polium est une espèce très variable ; de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce. C'est une plante herbacée vivace à odeur poivrée par frottement, fortement révolutes sur les marges. Les tiges sont de 10-30 cm de hauteur, blanches-tomenteuses portant des feuilles opposées sessiles, linéaires-lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut. Ces feuilles, blanches tomenteuses sur les deux faces ont les bords enroulés. Les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées. Le calice brièvement tomenteux, à des dents courtes, la supérieure obtuse ; Corolle à lèvre supérieure tronquée et à lobes supérieurs pubescents (Quezel et Santa, 1963; Boulard, 2003 ; Naghibi *et al.*, 2005).

La Germandrée tomenteuse est originaire du sud-ouest d'Asie, d'Europe et d'Afrique du nord (abandonnement trouvée dans le secteur Irano-Turanien principalement méditerranéen et occidental). Elle pousse dans les pelouses arides, les rocaillies de basse altitude, collines et les déserts arides (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Hasani *et al.*, 2007)

1.4. Utilisations en médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle, *T. polium* est employée pendant plus de 2000 années comme diurétique, inotropique et chronotropique, tonique, antipyrétique, cholagogue et anorexiques (Khleifat *et al.*, 2001 ; Niazmand *et al.*, 2008), hypoglycémiant (Esraeili & Yazdanparast, 2004), analgésique, antispasmodique et hypolipidémique. Cette plante peut avoir quelques intérêts d'ordre cliniques: cas de désordres stomacaux et gastrointestinaux tels que la colite et soulager ces douleurs (emploi folklorique), elle est utilisée également dans les bronchites chroniques (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Boulard, 2003 ; Dehghani *et al.*, 2005 ; Kaileh *et al.*, 2007 ; Rajabalian, 2008).

1.5. Données phytochimiques de la plante

Les études phytochimiques sur les espèces de *T. polium* ont montré la présence de divers composés bioactifs qui sont principalement les flavonoïdes et les diterpénoïdes néocléroïdanes, particulièrement les furano néocléroïdanes (Bahramikia & Yazdanparast, 2012 ; I. Bozov & N. Penchev, 2019).

Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. polium* développée dans différents secteurs géographiques. La plupart de ces études ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les polyphénols (Stefkov *et al.*, 2009; Djabou *et al.*, 2012), des saponines (Hassan *et al.*, 2007), tannins et alcaloïdes (Shakhanbeh &

Atrouce, 2001; Parsaee & Shafiee-Nick, 2006), les diterpénoïdes avec un squelette neoclerodane, avec plus de 220 diterpènes (Piozzi *et al.*, 2005), les huiles essentielles principalement monoterpéniques/ sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés (Cozzani *et al.*, 2005; Kabouche *et al.*, 2007; Belmekki *et al.*, 2013; Elmasri *et al.*, 2014), les glycosides phenylethanoides tels que verbascoside, poliumoside et la vandulifolioside (Proestos *et al.*, 2004; Parsaee & Shafiee-Nick, 2006), les glycosides de flavones avec aglycones très méthylés (Sharififar *et al.*, 2009).

Les flavonoïdes qui ont été isolés incluent luteoline, apigénine, diosmétine, cirsimaritrine, cirsilole, cirsilinéol (Stefkov *et al.*, 2009), 5-hydroxy-6,7,3',4' tétraméthoxyflavone, salvigénine, apigénine 5 galloylglucoside, apigénine-7-glucoside, vicénine, luteoline-7-glucoside (Hasani *et al.*, 2007).

1.6. Données pharmacologiques et biologiques

Teucrium polium L. possède un large spectre d'effets pharmacologiques (Khazaei *et al.*, 2018), notamment antioxydants (El Atki *et al.*, 2019 ; 2020), hépatoprotecteurs (Shtukmaster *et al.*, 2010), hypolipidémiques (Stefkov *et al.*, 2011), antihypertenseurs (Niazmand *et al.*, 2011), neuroprotecteurs (Schröder *et al.*, 2013), antirhumatoïde (Tariq *et al.*, 1989), antiviraux (Alreshidi *et al.* 2020), antibactériens (Belmekki *et al.*, 2013 ; Boukhebti *et al.*, 2019) et antifongiques (Bahramikia et Yazdanparast, 2012) , cicatrisants (Chabane *et al.*, 2020), antispasmodiques , anti-nociceptifs et anti-inflammatoires (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Kaileh *et al.*, 2007 ; Menichini *et al.*, 2009 ; Kerbouche *et al.*, 2015), antidiabétiques (Asghari *et al.*, 2021), anticancéreux (Hashem-Dabaghian *et al.*, 2020; Al-Hamwi *et al.*, 2021).

1.7. Données toxicologiques

Il a montré expérimentalement que la nécrose hépatique (Shivakumar & Geoffrey, 2008; Fiorentino *et al.*, 2011) peut être provoquée par un extrait de germandrée enrichi en diterpènes (Kabouche *et al.*, 2007), le cytochrome P450 active les furano néoclérodes de la germandrée tomenteuse en époxydes toxiques qui peuvent être neutralisés par conjugaison avec le glutathion ; en cas contraire, les époxydes provoquent une déplétion en glutathion et thioprotéines, interagissent avec les protéines hépatiques et provoquent l'apoptose de cellules hépatiques (Mattéi *et al.*, 1995 ; Mazokopakis *et al.*, 2004; Stickel *et al.*, 2005).

2. *Punica granatum* L.

2.1. Nomenclature

La nomenclature est purement locale. Plusieurs régions donnent leurs noms aux variétés cultivées. Des récentes investigations ont identifié plus de 60 écotypes nommés principalement en fonction de leurs origines géographiques ainsi que la couleur des fruits (Jbir *et al*, 2008).

En Algérie, il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes (Espagne rouge, Corda travita, Moller huesso, Mellisse, Gajin, Sefri, Zemdaautomne, Sulfani, Spanish duoy, Chelfi, Doux de kolea, Messaad ...) (INRAA, 2006)

Les plus connus sont ; Romane (Arabe), pomegranate (Anglais), grenadier (Français), Melograno (Italien), Granado (espagnol).

2.2. Systématique

Le grenadier, *P. granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753 :

Tableau 4 : Classification botanique de *Punica granatum* L.

Embranchement:	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Myrtales</i>
Famille :	<i>Punicaceae</i>
Genre :	<i>Punica</i>
Espère :	<i>P. granatum</i> L.

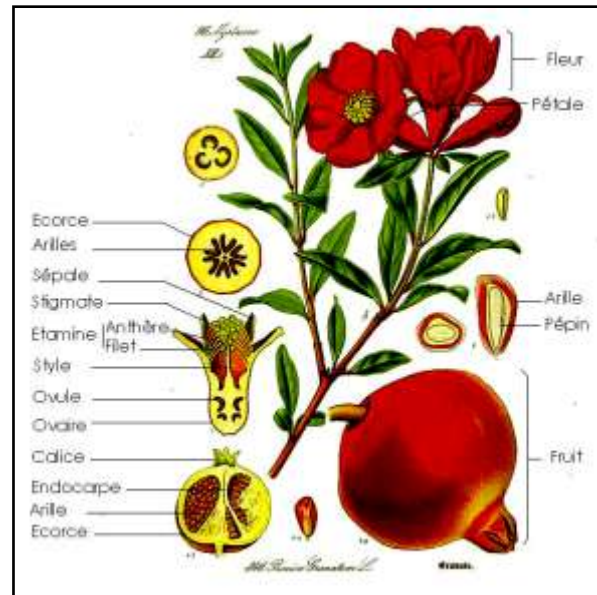


Figure 23: Fleurs et fruits du Grenadier **Flora von Deutschland and Schweiz. 1885)**

2.3. Description botanique

Le Grenadier est un petit arbuste des régions méditerranéennes, abondant en Afrique du nord, qui peut atteindre 6 m de haut. Il peut vivre jusqu'à 200 ans. Les branches sont angulaires, le feuillage est caduque. Les feuilles épineuses glabres sont opposées, de forme ovale à oblongue et de 2 à 8 cm de long sur 2 cm de large.

Le pétiole est court, ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre à 5-7 pétales et son fruit « le grenade », une baie cortiquée arrondie surmontée des dents du calice le rendent facilement identifiable, contient en moyenne 600 graines pulpeuses. Les fruits sphériques sont couronnés par les sépales persistants et ont la taille d'une orange (6-8 cm de diamètre). La floraison a lieu en fin d'été et la fructification en septembre et octobre. **(Bruneton, 1999 ; Quezel & Santa, 1963 ; Bridel et al, 2004 ; Roth & Lindorf, 2013).**

2.4. Répartition géographique

Ce fruit est originaire d'Iran et d'Afghanistan, où le grenadier croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. Aujourd'hui sa culture s'étend à tout le bassin Méditerranéen, à la Chine, l'Inde, et au sud-ouest américain (Californie et Mexique) **(Levin, 1994).**

Dans le monde, les principaux exportateurs de grenade sont l'Inde, l'Égypte, la Turquie, avec respectivement 21,2%, 14,3% et 14,2%, où le Pérou se situe à la huitième place avec 3% des exportations mondiales **(Records, 2019 ; Nizama-Chapoñan et al, 2020).**

2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

P. granatum L. est utilisé traditionnellement pour traiter les maladies gastro-intestinales, la dysenterie, la diarrhée, les coliques, les aphtes oraux, les hémorragies, l'ulcère et le diabète. Elles sont connues aussi pour leurs propriétés antiparasitaires, astringentes et anthelminthiques (écorce, épicarpe) (Naovi *et al*, 1991 ; Mahmoud *et al*, 1994 ; Kirthikar & Basu, 2000; Vidai *et al*, 2003 ; Saxena & Vikram 2004 ; IAfaq *et al*, 2005 ; Sudheesh & Vijayaiah, 2005).

2.6. Données phytochimiques

L'étude phytochimique de *Punica granatum* L. révèle sa richesse en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes ...), ainsi que la présence des alcaloïdes, des sucres, des acides organiques, des acides aminés, des stéroïdes, des sels minéraux et des vitamines selon la partie de la plante (Fig.24) (Gil *et al*, 2000 ; Lansky et Newman, 2007 ; Syed *et al*, 2007, Nizama-Chapoñan *et al*, 2020 ; Kandyli & Kokkinomagoulos, 2020.). Cependant, les teneurs de ces constituants dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, le lieu géographique et les conditions de culture (Gil *et al*, 2000; Kulkarni and Aradhya 2005; Mirdehghan and Rahemi 2007; Schwartz *et al*. 2009).

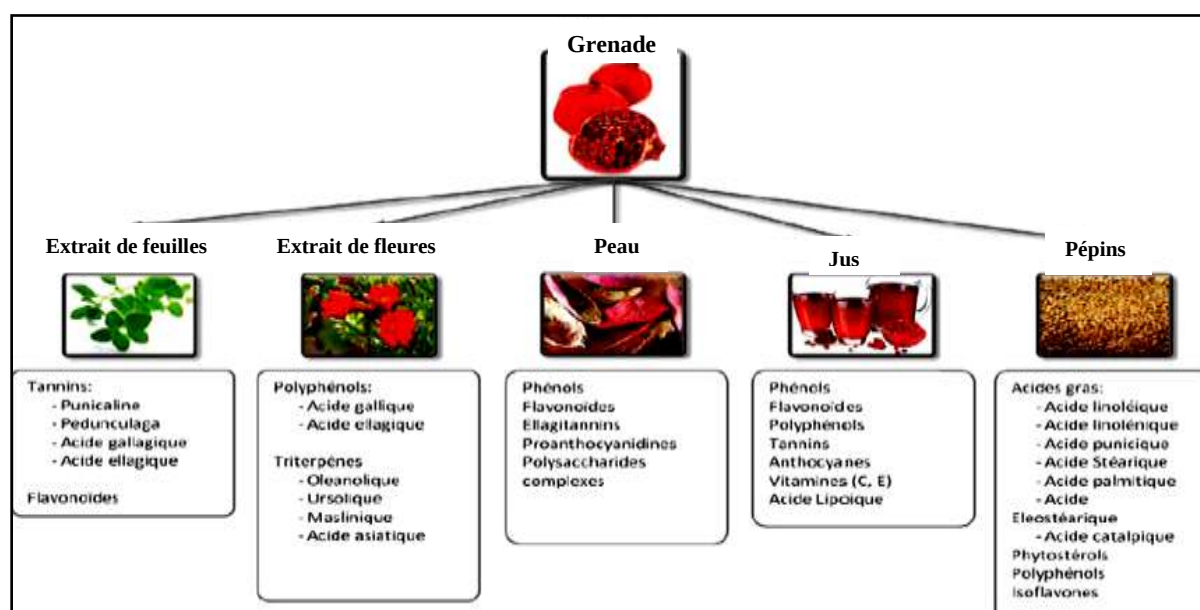


Figure 24 : Principaux constituants des différentes parties de la grenade (Al-Muammar & Khan, 2012)

2.7. Données pharmacologiques et biologiques

Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées (Fig.25) (Shaygannia *et al*, 2016 ; Melgarejo-Sanchez *et al*, 2021).

Plusieurs parties de *Punica granatum* ont été étudiées expérimentalement afin de confirmer les activités biologiques provoquées traditionnellement par cette plante : antioxydante (Kumar *et al*, 2020; Kachkoul *et al.*, 2020), antimicrobienne (Swamy *et al*, 2011 ; Chen *et al*, 2020), cicatrisante (Celiksoy *et al*, 2020), anti-ulcère (Ajaikumar *et al*, 2005), antidiabétique (Gharib & Kouhsari, 2019 ; Jandari *et al*, 2020) , et anti-inflammatoire (Gonzalez-Sarrias *et al.*, 2018 ; Pfohl *et al*, 2020). Quelques études ont montré le rôle préventif de la grenade, notamment dans le développement de l'ostéoarthrite (Hadipour-Jahromy & Mozaffari-Kermani, 2010; Shivrath *et al.*, 2020).

P. granatum et ses dérivés (jus, huile de pépins, extrait, tannins, punicalagine, acide punique) sont susceptibles d'inhiber de la voie NFκB (Ismail *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré l'activité anticancéreuse d'extraits de grenade (Thomas *et al.*, 2014 ; Valdés *et al.*, 2017; M. Yusefi *et al*, 2020), s'expliquant notamment par des mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires.

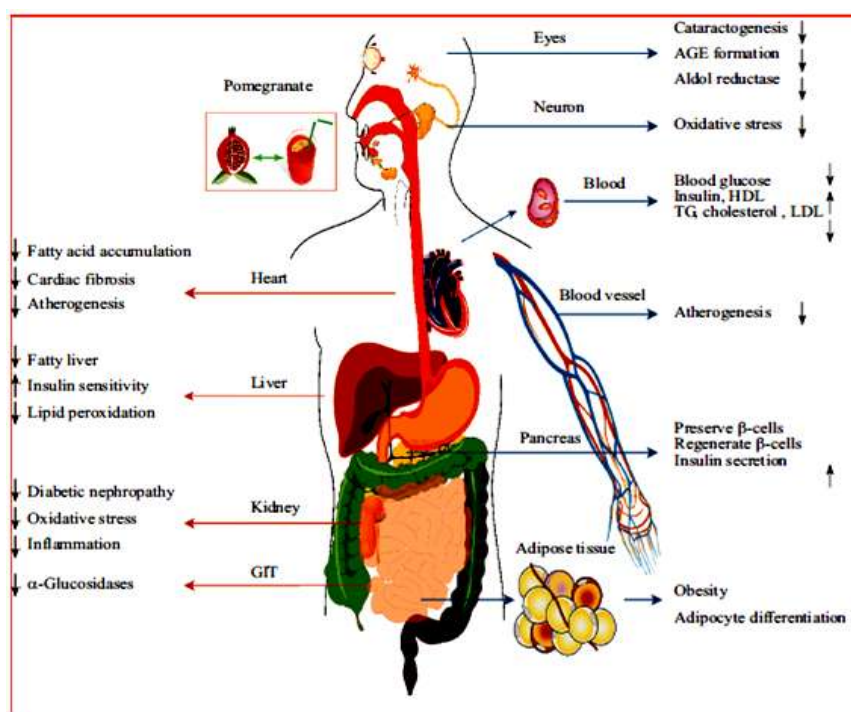


Figure 25: Effets bénéfiques de grenade (Saleh *et al*, 2017)

2.8. Données toxicologiques

Un régime enrichi en punicalagine 6% a administré chez les rats Sprague-Dawley pendant une période de 37j, aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang sauf les valeurs de l'urée et les triglycérides sont restés faibles durant toute l'expérience et l'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (**Cerda et al, 2003**). **Patel et al (2008)** a trouvé que l'administration orale de punicalagine à hauteur de 180 mg/kg/jour, pendant 90 jours, chez le rat est sans effet toxique observable.

D'autres études *in vivo* de toxicité ont montré que la dose maximale d'huile de pépins ingérée dépourvue d'effet toxique observable est de 5% d'huile soit 4,3 g PSO/kg/jours (**Meerts et al. 2009; Yuan et al. 2009**).

Etude Expérimentale

*« L'effort n'est pas un combat avec le destin, parce que
c'est le Destin lui-même qui nous a imposé cet effort »*

Jalâl al-Dîn Rûmî

Matériels & Méthodes

1. Objectifs de l'étude

L'intérêt porté aux plantes médicinales comme sources naturelles de nombreux principes actifs, a sensiblement augmenté au cours des 20 dernières années. Le présent travail s'oriente vers l'étude des composés phénoliques et huiles essentielles potentiellement actives dans quelques plantes médicinales de la région de Mascara.

L'objectif recherché, est une contribution à élargir le spectre des biomolécules actifs, pouvant devenir des substituts de drogues synthétique. Selon la figure 26, l'étude porte sur :

- ✓ Extraction des composés phénoliques et huiles essentielles de quelques plantes endémiques à caractère médicinal du Nord Oust Algérien (Mascara) ;
- ✓ Etude de l'évolution du contenu phénolique et huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* L. et du fruit *Punica granatum* L. durant les différents stades de développement ;
- ✓ Evaluation des activités biologiques *in vitro* (application biologique) ;
- ✓ Evaluation de la toxicité des extraits sélectionnés sur des rats *Wistar* ;
- ✓ Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire intestinale des extraits sélectionnés.

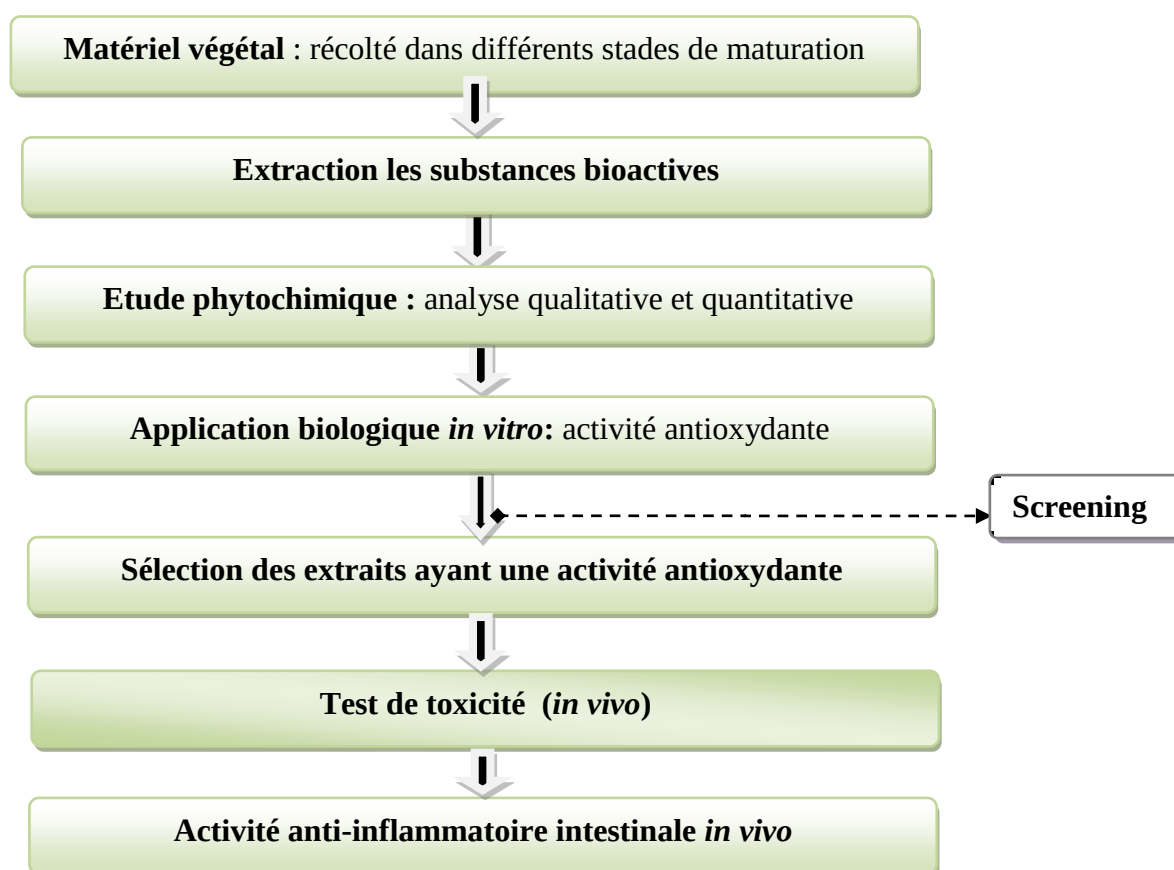


Figure 26: Représentation schématique des protocoles expérimentaux réalisés dans cette étude

Sur une période de 04 ans entre 2016 et 2019, ce travail de cette thèse a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire à l'université de Mascara, dans le laboratoire REM à l'université San Antonio de Murcia (Espagne) et dans la ferme expérimentale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie – Université de Mascara.

2. Matériels biologiques

2.1. Matériel végétal

La revue bibliographique et les résultats de l'enquête pharmacologique auprès d'une population, nous ont permis de sélectionner 02 plantes médicinales *Teucrium polium* L. et *Punica granatum* L. récoltées de la région de Mascara. Le choix de ces plantes a été basé sur :

- L'utilisation traditionnelle dans le traitement des inflammations intestinales.
- Le manque d'étude sur les polyphénols et les huiles essentielles extrait à partir les plantes sélectionnées (valorisation des plantes médicinales de la région de Mascara).
- La disponibilité de la plante.

Les fruits du grenadier *Punica granatum* L. (02 variétés) ont été récoltés aux mois de Août (Stade1 : immature) et Septembre - Octobre (Stade2 : mature) 2015 selon leurs stades de maturation (Tab.5). Les fruits sont d'abord lavés avec l'eau distillée puis les graines et les écorces ont été séparées manuellement à partir des fruits entiers, puis séchées (les écorces sont séchées au soleil et les graines sont séchées dans l'étuve à 40°C) et broyées entièrement à l'aide d'un broyeur Moulinex pour les faire passer à travers un tamis de 1.0 mm.

La plante *Teucrium polium* L. a été récolté aux 02 périodes : végétative (Janvier - Février 2015) et période de floraison (Mai – Août 2015) (Tab.5). La partie aérienne a été séchées à l'ombre pendant une semaine sur une plaque en bois, à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante. La masse végétale séchée est ensuite réduite en poudre fine et bien conservée jusqu'à son utilisation.

Les spécimens ont été identifiés par les botanistes du département de biologie, de l'université Mustapha Stambouli de Mascara.

Tableau 5 : les stations de récolte des plantes étudiées

			
		B	F
Non Scientifique	<i>Teucrium polium</i> L. (F. Lamiaceae)	<i>Punica granatum</i> L. (F. Punicaceae)	
Station de récolte	El Mamounia (Altitude: 658 m; Latitude: 35° 25' 29" N; Longitude: 0° 8' 26" E)	variété B : Bouhanifia (altitude: 237 m, Latitude: 35° 18' 58" N, Longitude: 0° 02' 54" W) variété F : Ain Fras (altitude: 371 m, Latitude: 35° 11' 25" N, Longitude: 0° 09' 09" W (altitude: 371 m, Latitude: 35° 11' 25" N, Longitude: 0° 09' 09" W)	
Partie utilisée	Partie aérienne (feuilles et tige)	Fruit (écorce et graines)	

2.2.Modèle animal

Notre étude a été réalisée sur les rats albinos Wistar « *Rattus norvegicus* » des deux sexes, pesant entre 180-200 g (pour les essais de la toxicité) et 250-300 g (pour les essais de l'anti-inflammation intestinale). Un élevage est effectué dans l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie – Université Mustapha Stambouli de Mascara. Ils sont hébergés dans des cages en plastique transparent contenant d'eau du robinet et de nourriture standard (EL AALFE) *ad libitum*. La litière est renouvelée trois fois par semaine. Les animaux sont maintenus dans les conditions favorables d'élevage (12h $\pm$ 1 h cycle de lumière, température 22 $\pm$ 3°C, humidité 50 $\pm$ 10%), selon les conseils généraux pour l'utilisation des animaux de laboratoire (Council of European Communities, 1989).

Notre étude *in vivo* est réalisée sur la base de l'OMS (2000); les lignes directrices de recherche pour évaluer l'innocuité et l'efficacité des plantes médicinales, et avec respect du bien-être des animaux.

3. Données bioclimatiques

La figure suivante représente les données bioclimatiques de la région de Mascara d'après l'office national de la météorologie (O.N.M.) (2006-2015)

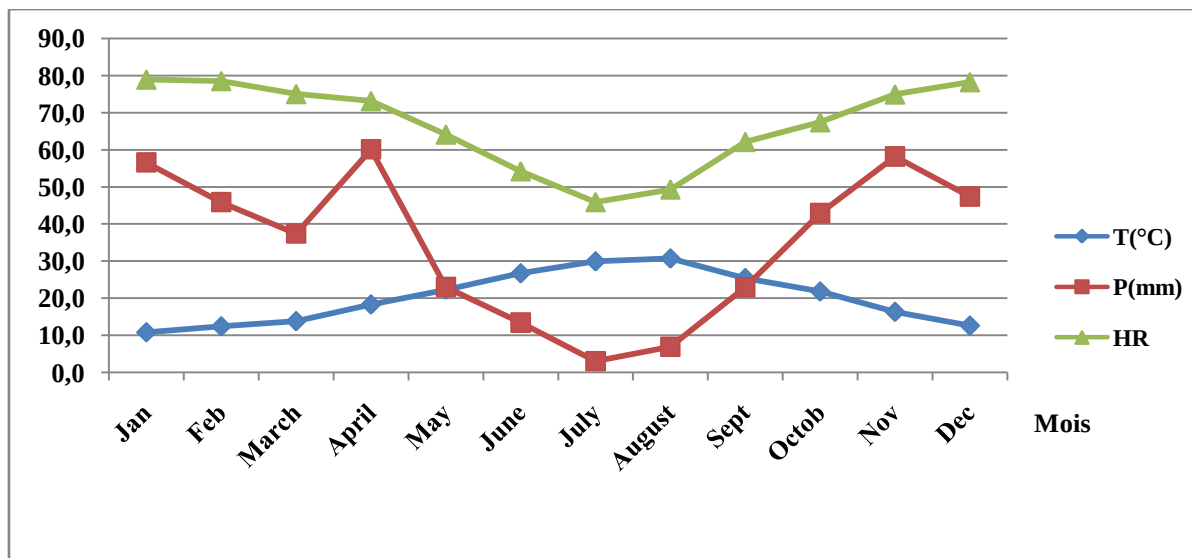


Figure 27: Données bioclimatiques de la région de Mascara durant la période 2006-2015
T (°C) : température, P (mm) : précipitation, HR (%) : humidité relative

4. Screening phytochimique

Il englobe une série de méthodes colorimétriques qui permettent de détecter de façon qualitative les métabolites secondaires (Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, stéroïdes et terpènes) dans la plante à partir de sa poudre ou de l'infusé. Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et la formation de complexes insolubles et colorés (annexe 2).

I. Etude phytochimique

5. Extraction des principes actifs

5.1. Huiles essentielles

5.1.1. Extraction

Les échantillons d'huiles essentielles, distillées à partir des tiges et feuilles ont été obtenus à partir de la plante *Teucrium polium* L. récoltée à stade végétative et à stade de floraison. La technique d'extraction des huiles essentielles (HEs) utilisée dans cette étude est l'hydro-distillation. Celle-ci a été réalisée à partir de 60 g de la plante fraîche, à l'aide d'un extracteur de type cleverger (**Pharmacopée Européenne, 2004**) pendant trois heures. Les extraits volatils recueillis par décantation à la fin de la distillation ont ensuite été séchés à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis conservés dans des flacons teintés afin de limiter les effets éventuels de la lumière.

Le rendement en huile essentielle est calculé par la formule suivante:

$$R = 100m/m_0$$

Tels que:

R: est le rendement en %, m: est la masse de l'huile essentielle, m_0 : est la masse de la plante séchée.

5.1.2. Analyse de la composition chimique des HE : CPG-SM

Afin de déterminer leur composition chimique, les huiles essentielles extraites ont été analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM), dans le laboratoire REM à l'université San Antonio de Murcia (Espagne).

La CPG-SM a été réalisée sur un chromatographe Shimadzu QP2010 couplé à un spectromètre de masse. La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une capillaire de type HP-5SM (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). La température de la colonne est programmée à raison d'une montée de 2°C / min de 60 à 250 °C pendant 5.0 min. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium dont le débit est fixé à 1,13 mL / min. Le mode d'injection est split. L'appareil est géré par un système informatique muni d'une bibliothèque de spectre de masse NIST.

5.1.3. Caractéristiques physico-chimiques

a) Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) ont été notées.

b) Mesure des indices chimiques (AFNOR., 2000)

✓ *Détermination de l'indice d'acide* (NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103))

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1.0 g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution EtOH titrée de KOH.

✓ *Détermination de l'indice d'ester* (AFNOR NF T 75- 104 : 1994)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1.0 g d'HE. L'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution EtOH titrée de KOH et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'HCl.

✓ *Mesure du pH*

Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre (pH 210, microprocessor pH Meter, HANNA).

c) Mesure des grandeurs physiques

✓ *Détermination de la densité relative à 20°C*

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.

✓ *Détermination de l'indice de réfraction* (AFNOR NF ISO 280 : 1999 (75-112)) (AFNOR., 2000)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

5.2. Composés phénoliques

5.2.1. Extraction

Le protocole d'extraction adopté dans cette étude est celui décrit par **Stanković et al. (2012)**, **Drarabpour et al. (2010)** et **Mirdehghan & Rahemi (2007)** avec quelques modifications.

Les poudres des écorces et des graines de *Punica granatum* L. ont été macérées dans l'éthanol (95%), méthanol (80%), acétone (70%) et l'eau distillée avec un rapport de 10% sous agitation à 4°C pendant 24 heures.

Dix g de la poudre de la plante *Teucrium polium* L. (S1 et S2) sont mis en macération dans 100 mL de solutions aqueuses des solvants : méthanol 80%, acétone 70%, eau distillée et acétate d'éthyle sous agitation à 4°C pendant 24 heures.

Chaque mélange est ensuite laissé à décantation pendant 24 heures à 4°C et le surnageant de chaque extrait a été récupéré puis filtré à l'aide d'un papier Whatman (N°3), les filtrats obtenus sont concentrés à l'aide du rotavapeur et l'extrait obtenu est conservé à +6°C. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = 100 \, m / m_0 \text{ (AFNOR, 1986)}$$

Tels que:

R: est le rendement en % ; m: est la masse de l'extrait ; m_0 : est la masse de la plante.

5.2.2. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe de la méthode

L'évaluation des polyphénols totaux a été effectuée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965; Li *et al.*, 2006). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

➤ Mode opératoire

À 0.25 ml d'extrait sont ajoutés successivement 1.25 mL de réactif de Folin- Ciocalteu (10 fois dilué), et 1.0 mL de carbonate de sodium à 7.5 %. L'ensemble est incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Une gamme d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard. La lecture des absorbances a été effectuée à 765 nm par un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en mg équivalents acide gallique par 10g de poids sec (mg EAG/10g PS).

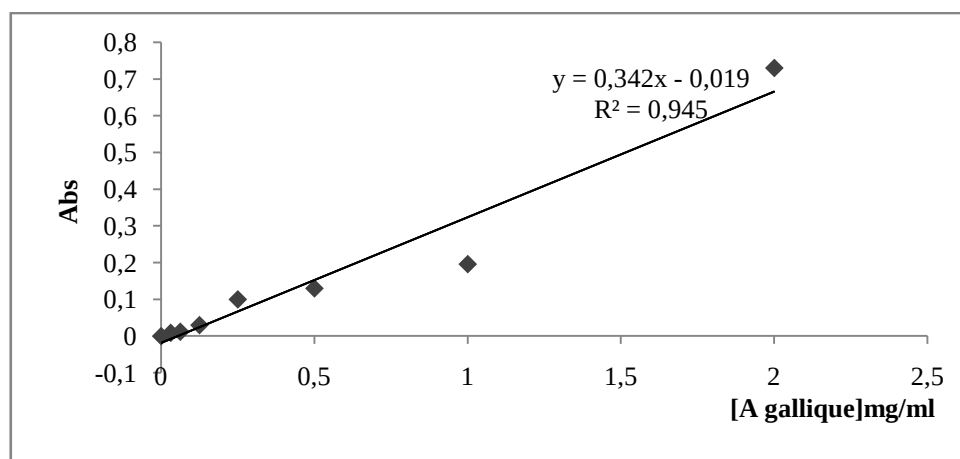


Figure 28: courbe d'étalonnage de l'acide gallique

5.2.3. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe de la méthode

L'évaluation des flavonoïdes a été évaluée selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Zhishen *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2015). Elle repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le pic d'absorption est fixé à la longueur d'onde de 510 nm.

➤ Mode opératoire

Un volume de 125 μL de l'extrait est mélangé avec 75 μL de nitrite de sodium NaNO_2 à 5%. Après 5 minutes, 150 μL d'une solution d' AlCl_3 à 10% et 750 μL de NaOH (1.0 M) sont ajoutées. Le volume final du milieu réactionnel a ajusté à 2.5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 510 nm.

Les taux de flavonoïdes des extraits sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par 10g de poids sec (mg EC/10g PS) à partir de la courbe d'étalonnage réalisée au préalable dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits.

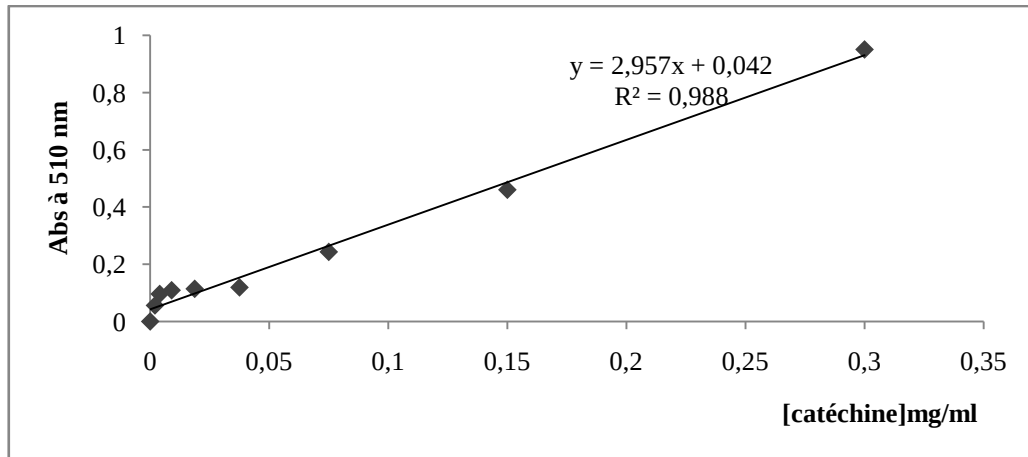


Figure 29: courbe d'étalonnage de catéchine à 510 nm

5.2.4. Dosage des tannins hydrolysables (TH)

➤ Principe de la méthode

L'évaluation des tannins hydrolysables (des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou l'un de ses dérivés) par la méthode de l'iodate de potassium. Elle est basée sur la réaction entre l'iodate de potassium (KIO_3) et les esters de galloyl (**Haslam, 1965; Willis and Allen, 1998; Elfalleh *et al.*, 2012**).

➤ Mode opératoire

Une méthode simple qui consiste, après 15 min d'incubation, en la mesure de l'absorbance à 550 nm de la solution contenant 3.5 mL de l'extrait et 1.5 mL de 2.5% KIO_3 . Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide tannique par 10g de poids sec (mg EAT/10g PS).

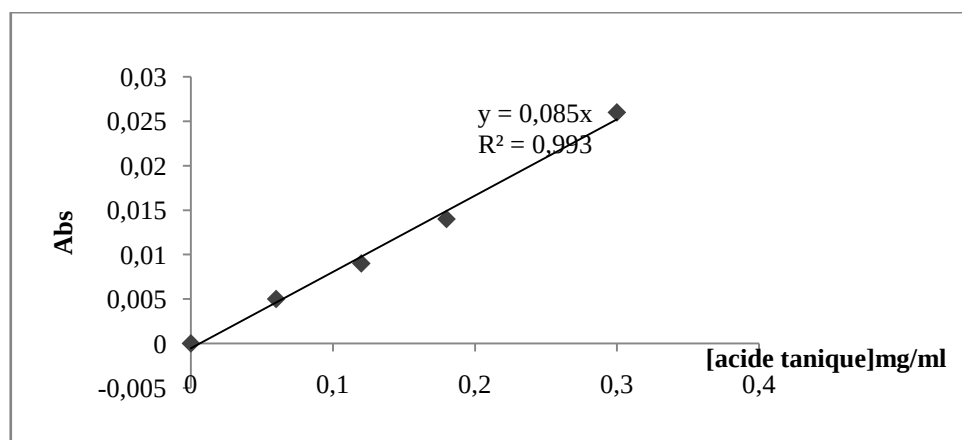


Figure 30: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

5.2.5. Dosage des tanins condensés (TC)

➤ Principe de la méthode

L'évaluation quantitative des tanins condensés (pro-anthocyanidines : dérivés polymériques de flavan-3-ol) est réalisée selon la méthode de la vanilline en milieu acide. Elle consiste à une dépolymérisation de ces molécules en milieu acide suivit d'une formation d'anthocyanidols en présence de vanilline qui absorbe à 500 nm (Scalbert *et al.*, 1989; Hagerman and Butler, 1989).

➤ Mode opératoire

Pour 1.0 mL de chaque extrait ou standard, on ajoute 2.0 mL de la solution vanilline/acide sulfurique (1%). Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 500 nm. La concentration des tanins condensés est exprimée en mg équivalent catéchine par 10g de poids sec (mg EC/10 g PS).

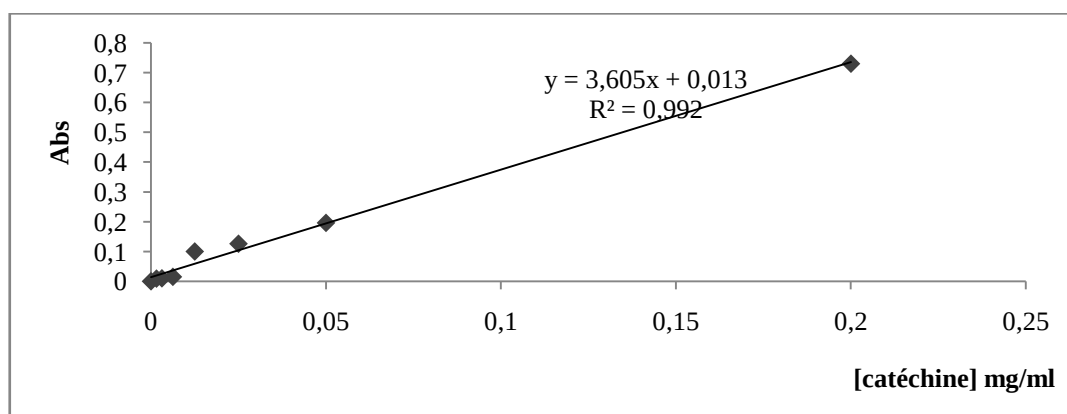


Figure 31 : courbe d'étalonnage de catéchine à 500nm (TC)

5.2.6. HPLC-DAD

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée à l'aide d'un système QTM-HPLC Agilent Technologies série 1200 équipé d'une pompe quaternaire et d'un détecteur automatique de réseau de photodiodes à spectre de balayage (DAD). Les séparations ont été effectuées avec une colonne LiChroCART RP - 18C (250 x 4.6 mm, 5 µm) à 25°C, avec un débit réglé à 1.0 ml min⁻¹. La phase mobile est constituée d'acide formique à 0,5% dans l'eau (A) par rapport au méthanol (B) pour une durée totale de fonctionnement de 70 min et le profil de gradient était le suivant: 95% A et 5% B comme conditions initiales, puis le solvant B est passé à 40% en 30 min, à 65% /15 min, à 95% /10 min, enfin, 95% A et 5% B pendant 10 min.

Les échantillons ont été filtrés avant l'injection et le volume d'injection était de 10 μL . La longueur d'onde de détection UV a été réglée à 280, 320, 370 et 520 nm. L'identification a été réalisée en comparant leurs valeurs de temps de rétention avec celles des étalons.

II. *Evaluation Biologique*

6. Activité antioxydante

6.1. Effet scavenger du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (diphényl picryl hydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par **Brand-William *et al.* (1995)**. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons.

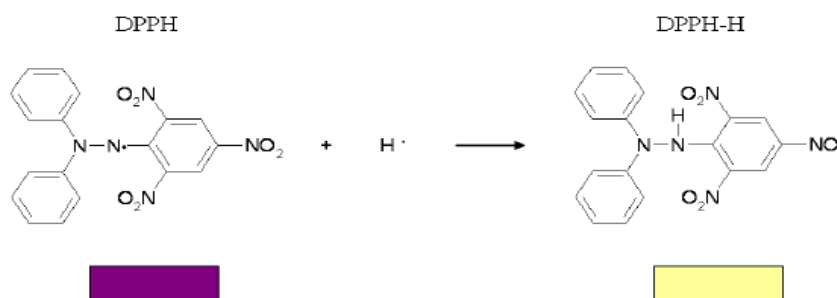


Figure 32: Réduction d'un radical 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. 50 μL des solutions méthanoliques d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1.95 mL de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{I\% d'activité anti-radicalaire} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] \times 100}{1}$$

La concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH• (IC_{50}) est calculée à partir des graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration, puis comparées à celles de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante a également été exprimée en capacité antioxydante équivalente d'acide ascorbique (AEAC) selon la formule suivante (Ndoye Foe *et al.*, 2016; Leong *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007):

$$\text{AEAC} = [\text{IC}_{50} (\text{standard}) / \text{IC}_{50} (\text{extrait})] \cdot 10^5$$

6.2.FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé selon la méthode de Oyaizu (1986) , Do *et al.* (2013). Elle consiste à mesurer la capacité des extraits à réduire le complexe Fe³⁺/ferricyanure de potassium en forme ferreuse. Cette réduction s'accompagne d'un virage de la couleur jaune vers du bleu vert dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'échantillon.

Un volume égal à 1.0 mL de l'échantillon à différentes concentrations a été mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆]. Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. Après l'ajout de 2.5 mL d'acide trichloracétique, le mélange a été centrifugé (13000 g / 10 min). 2.5 mL du surnageant ont été additionnés à 2.5 mL d'eau distillée et de 0.5 mL d'une solution de chlorure ferrique. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes conditions expérimentales. Une augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur.

III. *Evaluation Pharmacologique*

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son éventuelle introduction en thérapeutique. Il faut donc définir le rapport bénéfice risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Ceci ne peut être réalisé que par l'intermédiaire de deux types d'étude, d'une part l'efficacité chez l'animal (pharmacologie expérimentale) et chez l'homme (effets bénéfiques), d'autre part une étude de sécurité chez l'animal (toxicologie) et chez l'homme (effets indésirables) (Dupont, 1987; Claude, 1985; Antonious *et al.*, 2006; Buenz, 2006).

7. Toxicité

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il est nécessaire de réaliser des essais de toxicité selon les Directrices du Journal Officiel des Communautés Européennes (OECD, 2001 ; 2008).

Nous avons sélectionné 03 extraits : l'extrait acétonique de la plante *Teucrium polium* L. (stade végétative) et l'extrait acétonique de l'écorce du fruit *Punica granatum* L., et l'huile essentielle de la plante TP (stade végétative) selon les résultats des analyses qualitatives et quantitatives et les tests biologiques *in vitro*. L'administration des extraits (« polyphénols/ eau distillée » et « HE/ eau distillée avec quelques gouttes du polysorbate 80 ») est réalisée par la voie orale (gavage), à raison de 1.0 mL / 100 g du poids corporel (OECD, 2001, 2008).

7.1. Toxicité aigüe

Une forte dose 2000 mg/kg de l'extrait a été testée sur les rats (05 males / lot) selon les Directrices du Journal Officiel des Communautés Européennes code 423 (OECD, 2001).

Les animaux sont gardés en observation individuellement toutes les 30 minutes pendant 06 heures le premier jour et tous les jours pendant 14 jours, au cours desquels sont notées les variations de poids corporel, les signes de toxicité et le taux de mortalité. Au 15^{ème} jour, les rats sont sacrifiés, des prélèvements de sang ont été faits et ont servis pour différentes analyses biochimiques. Les organes sont examinés macroscopiquement (reins, rate, foie, poumon, cœur), prélevés, et deux seulement ont servis pour l'étude histopathologique (les reins et le foie).



Figure 33 : Dissection du rat et prélèvement du sang

7.2.Toxicité subaigüe

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées des substances actives examinées selon les Directrices du Journal Officiel des Communautés Européennes code 407 (OECD, 2008).

Des rats mâles, *Wistar albinos*, adultes et de poids variant entre 180 g et 200 g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en 14 lots expérimentaux de 05 animaux chacun, à raison d'une dose par lot. Ils ont été gavés quotidiennement durant 28 jours par :

- 50,150, 300 et 600 mg/kg de l'extrait TP (groupe D1, D2, D3 et D4 respectivement) ;
- 50,150, 300 et 600 mg/kg de l'extrait PG (groupe D1, D2, D3 et D4 respectivement) ;
- 50,150, 300 et 600 mg/kg de l'huile essentielle de TP (groupe D1, D2, D3 et D4 respectivement) ;
- 02 lots de témoins (T1 «D0₁» ont reçu le même volume de l'eau distillée, et T2 «D0₂» ont reçu le même volume de l'eau distillée avec quelques gouttes de polysorbate 80).

Au 29ème jour, les rats sont sacrifiés et l'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance pondérale, des examens hématologiques et biochimiques, et examens nécrosiques qui se rapportent aux organes internes, accompagnés des analyses histologiques qui s'y rattachent.

7.3.Suivi de la toxicité

Après dissection, les organes (reins, rate, foie, poumon, cœur) sont observés macroscopiquement *in situ*, prélevés et débarrassés de l'excès de graisse. Après avoir séché ces organes à l'aide de papier filtre, une prise de poids a été réalisée. Des pièces des reins et du foie sont conservés dans une solution de formol à 10% pour des études anatomopathologiques.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à partir de l'aorte abdominale, puis le sang a été recueilli sur les tubes héparines (analyses biochimiques) et sur les tubes EDTA (analyses hématologiques).

7.3.1. Analyses sanguines

Les analyses sanguines ont été réalisées au niveau du laboratoire de Hamidi situé au niveau de la wilaya de Chlef.

a. Paramètres biochimiques

Les tubes héparines sont centrifugés à 1500 tours/min pendant 5 min à 4°C, et dans le sérum obtenu, sont dosées les paramètres biochimiques suivants : TG, Glucose, Urée, Créatinine, les Transaminases (TGO, TGP), la PAL (phosphatase alcaline) et Bilirubine, en utilisant des kits spécifiques (*SPINREACT®*) (Walters *et al.*, 1970 ; Schumann *et al.*, 2002 ; Henry, 1984).

b. Paramètres hématologiques

L'analyse des paramètres hématologiques a été effectuée à l'aide d'un Beckman coulter Medonic : Red Blood Cells ou Globules rouges (RBC), Hématocrite (HCT), Plaquette (PLT), White Blood Cells ou Globules blancs (WBC), et Hémoglobine (HGB).

7.3.2. Etude anatomopathologique

Les échantillons (les reins et le foie) fixés dans du formol 10% sont déposés dans des cassettes en plastique qui sont ensuite placées dans un automate (Leica TP1020). Les échantillons sont d'abord déshydratés par passage dans des bains successifs de 30 min d'éthanol (60°, 70°, 80° et 100°), puis éclaircies dans deux bains de 20 min de toluène (pour éliminer l'alcool), avant d'être coulé dans des moules contenant de la paraffine fondue par chauffage (inclusion dans la paraffine liquide).

Les blocs de paraffinés obtenus sont ensuite coupés par microtome à raison de 5 µm d'épaisseurs, puis les coupes sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'héματοxyline-éosine. Après la coloration, le montage se fait à l'aide de l'eukitt placé entre lame et lamelle. La préparation est séchée à l'air.

8. Activité anti-inflammatoire intestinale

L'inflammation intestinale est induite par l'injection sous-cutanée de 7.5 mg/kg l'indométacine selon la méthode décrite de **Yamada *et al.* (1993)** avec des modifications. Ce modèle expérimental de l'inflammation intestinale a les mêmes aspects pathologiques de la maladie de Crohn (**Anthony *et al.*, 2000 ; Tubaro *et al.*, 2003, Selva *et al.*, 2006 ; Vemu *et al.*, 2015 ; 2016**).

L'administration du traitement se fait par la voie orale (gavage) quotidiennement selon le mode d'administration de la plante en médecine traditionnelle. Le choix des doses des extraits a été basé sur les résultats de l'étude de la toxicité. À la fin de chaque expérimentation, des urines et des fèces sont collectés à l'aide des cages à métabolisme pour être analysés ultérieurement. La consommation alimentaire, le poids corporel et la consistance des selles ont été suivis tout au long de l'expérimentation.

Le protocole expérimental a été mené selon les travaux d'**Elson et al. (1995)**, **Han et al. (2000)**, **Yochiba et al. (2003)**, **Porras et al. (2007)** et **Vemu et al. (2015 ; 2016)** avec quelques modifications (Fig.34).

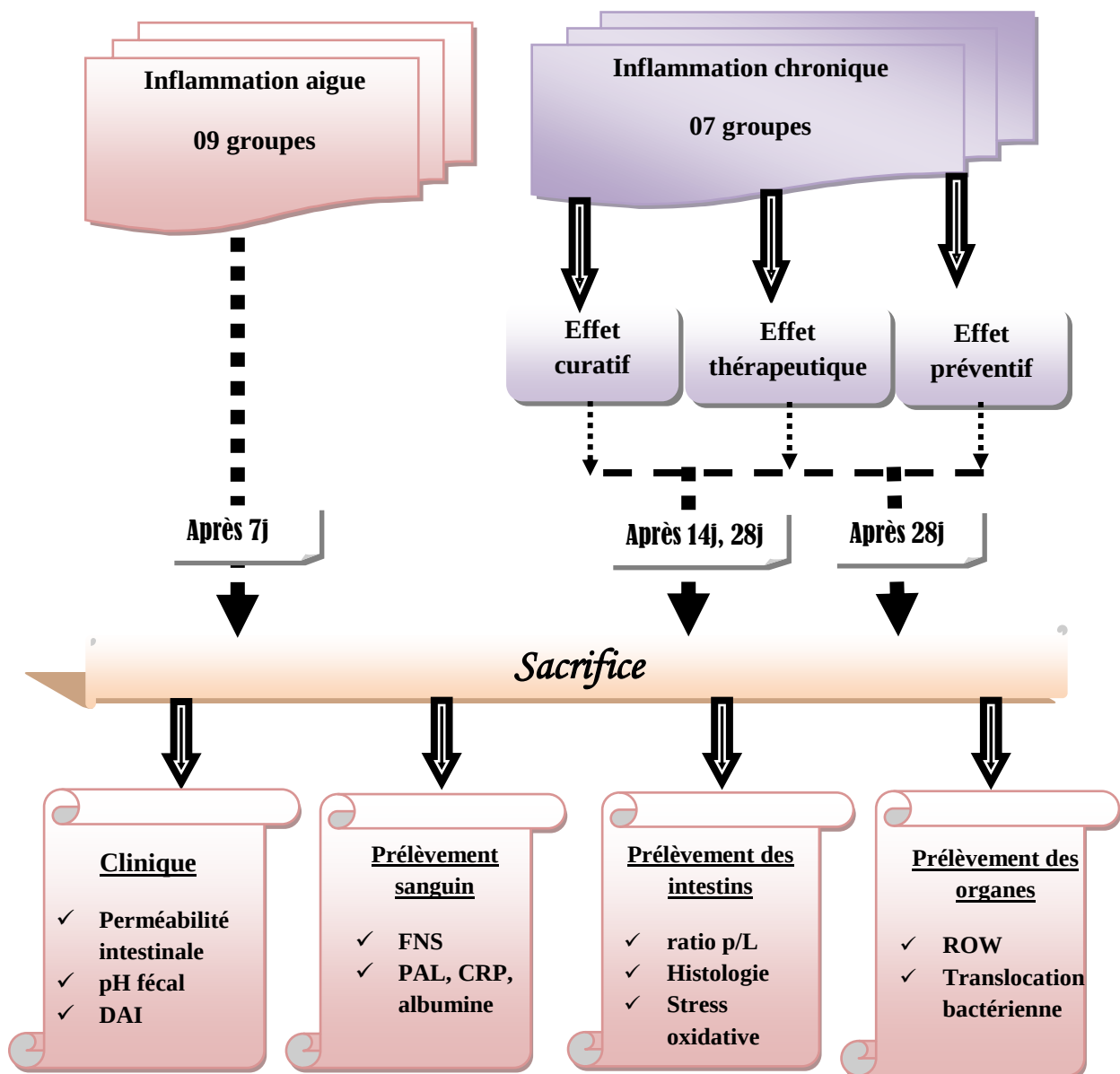


Figure 34 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

8.1. Induction de l'inflammation

Deux types d'inflammation ont été induits (Fig. 34).

8.1.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue a été induite par une injection sous-cutanée 10 mg/kg indométacine (tous les rats excepté les témoins négatifs). Des rats mâles Wistar (250-300 g) ont été répartis en (09) groupes (n = 06 rats par groupe) :

1. Témoin négatif « Témoin sain » : recevant l'eau distillée ;
2. Témoin non traité « groupe-indo » : ne recevant aucune substance;
3. Groupe P: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'extrait de *Punica granatum* (600 mg / kg/ jour) ;
4. Groupe TP: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'extrait de *Teucrium polium* L. (300 mg /kg) ;
5. Groupe FR: nourrit avec des aliments standards complétés avec un mélange de 02 extraits PG-TP (v : v) ;
6. Groupe HE: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. (150 mg/kg) ;
7. Groupe TA : recevant 100 mg/ kg de métronidazole
8. Groupe TB : recevant 02 mg /kg de prednislone ;
9. Groupe TC : recevant 100 mg/kg de sulfasalazine ;

Tous les rats (08 lots, 06 rats/ lot) sont traités après l'injection jusqu'à 7ème jour. Au 8ème jour, les rats ont été sacrifiés.

8.1.2. Inflammation chronique

L'Inflammation intestinale chronique (DC chronique) a été induite par 02 injections sous-cutanées de 7.5 mg/kg/j de l'indométacine (tous les rats excepté les témoins négatifs). Des rats mâles Wistar (250-300 g) ont été répartis en 07 groupes (n = 12 rats par groupe), tous les rats ont été nourries avec une alimentation standard, dans le cas du traitement groupe, cela a été complétée avec de l'extrait (p / p) :

1. Témoin négatif « Témoin sain » : recevant l'eau distillée ;
2. Témoin non traité « groupe-indo » : ne recevant aucune substance;
3. Groupe PG: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'extrait de grenade (600 mg/ kg) ;

4. Groupe TP: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'extrait de *Teucrium polium* L. (300 mg/kg) ;
5. Groupe FR: nourrit avec des aliments standards complétés avec un mélange de 02 extraits PG-TP ;
6. Groupe HE: nourrit avec des aliments standards complétés avec l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. (150 mg/ kg) ;
7. Groupe TT : recevant la substance de référence 100 mg/kg de sulfasalazine.

8.1.2.1.Effet curatif

Les rats (06 lots, 12 rat/lot) ayant subi les différents traitements après installation de la maladie. Au 15ème jour, 06 rats de chaque groupe ont été sacrifiés et le reste a été sacrifié le 29ème jour (dernier jour de l'expérimentation).

8.1.2.2.Effet thérapeutique

Après l'induction de l'inflammation intestinale par 02 injections sous-cutanées 7.5 mg/kg/jour, tous les rats (12 rats/ lot) sont traités après 2^{ème} injection jusqu'à 28ème jour. Au 15ème jour, 06 rats de chaque groupe ont été sacrifiés et le reste a été sacrifié à la fin de l'expérimentation.

8.1.2.3.Effet préventif

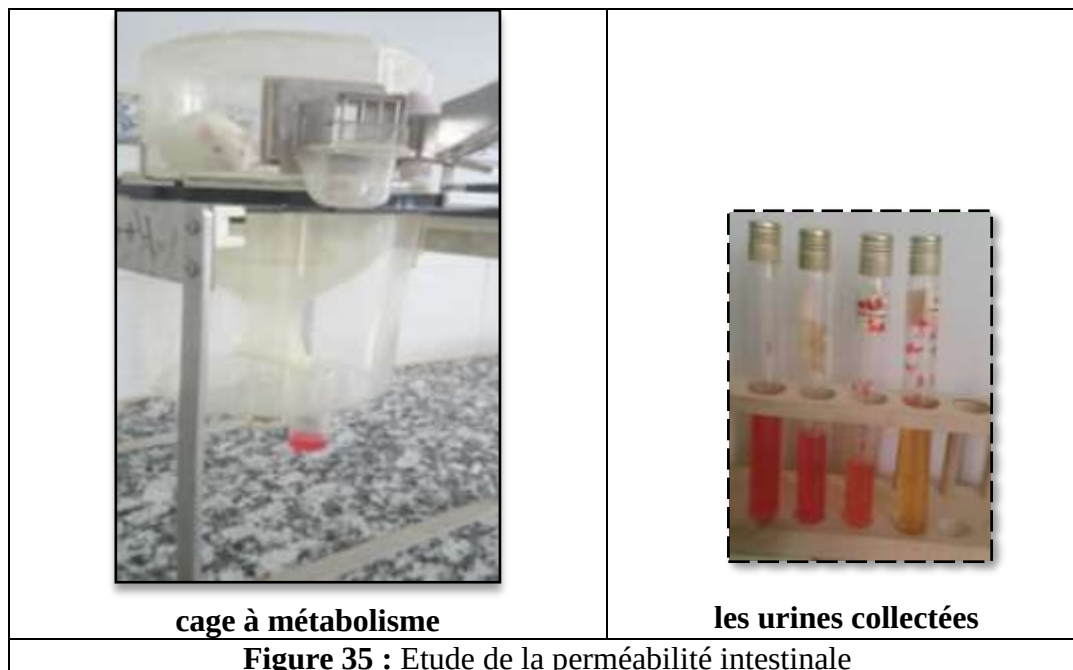
L'inflammation intestinale a été induite (15ème et 16ème jour). Les rats (06 lots, 06 rat/lot) subit les différents traitements 02 semaines avant l'induction de la maladie jusqu'à la fin de l'étude (jusqu'à 29ème jour).

8.2.Perméabilité intestinale

La perméabilité intestinale a un rôle important dans la physiopathologie de certaines maladies dont les maladies inflammatoires de l'intestin (**Putignani et al., 2016 ; Vrakas et al., 2017**).

À la fin chaque expérimentation (24h précédant le sacrifice), les animaux de chaque groupe ont été gavés à raison de 3.0 mL de 0.6% de la phénolsulfonephtaléine (PSP), puis placés individuellement dans des cages à métabolisme en vue d'étudier l'excrétion urinaire (Fig.35). Les urines de 24h ont été recueillies, une fois collectée, l'urine a été complétée à 10 mL avec de l'eau distillée et centrifugée 2500 tr pendant 10 min, puis 1.0 mL de surnageant a été ajouté à 5.0 mL de NaOH (1M). L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 560 nm. Les ratios urinaires de PSP ont été exprimés en pourcentage des quantités administrées.

Pour les groupes de contrôles positifs, PSP a été remplacé par une solution saline (Nakamura *et al.*, 1983 ; Suzuki et Hara, 2010 ; Kume *et al.*, 2014).



8.3. Sacrifices et Prélèvement des échantillons

A l'issue des phases expérimentales, les rats ont été anesthésiés et sacrifiés. Le sang a été prélevé à partir de l'aorte abdominale et récupéré dans des tubes contenant de l'EDTA et héparine.

Les intestins ont été excisés depuis le duodénum jusqu'à rectum et séparé du tissu adipeux adhérent. Des échantillons de l'intestin ont été prélevés et divisé en 02 parties : une partie a été ouverte longitudinalement puis plongée dans un fixateur (10% formaldéhyde) en vue de l'analyse histologique. La partie restante a été ouverte longitudinalement (anti-mésentérique), débarrassée des selles encore présentes et nettoyée avec du tampon PSP à froid puis, la muqueuse a été grattée à l'aide d'une lame de verre stérile à froid dans une zone stérile et divisée en deux parties en vue des dosages microbiologiques (translocation bactérienne) et biochimiques (stress oxydant).

Le poids et la longueur des intestins de chaque rat sont noté (le ratio poids des intestins (g) / longueur des intestins (cm)) (Marin *et al.*, 2013 ; Vemu *et al.*, 2015 ; 2016).

8.4. Evaluation de l'inflammation

8.4.1. Matière fécale

À la fin de chaque expérimentation, des fèces collectées ont été dissous dans l'eau physiologie stérile (0.9%, 1/10: m/v). Le pH fécal a été déterminé à l'aide du pH-mètre, et le sang occulte et invisible dans les fèces a été mis en évidence grâce à le réactif Kastle-Mayer (annexe III) (Arndt *et al.*, 1998 ; Deadman, 1971 ; Sharafi *et al.*, 2017).



Figure 36: Sang occulte détecté dans les fèces

8.4.2. Masse relative des organes (ROW)

Comme étant, l'inflammation intestinale peut provoquer des manifestations extraintestinales (Harbord *et al.*, 2015 ; Olpin *et al.*, 2017 ; Garber *et al.*, 2019). La détermination des poids de quelques organes vitaux demeure donc importante. Les organes (thymus, rate, reins, foie, les intestins) sont observés macroscopiquement *in situ*, prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés. Le poids relatif de chaque organe a été ensuite calculé par rapport au poids corporel :

ROW= poids de l'organe / poids corporel du rat (Abimoslah *et al.*, 2013 ; Vemu *et al.*, 2015 ; 2016).

8.4.3. Score clinique : DAI

La gravité de l'inflammation a été évaluée, en utilisant un indice d'activité de la maladie (**DAI**) varie de 0 (pas de maladie) à 4 (maladie grave), qui notait la perte de poids corporel, la gravité de la diarrhée et la présence de sang dans les selles (Murthy *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2008)

Tableau 6 : l'indice d'activité de la maladie (DAI)

Grade	perte de poids	consistance des selles	sang fécal
0	-	féces normal	-
1	1-5%		
2	5-10%	selles molles	présence (détecté par le test)
3	10-20%		
4	>20%	diarrhée	sang visible

8.4.4. Analyses sanguines

Les tubes héparines sont centrifugés à 1500 tours/min pendant 5min à 4°C, et le sérum obtenu a été conservé au congélateur à -20°C, pour le dosage ultérieur les paramètres biochimiques suivantes : CRP et l'Albumine.

Tandis que le sang recueilli dans les tubes EDTA, sont utilisés pour dosage les paramètres hématologiques à l'aide d'un Beckman coulter Medonic : Red Blood Cells ou Globules rouges (RBC), Hématocrite (HCT), Plaquette (PLT), White Blood Cells ou Globules blancs (WBC), Hémoglobine (HGB).

8.5.Exploration du stress oxydant

8.5.1. Préparation de l'homogénat

Les muqueuses intestinales ont été pesées et homogénéisées dans le tampon phosphate saline (10% : p/v), puis l'homogénat a été divisée en deux portions : une partie a été conservée à -20°C. La 2ème partie a été centrifugée à 12000 g pendant 15 min à 4°C et le surnageant a été conservé à -20°C (Nagarjun *et al.*, 2017).

8.5.2. Peroxydation lipidique

Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde (MDA) avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species). Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec 02 molécules d'acide thiobarbiturique et la formation d'un pigment absorbant à 532 nm (Quantanilha *et al.*, 1982 ; Ohkawa *et al.*, 1979).

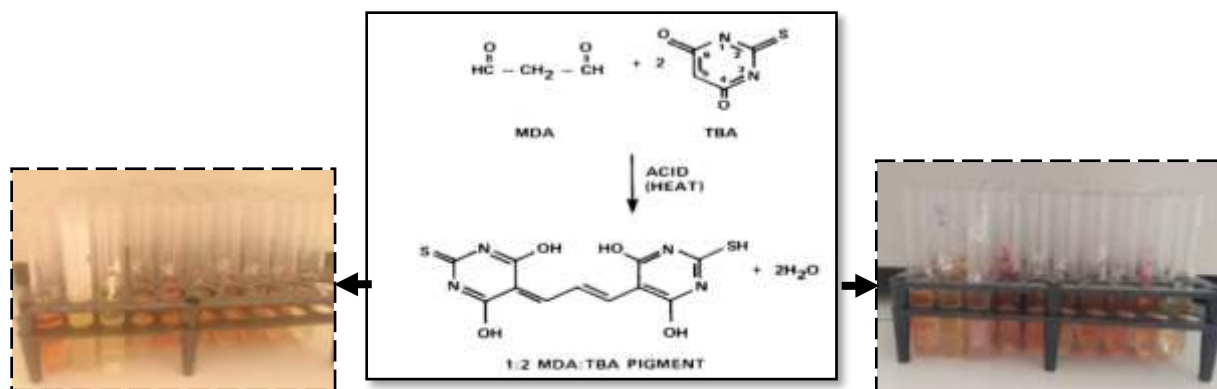


Figure 37: Principe du dosage du malondialdéhyde (Janero, 1990)

À 0.5 mL de l'homogénat, 0.5 ml de l'acide trichloracétique TCA (20%), 0.5 mL sérum physiologie 0.9%, 1.0 mL de l'acide thiobarbiturique (0.67%) sont ajoutés. Le tout est incubé à 100°C pendant 30 min, refroidi dans un bain glacé, puis additionné de 4.0 mL de n-butanol. Après centrifugation de 10 min à 1000 g, l'absorbance de la phase organique (supérieur) est déterminée à 532 nm. La concentration de TBARS a été exprimée en nM de MDA par mg de l'intestin, en utilisant le coefficient d'extinction ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tsikas, 2017).

8.5.3. Catalase

L'activité de la CAT est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Un volume de 50 μL de l'homogénat est mélangé avec 2.95 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 19 mM (préparée dans une solution tampon phosphate à 0.1 M, pH =7.4). La lecture de l'absorbance se fait à 240 nm pendant 3.0 min et le changement de l'absorbance par minute a été utilisé pour calculer l'activité de la CAT. Une unité (U) est la quantité d'enzyme qui décompose 1.0 mole de H_2O_2 par minute à 25°C et pH 7.0 (Claiborne *et al.*, 1985 ; Vemu *et al.*, 2016 ; Djidel *et al.*, 2018).

L'activité enzymatique a été exprimée en termes d'unité internationale par mg de l'homogénat selon la formule suivante :

$$\text{UI/mg} = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) / \text{mg de l'échantillon.}$$

A1 : Absorbance à t0, **A2** : Absorbance à t1, **T** : Intervalle de temps en minute.

8.5.4. Superoxyde dismutase (SOD)

L'évaluation de la SOD est réalisée par la méthode du pyrogallol. Le principe de ce dosage est basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l' $O_2^{\cdot -}$ (produit une couleur jaune) et dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ par la SOD. L'autoxydation de pyrogallol (1, 2,3, trihydroxybenzène) se fait dans des milieux alcalins qui est caractérisée par la transformation du pyrogallol avec l'oxygène en semiquinone et l'anion superoxyde.

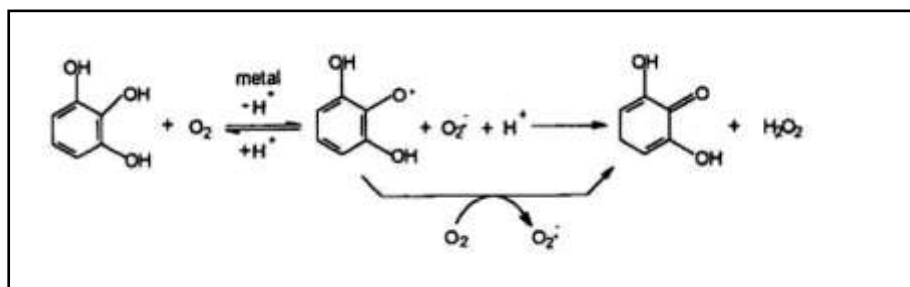


Figure 38: Quelques étapes de l'autoxydation du pyrogallol (Kim *et al.*, 1994).

Un mélange est constitué de 2 mL d'une solution Tris-HCl (0.1 M, pH 8.2), 1.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de l'homogénat et 0.5 mL de pyrogallol (2 mM pyrogallol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4). La lecture se fait à 420 nm contre un contrôle préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'échantillon avec l'eau distillée. Une unité SOD est définie comme étant la quantité nécessaire à inhibition de 50% de l'auto-oxydation de pyrogallol et l'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par mg de tissu (UI/mg) (Marklund & Marklund, 1974; Vemu *et al.*, 2016; Moghaddam Dorafshani *et al.*, 2018).

8.6. Evaluation de la translocation bactérienne

La translocation bactérienne (TB) depuis le tube digestif est définie comme étant le passage de bactéries viables de la flore gastro-intestinale à travers la *lamina propria* vers les ganglions lymphatiques mésentériques locaux et, de là, vers le foie, la rate et d'autres organes (Tir Touil Meddah *et al.*, 2001 ; Plantefève et Bleichner, 2001).

Deux voies de transport vers l'organisme sont possibles : **la voie lymphatique** avec le canal thoracique ou **la voie sanguine portale**. La voie lymphatique semble la plus importante comme le suggère la plus grande fréquence des cultures positives dans les ganglions mésentériques par rapport au **sang portal** et la présence habituelle des bactéries dans les lymphatiques sous-muqueux (Wang *et al.*, 1994; Plantefève et Bleichner, 2001).

8.7. Analyse microbiologie

Pour chaque lot, les échantillons (organes broyés/ muqueuses intestinales) sont introduit dans une solution Ranger stérile. Le mélange est homogénéisé. Ensuite, les dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) seront préparées à partir de cette solution mère, et les cultures bactériennes ont été réalisées dans les milieux sélectifs suivants: Schaedler agar (les anaérobies), MacConkey agar (les entérobactéries), MRS agar (Lactobacilus), Colombia agar (les aérobies), OGA agar (les levures) (**Tir Touil Meddah et al., 2001 ; Porras et al., 2004 ; Ringon-Zimmer et al., 2008 ; Silva et al., 2008; Terán-Ventura et al., 2014**).

Pour une meilleure interprétation mathématique, les résultats sont exprimés en log unités formant colonie (UFC) par gramme. Selon la formule suivante :

$$\text{Log UFC/g d'échantillon} = \text{Log} \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Dilution X volume ensemené}} \text{ (Béraud, 2001)}$$

8.8. Identification

L'identification des souches a été faite en 03 étapes :

- Analyse des caractères macroscopiques et microscopiques ;
- Analyse des caractères biochimiques : oxydase, catalase, API 20E (Biomérieux®, France)
- Confirmation de certaines souches par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS.

8.8.1. identification biochimique

Les galeries utilisées sont: l'Api 20 E pour l'identification des entérobactéries. À partir d'une culture pure de 18 à 24 h, on prépare une suspension bactérienne ayant une concentration de 0,5 Mc Farland;

- ✓ On dépose soigneusement quelques gouttes de la suspension dans chaque cupule à l'aide d'une seringue stérile puis, on ajoute de l'huile de vaseline dans les cupules là où les noms des tests sont soulignés ;
- ✓ On incube les galeries pendant 24 heures à 37°C.

Les résultats obtenus (changement de couleur spontané ou par l'addition des réactifs spécifiques) ont été marqués sur la fiche de lecture puis insérés dans un logiciel informatique « Api Web ».

8.8.2. MALDI-TOF-SM

➤ Principe

L'échantillon biologique est d'abord mélangé à une matrice dont la nature acide favorise l'ionisation des composés. Le choix de la matrice dépend du type de molécule que l'on souhaite mettre en évidence (peptides, protéines, hydrates de carbone) (**Desoubaux et al., 2010 ; Bizzini and Greub, 2010**) (fig.39).

Le complexe (échantillon-matrice) est bombardé par un faisceau laser (60 Hz) émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation). Les ions formés sont alors accélérés dans un champ électrique et dirigés vers un analyseur (le tube de vol, long de 1.0 m) séparant les ions selon leur temps de vol (TOF= Time-Of-Flight). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z (où m = masse et z = charge), les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé (**Sauget et al., 2016 ; 2017**).

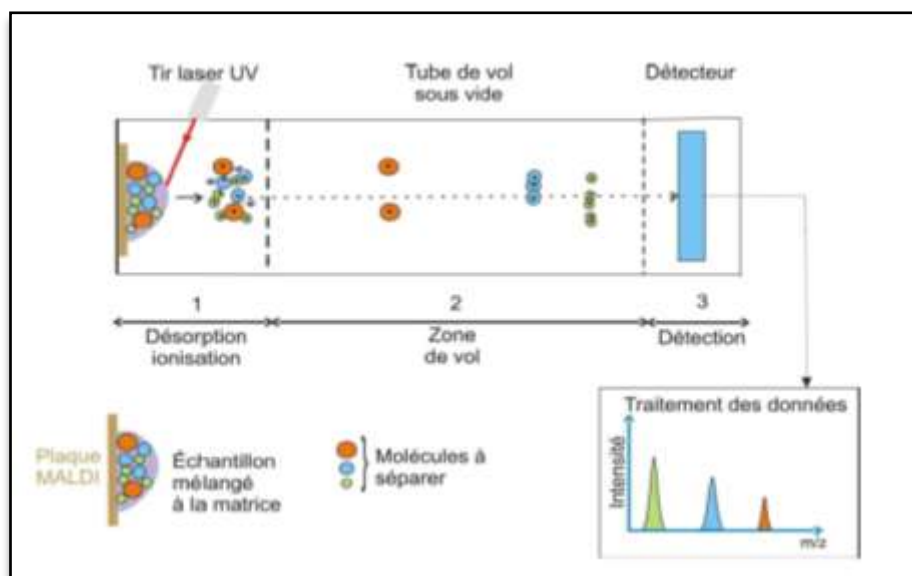


Figure 39 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Sauget, 2016)

✓ Méthode

Une colonie (culture jeune de 18-24h) mélangée avec 1.0 μL de l'acide formique 80% est déposée sur une cible MALDI et recouverte de 1.0 μL de matrice α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). Après séchage, les cibles MALDI sont ensuite chargées dans le spectromètre Microflex LT MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik) et l'analyse est programmée.

Les logiciels (FlexControl, MALDI Biotyper RTC) associés permettent le traitement informatique, comparant les spectres obtenus à ceux référencés dans des bases de données (Fig.40).

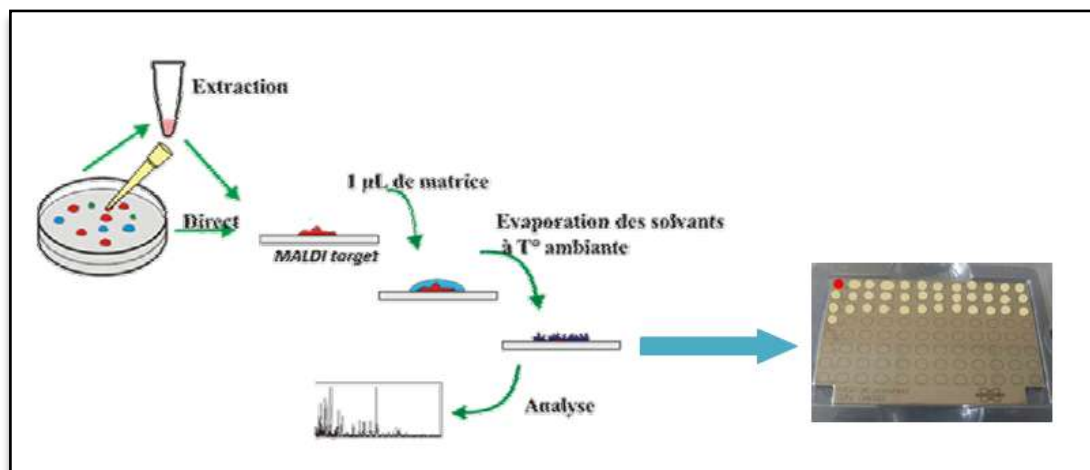


Figure 40: Préparation et dépôt des échantillons sur une cible MALDI-TOF (Sauget, 2016)

8.9. Etude Histopathologie

L'histologie a été réalisée sur des segments de l'intestin retiré de quatre rats de chaque groupe. Les intestins sont fixés dans du formol à 10% pendant 24h, déshydratés dans 04 bains successifs de 30 min d'éthanol (60°, 70°, 80° et 100°), puis placés dans deux bains successifs de toluène à 20 min. Les intestins ont été traités en paraffine fondue par chauffage. Des coupes en série de paraffine (5 µm) ont ensuite été préparées et colorées à l'hématoxyline-éosine pour l'examen morphologique.

9. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type SD. Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par l'ANOVA univariée suivie du test de SPSS pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Résultats & discussion

Partie I : Etude phytochimique

1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante *T. polium* (S1 et S2) et le fruit *P. granatum* (variété F et B) sont regroupés dans le tableau 7. Dans lequel on remarque la présence de flavonoïdes, de tannins, d'alcaloïde, et des anthocyanes. Par contre, les saponines, stérols et terpènes ont été minimales ou négatifs dans les échantillons de *P. granatum*.

Tableau 7 : Résultats du screening phytochimique

	F1E	F1G	F2E	F2G	B1E	B1G	B2E	B2G	TP-S1	TP-S2
coumarine	-	++	-	±	±	+++	-	±	+	+
Saponiside	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Alcaloïde	-	-	+++	++	±	+++	±	-	±	±
Flavonoïde	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
Tanins	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Anthocyane	±	-	++	+++	±	-	+++	+++	++	++
Stérols et terpènes	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce, 1 : avant la maturation, 2 : après la maturation (+++): Réaction franchement positive, (++) : réaction moyennement positive, (+): réaction faiblement positive, (-): absence

Des travaux similaires ont montré que le criblage phytochimique des extraits méthanoliques de *P. granatum* (écorce/feuilles) a révélé la présence de tannins, de flavonoïdes, et l'absence de stéroïdes, de saponines, des alcaloïdes et des terpénoïdes (**Ali et al., 2017 ; Pottathil et al, 2020**).

2. Extraction des HEs

2.1.Rendement & Analyse physico-chimique des HE

À l'issue des distillations, l'HE obtenue à partir de la partie arienne de *Teucrium polium* L. (feuilles et tige) récoltée dans les 02 stades de développement (végétatif, floraison) est de couleur jaune clair avec une très forte et persistante odeur. Les paramètres physico-chimiques de l'HE de *Teucrium polium* L. sont consignés dans le tableau 7. Ces résultats obtenus sont d'ailleurs en concordance avec ceux d'**Hassan et al. (1979)**.

En général, il en ressort que l'huile est de haute qualité, a un indice de réfraction compris entre 1.495, un indice d'acide inférieur à 2, un indice d'ester plus élevé et une densité plus élevée (**AFNOR, 2005**).

L'indice d'acide faible indique que les HE sont stables (hydrolyse des esters durant leur conservation). Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (Tab.8).

Selon **kanko et al (2004)**, le faible indice de réfraction de l'HE indique la faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques. Ces constantes sont influencées par les conditions climatiques (notion chémotype) ainsi que les pratiques culturelles (**Demarne, 1985 ; Gilly, 1997 ; Lis-Balchin, 2002 ; Boukhatem et al., 2010**).

Selon les données climatiques de la région de Mascara durant la période 2006-2015 qui sont obtenus d'après l'office national de météorologie (ONM), le stade végétatif a coïncidé avec la période hivernale tandis que le stade de floraison a coïncidé avec la période estivale. D'après la classification de Köppen-Geiger (<http://koeppen-geiger.vu-wien.ac.at/>), la région de Mascara a un climat méditerranéen chaud avec un été sec (Csa : climat méditerranéen).

Tableau 8 : Rendement et Analyses physico-chimiques des HEs de *Teucrium polium* L.

		S1	S2
R%		0.82±0.027	0.56±0.023
indices chimiques	pH	7.5	7.9
	indice d'acide	1.56	4.83
	indice d'ester	17.98	19.43
indices physique	DO à 20°C	0.28	0.37
	indice de refraction	1.427	1.427

S1 : stade végétatif, S2 : stade de floraison

Dans la présente étude, un changement significatif ($p < 0.01$) dans le rendement a été observé au cours des différents stades phénologiques (Tableau 7) avec la dominance du stade végétatif (0.82%) suivi du stade de floraison (0.56%). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Lianopoulou et al. (2014)** qui ont constaté que les feuilles récoltées dans la période hivernale ont un rendement en huile essentielle plus élevé (0,68%) par rapport aux feuilles de *T. polium* récoltées dans la période estivale (0,37%), collectées dans le nord de la Grèce. En effet, **Daghbouche et al. (2018)** ont trouvé que le stade végétatif a dominé de manière significative les stades de floraison et de fructification.

Ces variations sont le résultat de différents facteurs intervenant lors le développement de la plante notamment l'origine géographique et les facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique...).

Cela peut être dû également à la présence de plusieurs poils glandulaires peltés dans les feuilles de TP collectées dans la période hivernale. Ils sont considérés comme le site principal de la biosynthèse des huiles essentielles, et des autres substances naturelles (**Kelsey et al., 1984 ; McCaskill et al., 1992**). Cependant, **Lianopoulou et al. (2014)** ont montré que les feuilles de TP présentent des séries morphologiques et anatomiques entièrement différente en hiver et en été. Ce qui explique la production importante des HEs en période hivernale comme une stratégie de défense contre le froid.

Dans le cas des basses températures (la période hivernale), les cellules ont un taux élevé de photosynthèse et par conséquent, elles produisent des antioxydants pour combattre le stress oxydatif due au froid (**Imahori et al., 2008; Bafeel & Ibrahim, 2008; Monroy & Dhindsa, 1995; Padma & Picha, 2008; Lianopoulou et al., 2014**).

En effet, le changement en rendement des HEs de *T. polium* L. durant les stades phénologiques s'explique par l'adaptation de la plante aux variations climatiques.

2.2.Composition chimiques des HEs

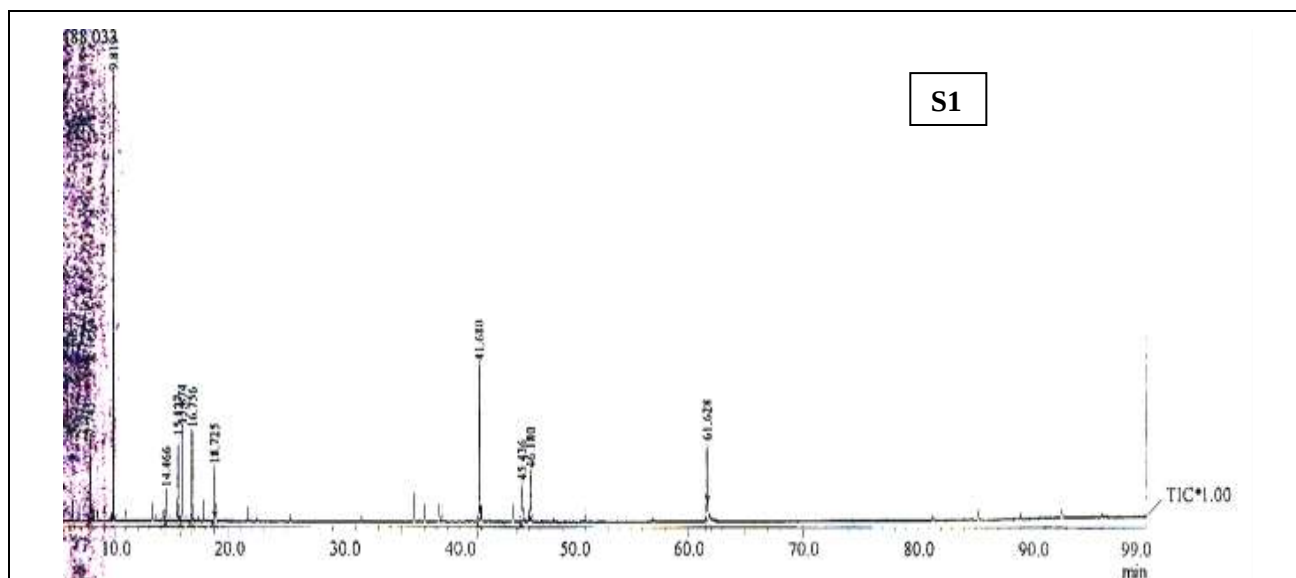
L'analyse des HEs de *T. polium* L. de la région de Mascara, récoltée dans les 02 stades végétatif et de floraison par GC-MS a permis d'identifier différents constituants avec une dominance de limonène (29.87% - 26.39% respectivement) (Tab.9).

Les HEs permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et à assurer leur défense contre les agents pathogènes (**Rehman et al., 2015**).

Dans la présente étude, les huiles essentielles de *T. polium* L. collectée dans la région de Mascara présentent un polymorphisme chimique très important, les composés majoritaires sont: limonène (29.87%), spathulenol (17.24%), camphor (8.20%), pinocarvone (7.76%), tau-cadinol (5.41% / 7.88%), oxyde de pinène (4.78%) et α -terpinéol (4.6%) pour la période végétative. Alors que, limonène (26.39%), spathulenol (13.29%), pinocarvone (5.60%), β -myrcènes (4.02%), tau-cadinol (3.67%), et α - phellandrène (3.45%) sont les principaux constituants pour la période de floraison (Fig.41).

Tableau 9: Composition chimique de l'HE de *Teucrium polium* L. récoltée dans S1 et S2

Components	Temps de retention (min)	S1	S2
α -phellandréne	6,23	-	3,45
β -Myrcènes	7,74	-	4,02
Oxyde de pinène	7,74	4,78	-
Limonène	9,81	29,87	26,39
Unknown 1	10,94	-	2,23
Unknown 2	11,46	-	2,14
Unknown 3	14,46	2,56	-
Unknown 4	15,45	-	2,86
Unknown 5	15,52	7,47	-
1-Adamantanemethylamine	15,53	-	9,85
Camphor	15,87	8,20	-
Pinocarvone	16,76	7,76	5,60
Unknown 6	18,54	-	2,09
α -terpinéol	18,72	4,60	-
Unknown 7	18,73	-	6,69
Spathulenol	41,68	17,24	13,29
Tau-cadinol	45,43	4,22	-
Tau-cadinol	46,18	5,41	3,67
Unknown 8	61,62	7,88	-
Unknown 9	61,66	-	13,27
Unknown 10	61,73	-	2,46
Unknown 11	92,57	-	2,00
Total identified (%)		87,45%	100%



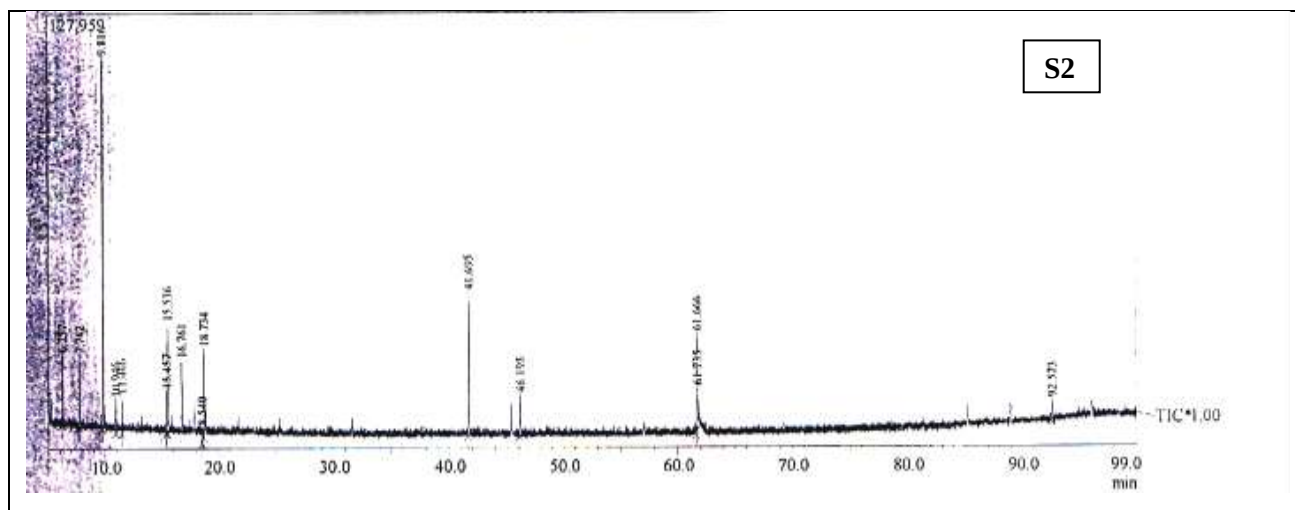


Figure 41: Chromatogramme de l'HE de TP (s1/s2)
S1 : stade végétatif, S2 : stade de floraison

L'huile essentielle issue de la partie aérienne de TP étudiée dans ce travail, peut être considérée comme un chémotype à limonène et spathulenol.

Selon des études antérieures, il existe plusieurs chimiotypes pour *T. polium* en fonction de l'origine géographique et la période de récolte : Les plantes de Tlemcen (Ouest d'Algérie) sont caractérisées par le chémotype germacrène D, bicyclogermacrène, β -pinène (**Belmekki et al., 2013 ; Djabou et al., 2012**). Les plantes de Sétif (Est de l'Algérie) (**Lograda et al., 2014**), de Tunisie (**Bakari et al., 2015**) sont regroupées en même chémotype caractérisé par α -pinène, β -pinène, germacrène-D, Myrcènes, limonène. Tandis que, TP collectées dans Ain Melilla (Est de l'Algérie) contient le chémotype de α -cadinol (46.8%), 3 β hydroxy- α -muurolène (22.5%), α -pinène (9.5%) and β -pinène (8.3%) (**Kabouche et al., 2007**). Dans le sud algérien (Tamanrasset), le chémotype de dl-Limonène, δ -cadinène et trans β -caryophyllène a été identifié (**Hammoudi et al., 2013**).

La plante de Turquie (Aydın) est caractérisée par un chémotype de germacrène D, carvacrol, β -pinène, α -copaène et spathulenol (**Kurtoğlu & Tin, 2017**).

Cozzani et al. (2005) ont identifié le chémotype de α -pinène, β -pinène et *p*-cymène pour la partie aérienne de *T. polium* de la France (Corse).

Ainsi cette variation qualitative et quantitative de la composition chimique des huiles essentielles de *T. polium* dépend du fond génétique (**Djabou et al., 2012**), de la partie de la plante utilisée (**Sabzeghabaie & Asgarpanah, 2015 ; Mahmoudi & Nosratpour, 2013 ; Raei et al., 2014 ; Mohammadian et al., 2012 ; Eikani et al., 1999 ; Khani & Heydarian, 2014**), la nature de sol (**Hammoudi et al., 2013**), les variations climatiques, le cycle végétatif et la durée d'ensoleillement.

3. Extraction des polyphénols

La teneur phénolique des extraits dépend du type de tissu et des solvants utilisés pour l'extraction. Les solvants polaire permette d'obtenir une concentration importante en principes actifs (Fougère & Wynn, 2007 ; Stanković *et al.*, 2012).

3.1. Rendement d'extraction

3.1.1. *Punica granatum* L.

Les résultats obtenus montrent un rendement plus élevé dans le cas de l'extraction réalisée par l'acétone pour l'écorce et les graines du cultivar F « Maadam » récolté dans le stade S1 à savoir 53.6%, 29.68%, respectivement. Pour le stade S2, l'acétone (l'écorce) et le méthanol (les graines) ont enregistrés les rendements plus élevés par rapport aux autres solvants avec des pourcentages respectifs de 53.76% et de 42.96% (Fig.42).

Tandis que pour le cultivar B « Sefri », le rendement le plus élevé a été obtenu par le méthanol dans le stade S1 soit pour l'écorce ou les graines à savoir 55.36%, 50.96%, respectivement. En effet, dans le stade S2, les extraits acétoniques de l'écorce enregistrent de forts rendements par rapport aux autres solvants avec 50.84%. Alors que le méthanol représente le rendement le plus élevé pour les graines (55.76%) (Fig.42).

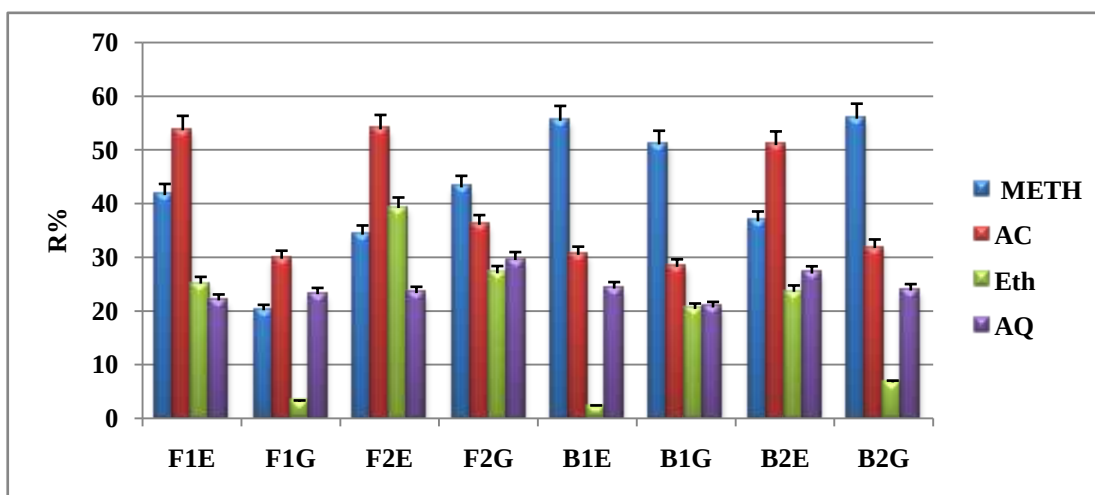


Figure 42 : Rendements d'extraction de 02 variétés de *Punica granatum* L.

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce, 1 : avant la maturation 2 : après la maturation

D'après nos résultats, l'acétone et le méthanol sont les meilleurs solvants pour extraire les polyphénols de grenade (les graines et les écorces). En effet, le rendement d'extraction des polyphénols de grenade *Punica granatum* L. varie selon le solvant, la partie utilisée (graines, écorce), le cultivar et le stade de récolte (Tab.10).

Tableau 10 : Rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs

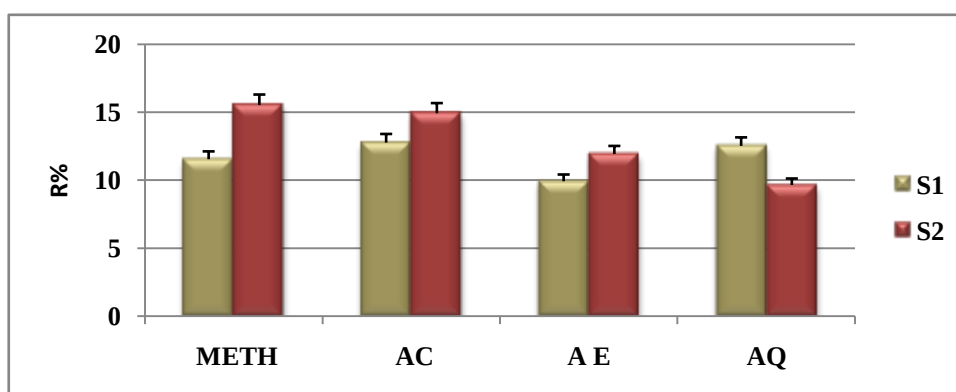
Auteur	Solvant	R
Okonogi <i>et al.</i> (2007)	éthanol 95%	6.21%
Sultana <i>et al.</i> (2008)	méthanol 80%	29.9%
Iqbal <i>et al.</i> (2008)	méthanol	29%
	acétone	27%
	éthanol	21%

Singh *et al.* (2002) et Iqbal *et al.* (2008) ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement par rapport aux autres solvants (l'éthanol, l'acétone, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'eau).

3.1.2. *Teucrium polium* L.

Le rendement d'extraction de polyphénols de la plante étudiée *Teucrium polium* L. varie selon le solvant et le stade de récolte. En effet, le meilleur rendement a été obtenu dans le stade végétatif par l'acétone et l'eau avec 12.76%, 12.52%, respectivement (Fig.43).

Tandis que, le méthanol et l'acétone ont enregistré les meilleurs rendements dans le stade de floraison S2 à savoir 15.52% et 14.92%, respectivement (Fig. 43).

**Figure 43** : Rendements d'extraction de la plante *Teucrium polium* L.

METH : méthanol, AC : acétone, AE : acétate d'éthyle, AQ : aqueux, S1 : stade végétatif, s2 : stade de floraison

3.2. Analyse quantitative des polyphénols : Dosage colorimétrique & HPLC-DAD

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes peuvent servir comme indicateurs importants de la capacité antioxydante et être utilisés comme une sélection préliminaire pour n'importe quel produit quand il est destiné comme source naturelle des antioxydants dans les aliments fonctionnels (Viuda-Martos *et al.*, 2011).

3.2.1. *Punica granatum* L.

Les figures 44, 45, 46 et 47 présentent le taux des composés phénoliques, des flavonoïdes totaux, des tannins contenus dans les différents extraits de l'écorce et de graines de *Punica granatum* L. (cv-F et cv-B).

Ces résultats nous indiquent que l'écorce de grenade est majoritairement constituée de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins hydrolysables, tandis que les tanins condensés sont relativement faibles. En effet, l'écorce est riche en polyphénols par rapport aux graines.

Seeram et al. (2005) ont trouvé que l'écorce de grenade est riche en ellagitannins (tannins hydrolysables). **Tehranifar et al. (2011)** ont trouvé 423.5 mg EAG /g de polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique de la peau de grenade (fruit mûr).

D'après nos résultats, les contenus phénoliques extraits par le méthanol, diminuaient pendant la maturation du fruit, atteignant « 357.09 - 255.84 cv -F / 290.57 - 208.33 cv-B » et « 657.52 - 332.23 cv-F / cv-B 975.51- 667.763 mg EAG /10 g PS» dans les graines et l'écorce, respectivement.

En effet, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés de l'extrait méthanolique diminuaient ainsi pendant la maturation du fruit pour les 02 cultivars (cv-F et cv-B) (Fig.45).

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par **Al-Maiman & Ahmad (2002)**, **Kulkarni & Aradhya (2005)**, **Mirdehghan & Rahemi (2007)**, **Weerakkody et al. (2010)**, **Zarei et al. (2011)**, **Fawole & Opara (2013b)** et **Fernandes et al. (2015)**. En revanche, le taux de polyphénols varie aussi selon le génotype (**Zaouay et al., 2012; Legua et al., 2012; Zarei et al., 2011**).

Cependant, les investigations précédentes ont évalué les composés phénoliques de la grenade durant leurs stades de développement en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Quant à notre travail, on a utilisé des différents solvants polaires (méthanol, acétone, éthanol et eau distillée).

En effet, l'étude des variations du contenu phénolique extrait par différents solvants durant la maturation de fruit, n'a pas été rapportée auparavant.

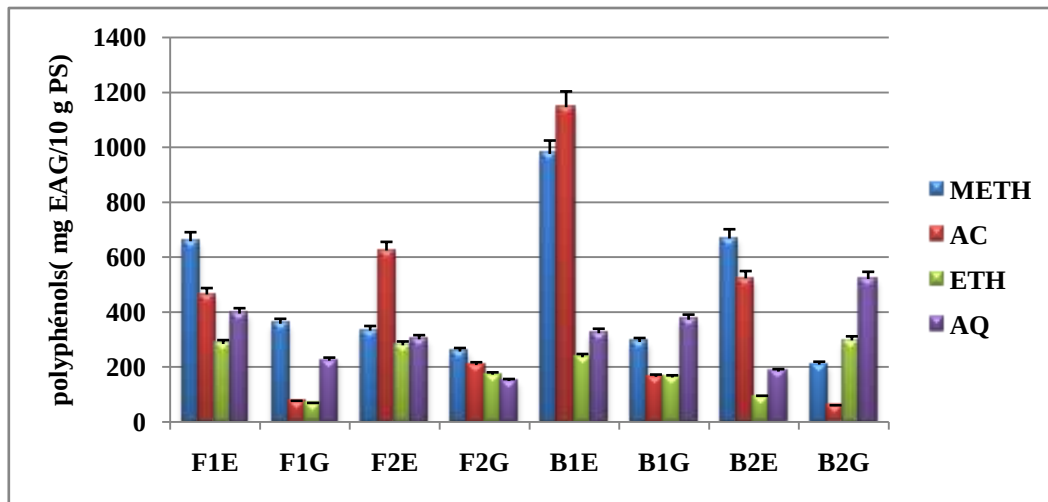


Figure 44 : Taux des polyphénols de différents extraits de *P. granatum*

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce, 1 : avant la maturation 2 : après la maturation

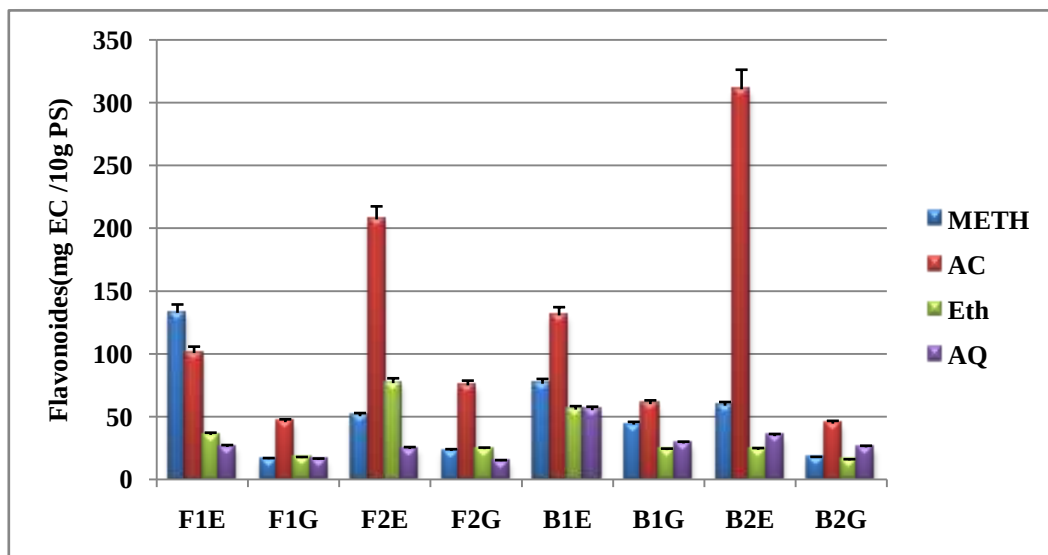


Figure 45 : Taux de flavonoïdes de différents extraits de *P. granatum*

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce

En revanche, les flavonoïdes de l'extrait acétonique augmentent pendant la maturation du fruit dans les écorces passant de 100.6 à 206.96, 130.52 à 310.59 mg EC/ 10g PS dans les variétés F et B respectivement.

Fawole & Opara (2013a) ont constaté que le contenu phénolique total et les gallotannins variaient entre les deux saisons de récolte du "Bhagwa" et du "Ruby" cultivés en Afrique du Sud. Cependant, la teneur totale en anthocyanes et en flavonoïdes n'était pas affectée par la saison de croissance dans les deux cultivars.

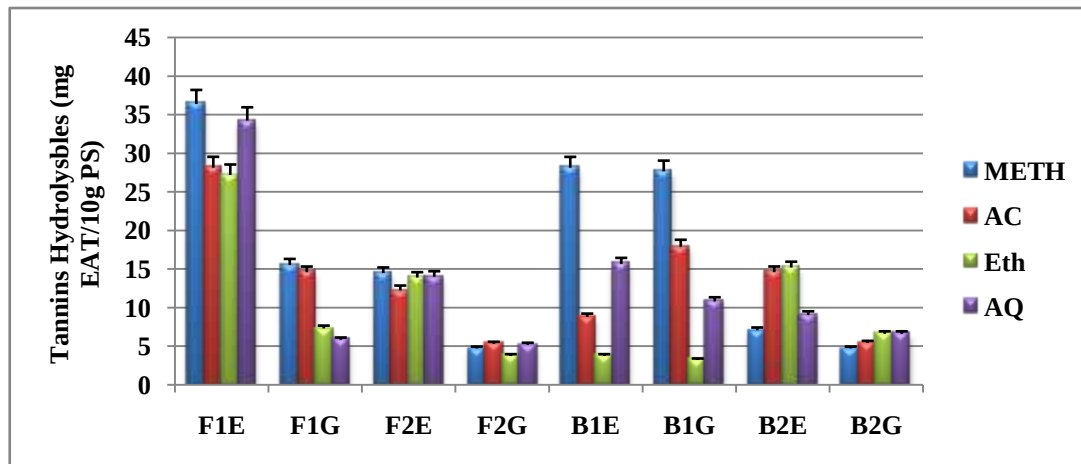


Figure 46 : Taux des tannins hydrolysables de *P. granatum*

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce, 1 : avant la maturation 2 : après la maturation

Pour les **tannins hydrolysables**, l'extrait méthanolique de l'écorce de variété **F** récoltée dans le stade **S1**, s'est révélé le plus riche (36.37 mg EAT/ 10 g PS) alors que les tannins condensés de l'extrait acétonique de graines diminuent durant la maturation de fruit passant de 16.28 à 9.68 mg EC/10g PS. Cependant, l'extrait acétonique de l'écorce de même variété récoltée dans le stade **S2** possédait des teneurs élevées en **tannins condensés** (17.58 mg EC/ 10g PS).

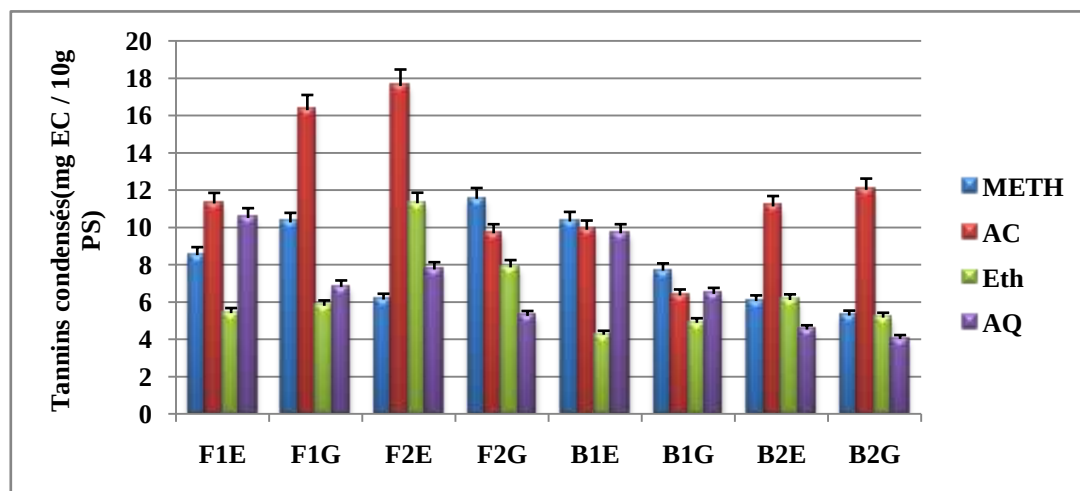


Figure 47 : Taux des tannins condensés de *P. granatum* (variété B et F)

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce

Nos résultats montrent aussi que les tannins hydrolysables des extraits acétoniques et éthanolique de l'écorce de variété **B** augmentent pendant la maturation du fruit, tandis que les tannins condensés des extraits acétoniques augmentent dans les graines et l'écorce durant la maturation du fruit.

Weerakkody et al. (2010) ont signalé une baisse du contenu phénolique total de la grenade australienne cv-Wonderful de 1706 à 117 mg pendant le développement du fruit. Selon **Fawole & Opara (2013b)** le taux de polyphénols totaux, des flavonoïdes et des gallotannins ont diminué de manière significative, passant respectivement de 1051.60 à 483.31 mg GAE/100 ml, de 752.18 à 397.27 mg CAE/100 ml et de 64.80 à 29.07 mg GAE/100 ml, pendant la maturation de la grenade Ruby. Ils ont également constaté une diminution d'environ 55% des composés phénoliques totaux pendant la maturation de la grenade Ruby.

Fawole & Opara (2013c) indiquent une diminution de 73% des composés phénoliques totaux pendant le développement et la maturation de la grenade Bhagwa.

La diminution du contenu phénolique total a été attribuée à l'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase qui caractérise leurs stades de maturité (**Amiot et al., 1995 ; Kulkarni & Aradhya, 2005 ; Fawole & Opara, 2013c**).

Des résultats similaires ont également été rapportés pour la banane, la poire, la fraise, la goyave et d'autres cultivars de grenade (**Goldstein & Swain, 1963 ; Du et al., 1975 ; Amiot et al., 1995 ; Wang & Lin, 2000 ; Bashir & Abu-Goukh, 2003 ; Al-Maiman & Ahmad, 2003 ; Zarei et al., 2011**).

Cette diminution pourrait être due aussi à l'arrêt de la nouvelle biosynthèse des polyphénols pendant la maturation des fruits (un effet de dilution lorsque les fruits augmentent en taille), ainsi que la contribution des composés phénoliques à la biosynthèse du cycle flavylum des anthocyanes (**Kulkarni & Aradhya, 2005 ; Fawole & Opara 2013b**).

Une diminution des composés phénoliques pendant la maturation est souhaitable pour la grenade car elle réduit le goût astringent, alors qu'une concentration trop importante de flavonoïdes, comme celle mesurée au stade S1 (fruit non mûr), donne au jus de grenade un goût désagréable et astringent. En revanche, la perte d'astringence est l'un des changements souhaitables qui surviennent lors de la maturation de nombreux cultivars de grenadiers (**Al-Maiman & Ahmad, 2002 ; Kulkarni & Aradhya, 2005 ; Al-Said et al., 2009 ; Zarei et al., 2011 ; Fawole & Opara, 2013b ; Fawole & Opara, 2013a ; Fawole & Opara, 2013d**).

En effet, les facteurs liés à l'altitude peuvent avoir un effet important sur la voie de biosynthèse des substances phénoliques (**Mphahlele et al., 2014a ; Mphahlele et al., 2014b**).

Mditshwa et al. (2013) ont observé que la concentration phénolique plus élevée de la grenade récoltée à l'altitude plus basse.

D'après **Liang et al. (2006)** et **Germ et al. (2009)**, un rayonnement solaire élevé accompagné d'une haute altitude ayant un impact sur les profils des métabolites secondaires.

Mphahlele et al. (2014a) ont trouvé que les fruits récoltés (au stade mûr) à une basse altitude (222 m) avec un climat méditerranéen présentaient un taux phénolique plus élevé que ceux récoltés à haute altitudes (662 et 898 m). Alors que les flavonoïdes, la teneur la plus élevée ($P < 0.001$) a été enregistrée pour les fruits (S2) récoltés à haute et basse altitude, à l'exception de l'altitude moyenne.

Pour les tannins totaux dans les 02 stades, les fruits récoltés à basse altitude se sont révélés les plus riches que ceux récoltés à haute altitudes (662 et 898 m).

Le tableau 10, montre clairement la richesse de 02 variétés de *P. granatum* étudiées (F et B) en flavonoïdes (catéchine, l'épicatéchine, le kaempférol glucoside, le kaempférol, la quercétine, le myricétine, les procyanidines « tannins condensés », l'épigalocatéchine gallate). Ces résultats confirment donc l'analyse colorimétrique où les flavonoïdes occupent 33.17 – 59.41% de la totalité des composés phénoliques (les extraits acétoniques) dans les cultivars F et B respectivement. Les acides phénoliques sont représentés par l'acide gallique, l'acide vanillique et l'acide caféique (Tableau 11, annexe 4).

Mphahlele et al. (2014a) ont trouvé la richesse de grenade de Wonderful en flavonoïdes, dont la catéchine, l'épicatéchine, la taxifoline, la rutine, l'ériodictyol 7-O- β -glucoside, le kaempférol-3-D-glucoside, la naringine et l'hespéridine. Ils ont constaté que les fruits récoltés au stade mur et provenant d'une altitude basse (222 m) avaient des concentrations en épicatéchine, rutine et kaempférol 3- β -D-glucoside significativement plus élevées ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, respectivement) par rapport à ceux récoltés à hautes endroits (898 et 662 m).

Des études réalisées par **Vinson et al. (2005)** et **Al-Farsi et al. (2005)** indiquent que la température élevée et une forte exposition à la lumière du soleil augmentaient la biosynthèse des composants phénoliques. En outre, la maturation des fruits dépend de la température (**Hurd & Graves, 1985 ; Mphahlele et al., 2014a**).

Tableau 11 : Identification des composés phénolique de 02 variétés (B, F) de *Punica granatum L.* par HPLC-DAD

Extrait	à 280		à 370	
B2E-Ac	Unknow1	42.7%	Unknow	91.88%
	Unknow2	38.67%	Myricétine	2.59%
	Acide gallique	1.20%		
	Catéchine	0.12%		
	Epigallocatechine gallate	0.29%		
B2E-Meth	Acide gallique	0.73%	Unknow1	26.38%
	Procyanidine B1	2.17%	Unknow2	28.65%
	Catéchine hydrate	7.91%	Resvératrol	0.27%
	Epigallocatechine	3.67%	Quercétine	2.65%
	Procyanidine B2	2.31%	Myricétine	13.91%
	Acide vanillique	2.32%	Kaempférol glucoside	0.16%
	Acide caféique	1.65%	Kaempférol	0.032%
	Epigallocatechine gallate	5.77%		
F2E-Ac	Unknow	89.68%	Unknow1	34.76%
	Acide gallique	1.33%	Unknow2	28.65%
			Unknow3	18.22%
			Myricétine	18.45%
F2E-Meth	Unknow1	7.38%	Unknow1	23.94%
	Unknow2	5.33%	Unknow2	21.09%
	Acide gallique	1.07%	Quercétine	0.17%
	Procyanidine B1	2.49%	Myricétine	17.10%
	Epigallocatechine	4.09%	Kaempférol glucoside	0.13%
	Procyanidine B2	2.30%	Kaempférol	0.03%
	Acide vanillique	2.56%		
	Acide caféique	1.48%		
	Epigallocatechine gallate	5.65%		
	Épicatéchine gallate	4.02%		

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, E : écorce, 2 : après la maturation, Ac : acétone, Meth : méthanol

3.2.2. *Teucrium polium L.*

Les figures 47, 48,49 et 50 regroupent les résultats de la quantification des composés phénoliques de la plante *T. polium L.*

Il est évident que la teneur en polyphénols dans la plante *Teucrium polium L.* étudiée varie d'un extrait à un autre. Cependant le stade végétatif S1 s'est relevé le plus riche en composés phénoliques. En effet, l'extrait méthanolique a enregistré le taux le plus élevé en polyphénols (448.46 mg EAG/10 g PS) .Pour les flavonoïdes, l'extrait acétonique est le plus riche avec 80.15 mg EC/ 10 g PS.

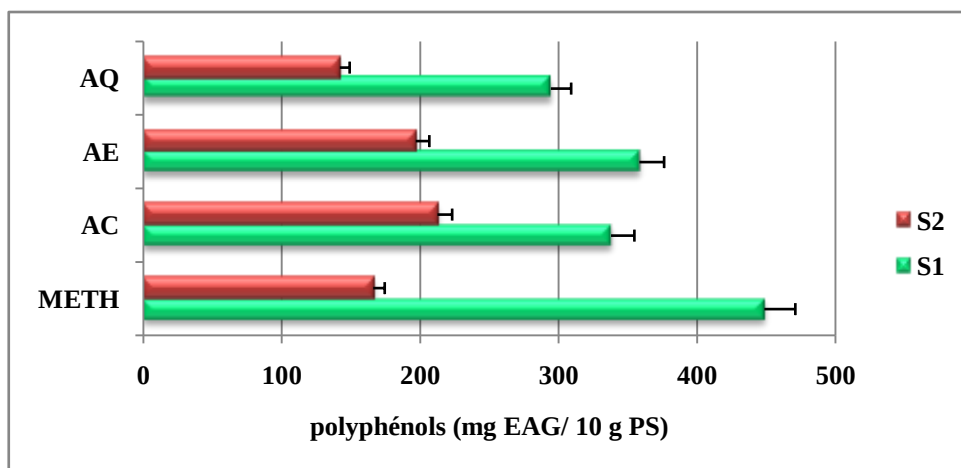


Figure 48 : Taux de polyphénols de *T. polium*

METH : méthanol, AC : acétone, AE : acétate d'éthyle, AQ : aqueux, s1 : stade végétatif, s2 : stade de floraison

Une étude menée par **Stanković *et al.* (2012)** montre que l'extrait méthanolique avait un contenu en phénols totaux et flavonoïdes totaux plus élevé suivis par l'extrait acétonique et l'extrait d'acétate d'éthyle de *T. polium* récoltée au stade de floraison dans Serbia et Montenegro (IRAN).

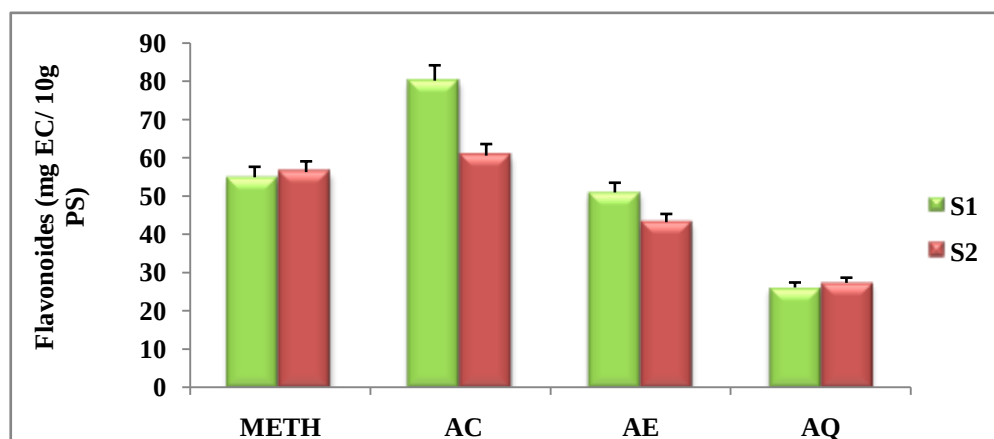


Figure 49 : Taux de flavonoïdes de *T. polium*

METH : méthanol, AC : acétone, AE : acétate d'éthyle, AQ : aqueux

Pour les tannins hydrolysables, l'extrait méthanolique et aqueux du stade végétatif ont enregistré les taux les plus élevés (24.11 mg EAT/10 g poids sec et 22.82 mg EAT/10 g PS). Alors que les tannins condensés augmentaient dans le stade de floraison S2, avec un taux le plus élevé enregistré par l'acétate d'éthyle « 24.6 mg EC /10g PS ».

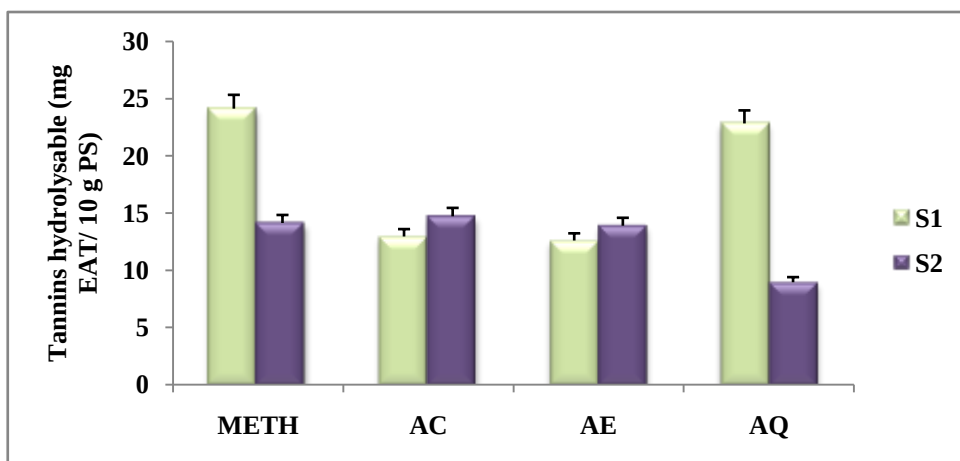


Figure 50 : Taux de TH de *T. polium*

METH : méthanol, AC : acétone, AE : acétate d'éthyle, AQ : aqueux

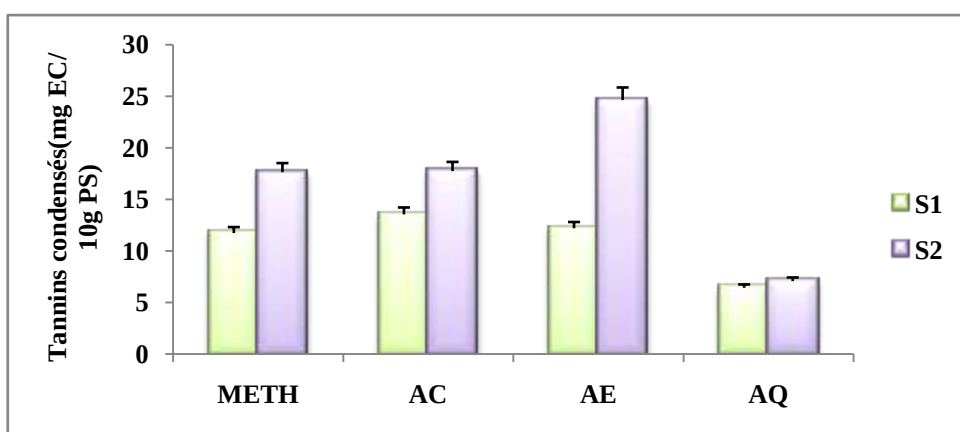


Figure 51 : Taux de tannins condensés de *T. polium*

METH : méthanol, AC : acétone, AE : acétate d'éthyle, AQ : aqueux

Généralement, les plantes possèdent un système complexe de voies métaboliques qui est responsable de la survie de la plante (**Schmidt et al., 2005**). Les métabolites primaires comprennent donc les activités principales, puis les métabolites secondaires pour assurer la survie de la plante (**Prinsloo & Nogemane, 2018**).

Ces métabolites secondaires et donc leurs bio-activités peuvent être affectés par plusieurs facteurs tel que les changements climatiques (**Lemos et al., 2015 ; Prinsloo & Nogemane, 2018**), la région, la saison et la période de récolte, ainsi que la partie de la plante.

Parmi ces métabolites secondaires, les polyphénols qui sont considérés comme des agents antioxydants et chimio-préventifs intéressants, ils ont ainsi un rôle écologique dans l'adaptation de la plante aux changements environnementaux (**Baser, 2002 ; Edreva et al., 2008 ; Piccolella et al., 2018**).

En effet, les stress abiotiques entraînent l'augmentation de production d'antioxydants par les plantes (**Lianopoulou & Bosabalidis, 2014 ; Khan et al., 2015 ; Saema et al., 2016**), ce qui augmente également leur importance médicinale et nutritionnelle (**Khan et al., 2015 ; Nourimand et al., 2012, Gupta et al., 2019**).

D'après plusieurs auteurs, les plantes qui poussent dans des atmosphères froides possèdent certaines caractéristiques particulières, comme des poils glandulaires et non glandulaires denses, un mésophile compact avec un parenchyme en palissade développé, de nombreuses stomates et fibres sclérenchymatiques, et une forte teneur en composés phénoliques dans l'épiderme et les cellules mésophiles (**Fahn & Cutler 1992 ; Lianopoulou et al., 2014; Gupta et al., 2019**).

Selon **Lianopoulou et al. (2014)** la présence de composés phénoliques dans les cellules épidermiques et mésophiles des feuilles hivernales est interprétée comme étant liée à la protection contre les basses températures (des stratégies de défense) et non contre le rayonnement UV-B, comme cela a été signalé pour les feuilles estivales.

En effet, la plante étudiée *Teucrium polium* L. semble être affectée par le stress de refroidissement hivernal plutôt que par le stress de sécheresse estivale (**Lianopoulou et al., 2014**).

Les basses températures activent le stress oxydatif auquel les cellules végétales doivent s'en débarrasser en produisant des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques, en particulier les composés phénoliques (**Kirakosyan et al., 2003 ; Imahori et al., 2008 ; Ruelland et al., 2009 ; Sevilano et al., 2009 ; Lianopoulou & Bosabalidis, 2014 ; Lianopoulou et al., 2014 ; Gupta et al., 2019**).

En outre, les feuilles hivernales de la plante *Teucrium polium* L. ont plus de stomates et de poils glandulaires, et leurs chloroplastes sont plus grands et plus nombreux, avec des grains d'amidon volumineux, elles ont aussi des paramètres d'échanges gazeux plus élevés (photosynthèse, transpiration, etc.). De plus, les cellules épidermiques et mésophiles des feuilles hivernales contiennent dans leurs vacuoles des polyphénols et des cristaux d'oxalate de calcium (**Lianopoulou et al., 2014**).

L'augmentation du taux de photosynthèse des feuilles hivernales est étroitement liée à la teneur élevée en chlorophylle et le nombre élevé en cellules de parenchyme (**Lianopoulou et al., 2014**).

Ceci entraîne la production de quantités importantes de substances carboniques issues de photosynthèse qui sont utilisés dans la biosynthèse de métabolites secondaires nécessaires à la protection contre le stress dû au froid tel que les composés phénoliques, les huiles essentielles, la cutine, la cellulose, l'oxalate de calcium, etc. (Monroy & Dhindsa, 1995; Padda & Picha, 2008 ; Lianopoulou *et al.*, 2014).

Des flavonoïdes individuels, dont l'épicatéchine gallate, le kaempférol glucoside, le kaempférol, la quercétine, les procyanidines, l'épigalocatéchine, et l'épigalocatéchine gallate, ont été identifiés dans l'extrait acétonique de *T. polium* collectée dans le stade S1. Ces résultats ont été confirmés en amont par l'analyse colorimétrique. L'analyse a révélé également la présence de l'acide caféique et de resvératrol (stilbènes). Alors que l'extrait acétonique de S2 a relevé la présence de Kaempférol glucoside, de kaempférol, de la quercétine et de resvératrol (Tableau 12, annexe 4).

Tableau 12 : Identification de composés phénoliques de *T. polium* par HPLC-DAD

Extrait	à 280	à 370
S1- Ac	Unknow1	69.68%
	Procyanidine B1	0.16%
	Épigalocatéchine	0.10%
	Procyanidine B2	0.17%
	Acide caféique	0.12%
	Epigalocatéchine gallate	0.45%
	Epicatéchine gallate	0.53%
S2- Ac	Unknow	89.62%
	Unknow	22.85%
	Resvératrol	10.24%
	Quercétine glucoside	11.07%
	Kaempférol glucoside	5.33%
	Kaempférol	17.16%

s1 : stade végétatif, s2 : stade de floraison, AC : acétone

D'après Petti & Scully (2009), les composés polyphénoliques les plus importants dans les plantes sont les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Selon la littérature, Proestos *et al.* (2006) ont trouvé de l'acide caféique, de l'acide férulique et de la lutéoline. D'autre part, Mitreski *et al.* (2014) n'ont pas détecté d'acide caféique et n'ont trouvé que de la lutéoline et de l'apigénine dans l'extrait sec de *T. polium*.

Milošević-Djordjević *et al.* (2018) ont trouvé des acides phénoliques (gallique, vanillique, caféique, chlorogénique, p-coumarique) et des flavonoïdes (catéchine, rutine, myricétine, lutéoline, quercétine et apigénine) dans les extraits de *T. polium*.

Partie II: Evaluation Biologique

4. Activité antioxydante

4.1. Huile essentielle

Les résultats obtenus prouvent que la variation de la composition chimique des huiles essentielles de TP durant les stades de développement est en relation avec leurs activités biologiques.

D'après nos résultats, le stade hivernal a donné des IC_{50} de 3.904 ± 0.048 mg/ml et représente l'extrait le plus actif dans l'élimination des radicaux libres par rapport à l'huile essentielle de TP récoltée dans le stade estival qui est de $IC_{50} = 16.139 \pm 0.152$ mg/ml (Fig.52). Néanmoins, ils sont moins actifs par rapport à l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0.0044 \pm 0.0002$ mg/ml) avec des capacités antioxydantes 112.681 et 27.262 mg équivalente d'acide ascorbique (AEAC), s1 et s2 respectivement. En effet, **Hammoudi et al (2013)** ont trouvé par la méthode de DPPH une activité antioxydante de 79.02 ± 0.00 mg d'équivalente d'acide ascorbique (AEAC) / g de l'HE. **Mahmoudi & Nosratpour (2013)** ont constaté que l'huile essentielle de *T. polium* L. (collectée au stade de floraison) de l'ouest de l'Iran (Kerman) a donné une activité anti-radicalaire $IC_{50} = 9200 \mu\text{g} / \text{ml}$, et majoritairement constituée de : spathulénol (15.06%), β -pinène (11.02%), β -myrcène (10.05%), germacrène B (10.11%), germacrène D (8.15%), bicyclogermacrène (8.25%) et le linalool (4.02%).

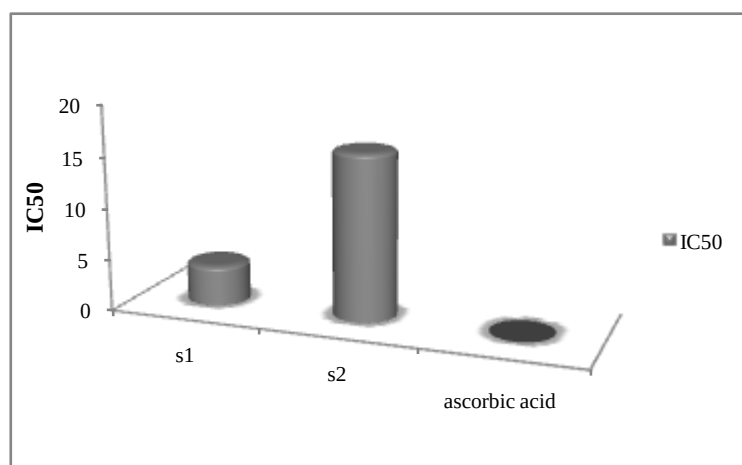


Figure 52 : IC_{50} de l'HE de *Teucrium polium* (S1 et S2)
S1 : stade végétatif, S2 : stade de floraison

Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (Lu & Foo, 2001; Sing *et al.*, 2006; Tepe *et al.*, 2007). En effet, Zengin & Baysal (2014) ont testé certains composés individuellement et ils ont montré que l'activité antioxydante de l' α -terpinéol était plus forte que celle du linalool et de l'eucalyptol.

Ainsi, dans la présente étude, l'activité antioxydante des HES de *Teucrium polium* peut être attribué à la concentration élevée de composants majoritaires, à la variation de la composition chimique, à la présence / absence des monoterpènes oxygénés, des monoterpènes hydrocarbonés et des sesquiterpènes.

De Lima *et al.* (2014) ont constaté que 45 composants avec la prédominance de monoterpènes, tels que le camphre (51.81%), 1,8 cinéole (20.13%) et le limonène (11.23%) dans l'huile essentielle *Ocimum kilimandscharicum* a donné IC₅₀ de 8.31 μ g / ml par rapport au camphre pur (IC₅₀ = 12.56 μ g / ml) et au mélange de limonène avec 1,8 cinéole (IC₅₀ = 23.25 μ g / ml).

Cependant, certains travaux ont montré que les monoterpènes oxygénés (linalool, carvacrol, α -terpinéol...) étaient principalement responsables du potentiel antioxydant des huiles végétales (Maestri *et al.* 2006; Miguel, 2010; Bicas *et al.*, 2011; Barbieri *et al.*, 2015), suivi par les monoterpènes hydrocarbonés (Wei & Shibamoto, 2007; Lemos *et al.*, 2016). Alors que les sesquiterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés oxygénés ont une très faible activité antioxydante (Ruberto & Baratta, 2000).

4.2. Polyphenols

4.2.1. *Punica granatum* L.

On a trouvé que l'activité antioxydante déterminée par le DPPH est diminuée dans l'extrait méthanolique durant les stades de maturation (annexe 5) avec un IC₅₀=0.13 mg/ml à 1.34 mg/ml (B1E et B2E respectivement), et 0.44 mg/ml à 1.76 mg/ml (F1E et F2E respectivement), du à la diminution des polyphénols. Alors qu'elle est augmenté dans l'extrait acétonique avec un IC₅₀=0.078 mg/ml à 0.064 mg/ml (B1E et B2E respectivement), et 0.11 mg/ml à 0.092 mg/ml (F1E et F2E respectivement) (Fig.53), cette activité est interprétée par la concentration accrue de flavonoïdes et de tanins condensés dans les extraits acétoniques.

Les flavonoïdes et autres substances phénoliques sont considérés comme ayant une fonction de protection contre la lumière en raison de leur puissant pouvoir d'absorption de la lumière (Liakoura *et al.*, 2001 ; Hashiba *et al.*, 2006). Ces composés atténuent également les effets des radicaux libres (Spitaler *et al.*, 2006). Hagerman *et al* (1998) ont démontré que les capacités antioxydantes des tanins condensés et hydrolysables à supprimer les radicaux peroxy sont plus élevées que les celles des phénols simples.

Dragovic-uzelac *et al.* (2007) ont montré que les niveaux d'antioxydants varient considérablement selon les stades de maturité des fruits et les cultivars. Ils ont constaté que les fruits non mûrs présentent les niveaux de biomolécules les plus élevés, qui diminuent au stade de semi-maturité et restent relativement inchangés et stables jusqu'à la période de la récolte.

Par conséquent, l'extrait de l'écorce de grenade semble avoir plus de potentiel en tant que complément de santé riche en antioxydants naturels.

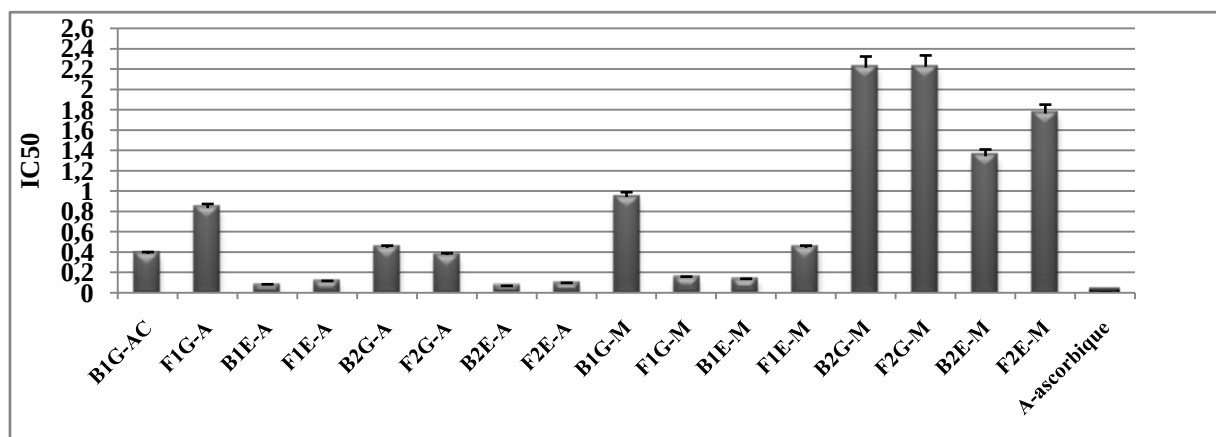
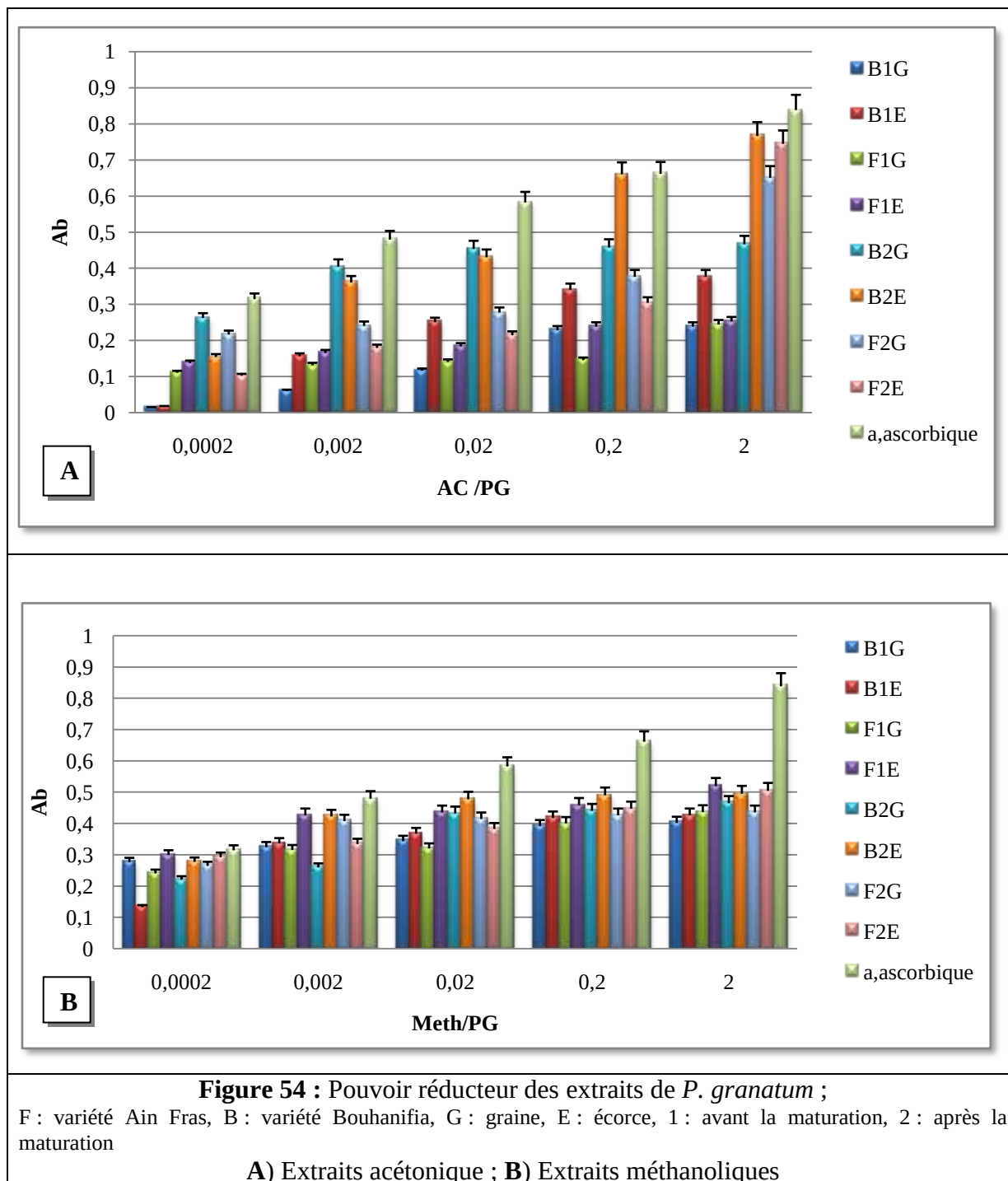


Figure 53 : IC50 des différents extraits de 02 variétés de *P. granatum*

F : variété Ain Fras, B : variété Bouhanifia, G : graine, E : écorce, 1 : avant la maturation, 2 : après la maturation, A : acétonique ; M : méthanolique

Li *et al.* (2006) ont rapporté que l'extrait de l'écorce de grenade avait une capacité antioxydante nettement plus élevée que l'extrait de pulpe en ce qui concerne la capacité de piégeage ou de prévention contre l'anion superoxydase, les radicaux hydroxyle et proxyle. Ils ont montré que la teneur totale en phénols, flavonoïdes et proanthocyanidines était également plus élevée dans l'extrait de l'écorce que dans l'extrait de pulpe. La grande quantité de composés phénoliques contenue dans l'extrait de l'écorce peut être à l'origine de sa forte capacité antioxydante. De plus, l'écorce de grenade présentait une activité antioxydante plus élevée que les graines (Singh *et al.*, 2002).

L'activité réductrice de différents extraits de *P. granatum* L. est présentée dans la figure 54. Elle a augmenté de manière significative quelle que soit la variété (l'altitude).



Par conséquent, l'activité antioxydante des extraits de *P. granatum* récoltés dans le stade S2 mesurée par le test FRAP, peut être attribuée à la concentration accrue d'anthocyanine ou de la vitamine C. Le taux de ces substances est augmenté durant la maturation du fruit.

Cependant la température, l'intensité lumineuse et l'état de maturité des fruits ou la combinaison de ces trois éléments pourraient influencer la biosynthèse des anthocyanes dans le cultivar de grenade étudié. La vitamine C joue un rôle important dans les tissus végétaux en raison de leur importante activité antioxydante (Kulkarni & Aradhya, 2005 ; Gomez & Lajolo, 2008).

4.2.2. *T. polium* L.

Les deux extraits révèlent des propriétés anti-radicalaires intéressantes notamment l'extrait acétonique de stade végétatif S1, qui se manifeste par la faible valeur d'IC₅₀ (0.08 mg/ml). Les IC₅₀ des extraits analysés sont indiquées dans la figure n° 55.

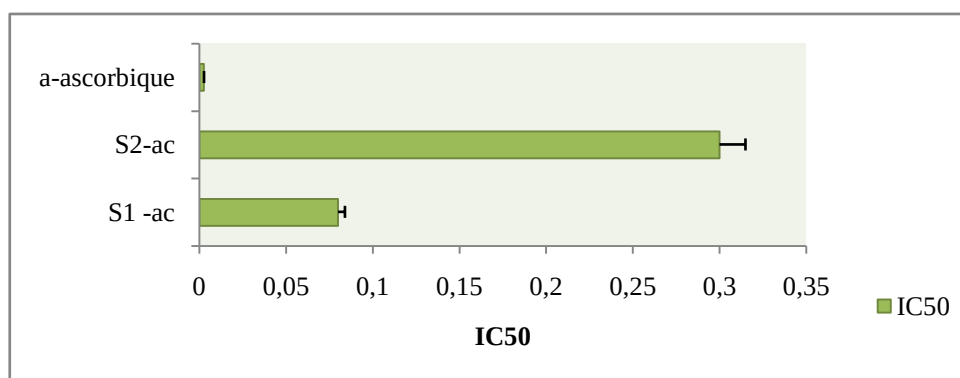


Figure 55 : IC₅₀ des extraits acétoniques de *T. polium* (S1, S2)
S : stade végétatif, S2 : stade de floraison

La diminution de l'activité antioxydante de *T. polium* a été concomitante à la diminution de la concentration phénolique totale pendant les stades de développement s1 à s2.

La variation des polyphénols au cours du stade de développement indique que la potentialité de biosynthèse de ces métabolites peut être affectée par les changements phénologiques. Cependant, les composants individuels des flavonoïdes pourraient varier au cours de la croissance de la plante (Fico *et al.*, 2000).

Les résultats de l'activité réductrice des extraits acétoniques de la plantes étudiée sont représentés dans la figure 56. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

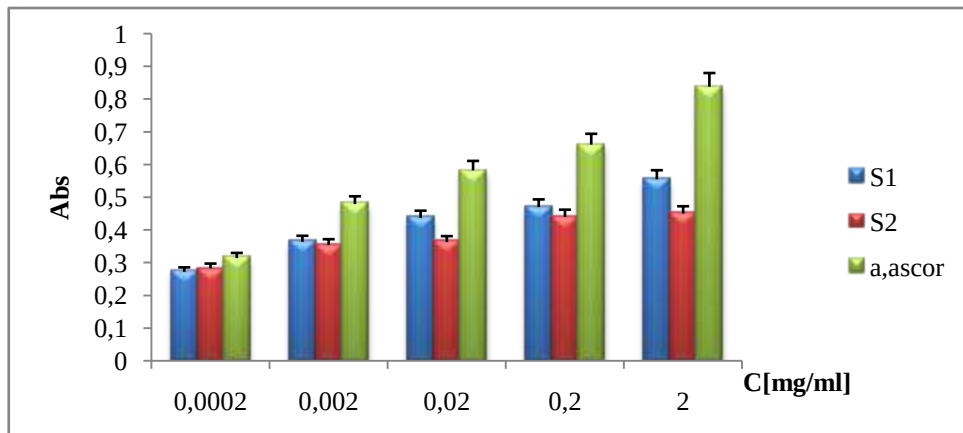


Figure 56 : Pouvoir réducteur des extraits acétoniques de *T. polium*
S : stade végétatif, S2 : stade de floraison

Le pouvoir réducteur de l'extrait acétonique de S1 et de S2 de *T. polium* s'élèvent de 0.272 et 0.283 à la concentration 0.0002 mg/ml, à 0.555 et 0.45 à la concentration 2 mg/ml respectivement. Nous avons constaté que c'est le stade végétatif (0.555) qui présente une forte activité antioxydante comparable à l'acide ascorbique (0.838) à 2 mg/ml.

L'extrait de *T. polium* récoltée dans le stade végétatif (S1) présente une forte activité antioxydante testée par le DPPH et le FRAP. Cette activité peut être due à la présence d'une quantité importante de flavonoïdes (80.15 mg EC/10 g PS).

En effet, l'étude de l'activité antioxydante de *T. polium* est le sujet de plusieurs investigations en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* (Bahramikia *et al.*, 2012). Les chercheurs ont conclu que les effets antioxydants de la plante pourraient être attribués aux flavonoïdes, mais pourraient également être dus aux autres biomolécules présentes dans l'extrait (Yu *et al.*, 2015 ; Mahmoudabady *et al.*, 2018).

Zaouali *et al.* (2003) ont trouvé que les quantités de phénols et de tanins totaux étaient plus influencées à la fois par le stade phénologique et le type d'organe de *R. officinalis* (Famille de Lamiaceae). Ils montrent également la richesse des feuilles et des tiges en polyphénols et tanins dans le stade végétatif et fructification et diminuaient dans le stade de floraison, alors que le taux de flavonoïdes n'a pas varié de manière significative.

Partie III : Evaluation Pharmacologique

5. Toxicité

L'extrait acétonique de l'écorce de *Punica granatum* (P), l'extrait acétonique (TP) et l'huile essentielle (HE) de la partie aérienne de *Teucrium polium* ont été sélectionnés pour l'étude de la toxicité en raison de leur activité antioxydante importante. La toxicité de ces extraits des deux plantes étudiées n'a pas été rapportée auparavant.

5.1. Toxicité aigue

C'est une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après l'administration de la substance active. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux.

La carte clinique des rats traités avec les extraits est exempte de symptômes graves. Le comportement des rats était normal avec une démarche et activité normale. Cependant, les rats traités avec l'huile essentielle de TP manifestent des signes d'une respiration lente, l'isolement et l'anorexie par rapport aux témoins, leurs mouvements sont réduits durant les premières minutes. Tous ces signes ont disparu après les premières 24 heures.

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience a démontré qu'il y a une augmentation modérément significative ($p < 0.001$) au niveau du poids (Fig.57).

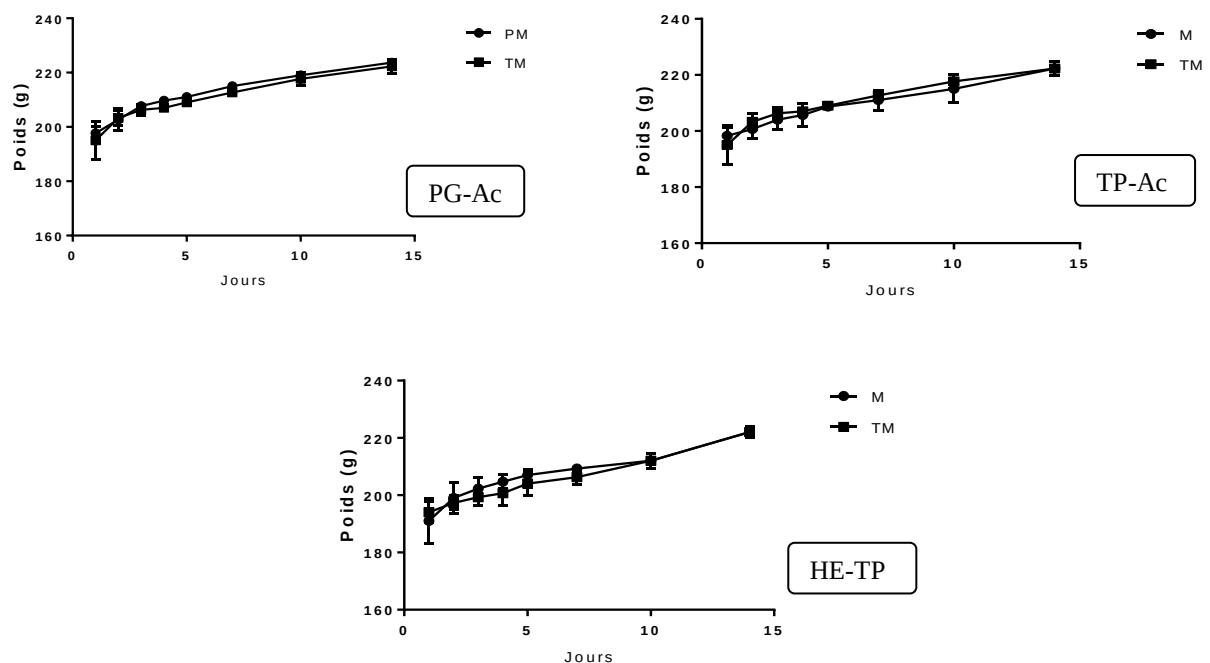


Figure 57 : Evolution pondérale des rats dans les conditions de la toxicité aigue

Tous les animaux ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation, ce qui implique que la DL_{50} de chaque extrait est supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel des rats (dose limite). Selon l'échelle de **Hodge & sterner (1949)** pour les rats de laboratoire, une DL_{50} orale $\geq$ 2000 mg/kg signifie que la substance est légèrement toxique. Les résultats du test de toxicité aigue n'ont pas permis de calculer la DL_{50} des différents extraits.

Krache et al (2017) ont constaté que la DL_{50} orale de l'extrait méthanolique de *T. polium* était supérieure à 2400 mg / kg de poids corporel. **Rasekh et al (2005)** ont signalé que la DL_{50} orale de l'extrait aqueux de *T. polium* était supérieure à 8g / kg de poids corporel. En outre, **Meguellati et al. (2019)** ont rapporté que l'administration orale de l'extrait aqueux de *T. polium* à des doses atteignant 16 g/Kg p.c. n'a provoqué aucun signe de toxicité chez les deux sexes des souris durant 14 jours d'observation. Cependant, **Khleifat et al (2001)** ont déterminé une DL_{50} de 262,0 mg / kg chez les rats traités avec l'extrait éthanolique de *T. polium* par voie *intra péritonéale*.

De nombreuses doses d'extrait de grenade administrées par injection *intra péritonéale* à des rats et des souris ont donné une DL_{50} de 217 mg/kg et 187 mg/kg, respectivement. Tandis que la DL_{50} orale était supérieure à 5 g/kg (**Patel et al., 2008**). **Bhandary et al. (2013)** ont rapporté dans leur étude, que les extraits éthanoliques de fruits entiers, de graines de grenade et l'acide ellagique synthétique sont pratiquement non toxiques à une dose unique d'administration orale chez les souris. Aucune mortalité n'a été observée, ils ont signalé que la DL_{50} était supérieure à 2000 mg.

En outre, **Setiadhi et al. (2017)** ont constaté que la DL_{50} de l'extrait éthanolique de graines de grenade était supérieure à 160 mg/kg de poids corporel. Cependant, une activité locomotrice réduite ait été observée au début du l'étude, mais après 60 minutes les souris ont revenu à son activité. **Ali et al. (2017)** ont signalé que la DL_{50} de l'extrait méthanolique de l'écorce de *P. granatum* était d'environ 1305 mg/kg administré par voie *intra péritonéale* chez les souris.

Le foie travaille en association avec les reins pour éliminer les substances toxiques du sang (**Tulsawani, 2010**). Une étude de la fonction rénale et hépatique peut donc s'avérer utile pour évaluer les effets toxiques des plantes médicinales.

Les études sériques effectuées sur rats traités par les différents extraits ne montrent pas de changements significatifs par rapport aux témoins (Tableau 13).

Cependant, les résultats indiquent une diminution non significative du taux du cholestérol, triglycérides et glucose chez les rats traités par les extraits acétoniques de la plante *Teucrium polium* et du fruit *Punica granatum*. Ceci peut-être due aux polyphénols et flavonoïdes présents dans les extraits acétoniques, doué des effets hypoglycémiques et hypo lipidiques (Rasekh *et al.*, 2001).

Gharaibeh *et al.* (1988) ont rapporté que le traitement des animaux rendus diabétiques par STZ avec l'extrait aqueux de *T. polium* a montré une diminution significative ($p<0.001$) du taux du glucose après 24h, par contre les animaux normoglycémiques qui montrent une diminution après 8 jours.

Plusieurs investigations ont montré l'effet hypoglycémique et hypo lipidique de *T. polium* (Esmaeili & Yazdanparast, 2004 ; Ghoraishian, 2006 ; Bhonde *et al.*, 2007 ; Mohseni Salehi Monfared & Pournourmohammadi, 2010 ; Shahraki *et al.*, 2007), et de *Punica granatum* (Salwe *et al.*, 2015 ; El-Hadary & Ramadan, 2019)

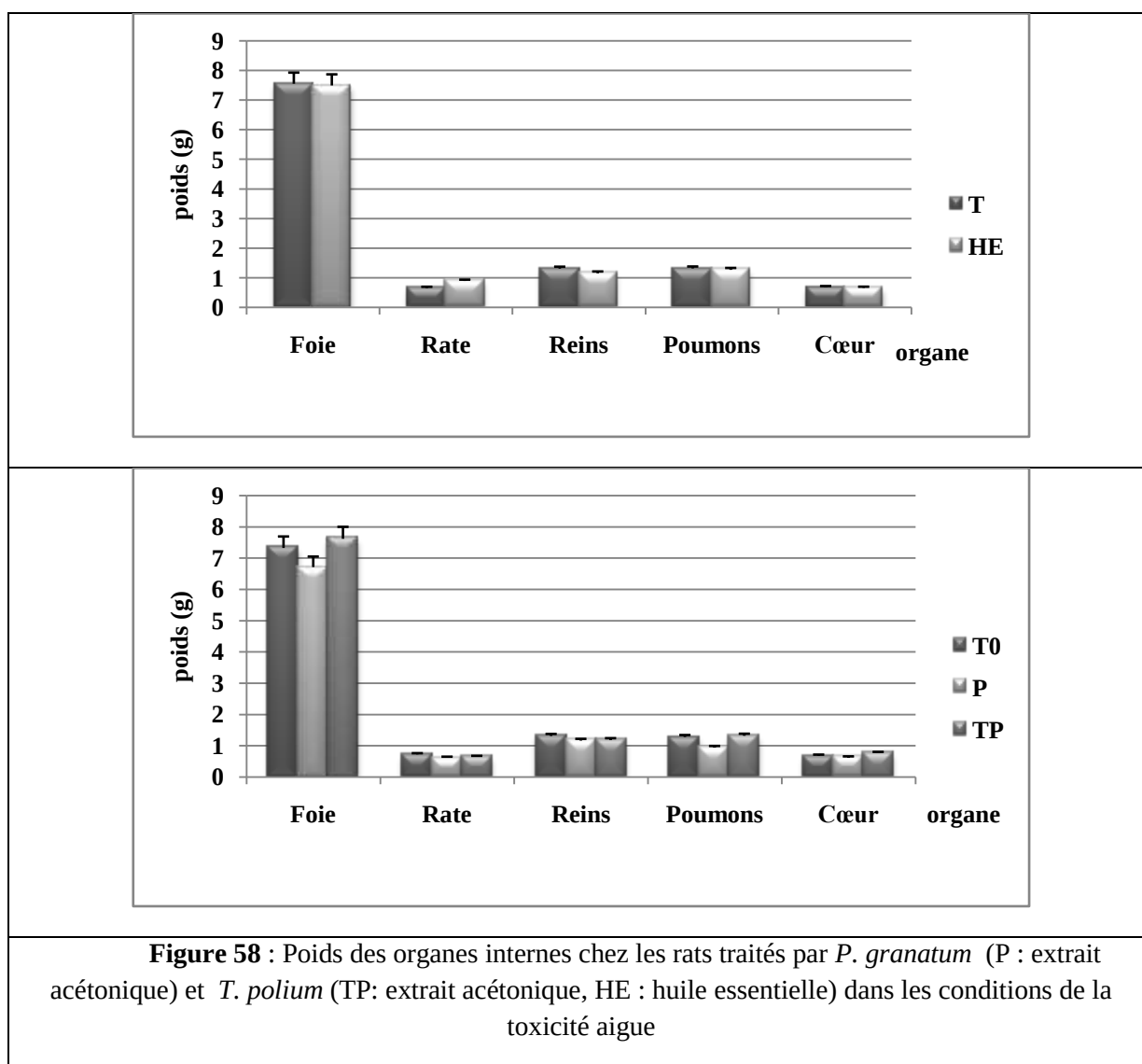
Tableau 13: Analyses biochimiques des rats traités par l'extrait acétonique de *Punica granatum* (P), l'extrait acétonique (TP) et l'huile essentielle (HE) de *Teucrium polium* dans les conditions de la toxicité aigue

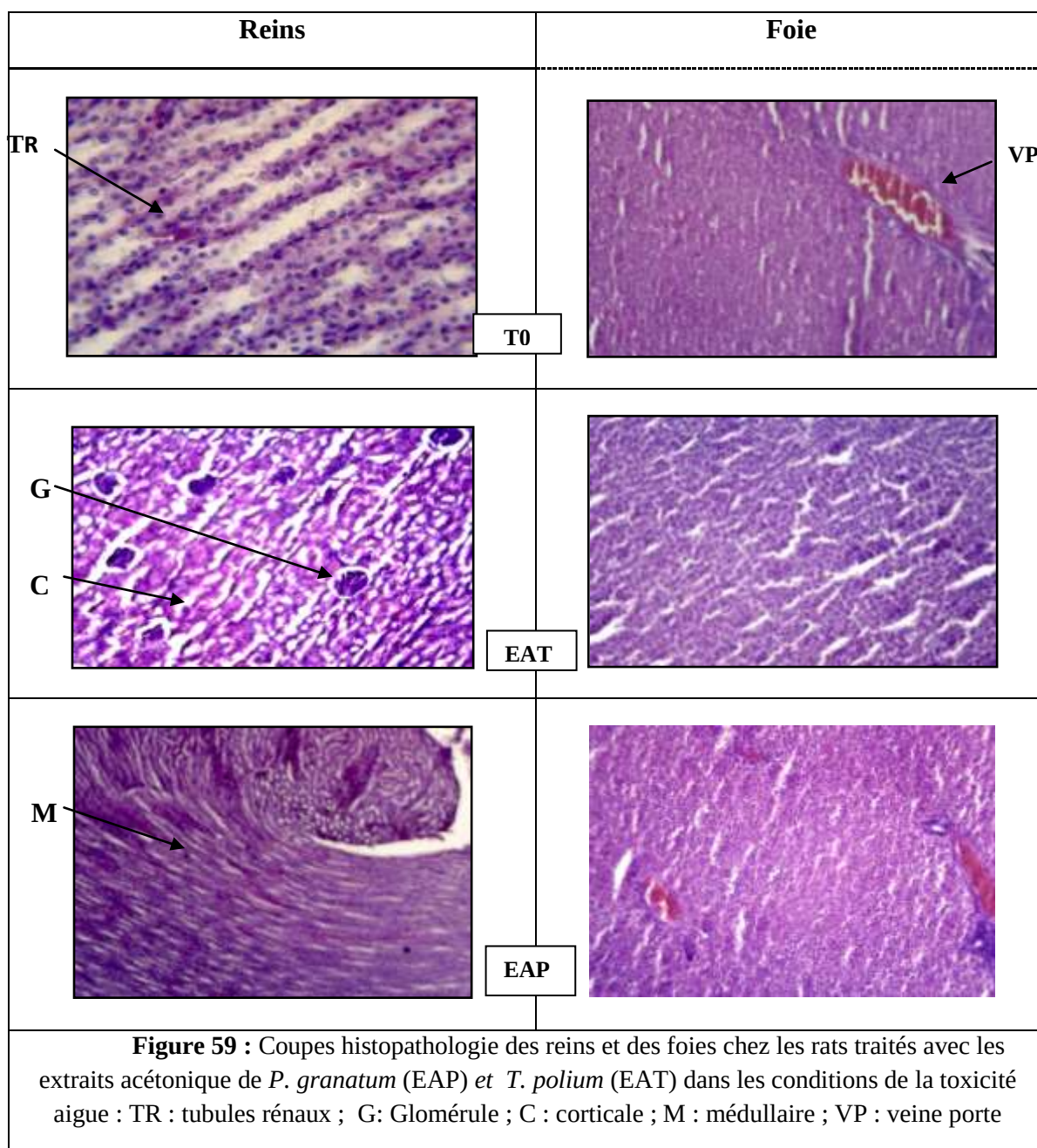
Tox-aigue	T ₀	P	TP	T _H	HE
Gly	1,06±0,03	0,89±0,20	0,87±0,12	0,94±0,04	0,95±0,06
Chol	1,86±0,27	1,54±0,35	1,75±0,05	2,09±0,17	2,02±0,05
TG	1,11±0,08	0,87±0,34	0,80±0,21	0,97±0,20	1,15±0,21
ASAT	130,46±11,30	125,33±12,74	124,09±6,24	130,66±2,51	130±2
ALAT	44,83±2,80	38,99±1,48	21,66±6,11	36,66±1,52	32±3,60
PAL	147,49±6,25	143,33±10,40	143,66±14,57	104,33±8,14	100,66±21,12
BIL T	7,86±0,42	7,66±1,45	8,03±1,00	7,6±0,56	7,11±0,83
BILD	1,2±0,21	1,55±0,65	1,45±0,61	1,5±0,21	1,05±0,13
UREE	0,20±0,02	0,21±0,05	0,24±0,07	0,22±0,02	0,21±0,01
CREA	10±1,04	10,37±0,62	10,16±0,76	10,11±0,33	11,1±0,27

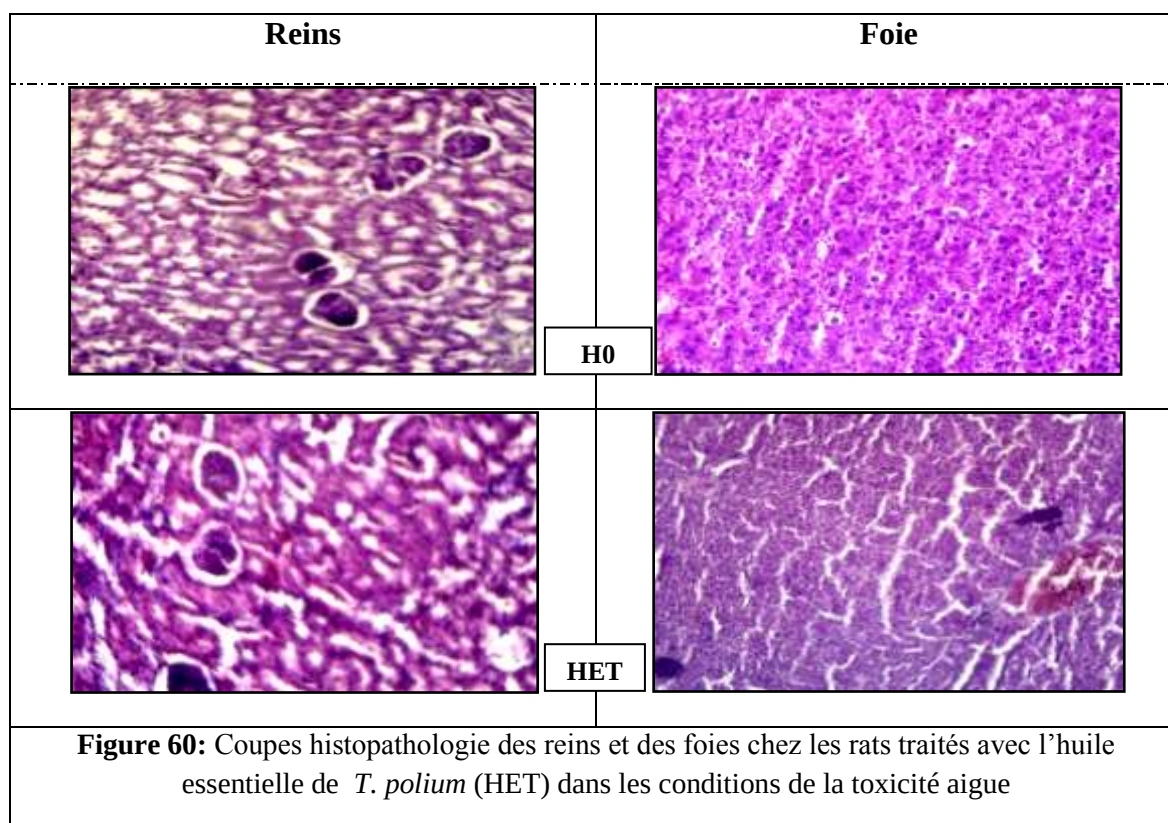
Les données sont exprimées par moyenne ± SEM. (n=5); T: témoins ; Gly ; Glycémie (g/l) ; Chol : Cholestérol (g/l) ; TG : Triglycéride (g/l); ASAT : Aspartate aminotransférase (U/l) ; ALAT :Alanine aminotransférase (U/l); PAL : Phosphatase alcaline (U/l) ; BILT: Bilirubine Totale (mg/l) ; BILD: Bilirubine directe (mg/l) ; CREA :Créatinine (g/l); Urée (g/l).

L'examen macroscopique des organes des rats, n'a révélé aucun changement morphologique. Le suivi des poids absolus des organes indique que le poids du cœur, foie, poumons et des reins des rats traités présente des valeurs proches que les valeurs des rats témoins (Fig.58). En revanche, notre étude illustre une légère augmentation du poids de la rate chez les rats traités avec l'huile essentielle de TP par rapport aux témoins.

Les foies des rats témoins sont normaux avec des hépatocytes séparées par des sinusoides étroites. Tandis que les reins présentent un parenchyme normal. Dans le parenchyme cortical se trouvent de nombreux petits amas ronds dispersés qui sont des glomérules. L'observation des coupes histologiques du foie et du rein des rats traités par rapport aux témoins a permis de constater la conservation de l'architecture cellulaire (lobulaire et tubulaire) de ces deux organes (Fig.59 et 60), à l'exception d'une légère inflammation a été observée dans le foie du groupe traité avec 2g/kg p.c. de l'extrait acétonique de *P. granatum*. Ceci peut-être due à l'un ou plusieurs des composés phytochimiques présents dans l'extrait, effectivement, la présence de glycosides a été suggérée de provoquer une inflammation dans le foie, et sans effet sur les reins (Ezejiofor *et al.*, 2013; Kebede *et al.*, 2016).







Les travaux de **Chabane *et al.* (2020)** sont en parfaite concordance avec nos résultats, qui ont démontré que l'administration orale de l'extrait méthanolique de *T. polium* n'a provoqué aucun signe de toxicité chez les souris, aucune mortalité n'a été signalé pendant la période d'observation de 14 jours, la DL_{50} enregistrée dépassait 5000 mg/kg de poids corporel. De plus, aucun changement significatif n'a été observé dans les paramètres biochimiques ou les coupes histologiques du foie ou du rein, à l'exception d'une légère dilatation de la veine porte.

5.2.Toxicité subaigüe

Au bout des 28 jours, aucune mortalité n'a été signalée pendant l'expérience. D'autre part, les rats traités par les extraits dans les conditions de la toxicité subaigüe ont présenté une carte clinique dépourvue de signes de toxicité pendant la période de l'étude en comparaison avec les animaux témoins. Leur comportement était semblable à celui des rats témoins ; absence de difficultés respiratoires, convulsion, diarrhée, coma,...etc

5.2.1. Chronologie de l'évolution pondérale

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly *et al.*, 2004). D'après la figure 61, tous les lots ont présenté une évolution corporelle normale et similaire à celle du lot témoin.

Des travaux ont démontré aussi une évolution corporelle normale des rats après administration quotidienne par voie orale de l'extrait de *Punica granatum* (Bhandary *et al.*, 2013) et celui de *Teucrium polium* (Rasekh *et al.*, 2005 ; Al-Ashban *et al.*, 2006 ; Meguellati *et al.*, 2019).

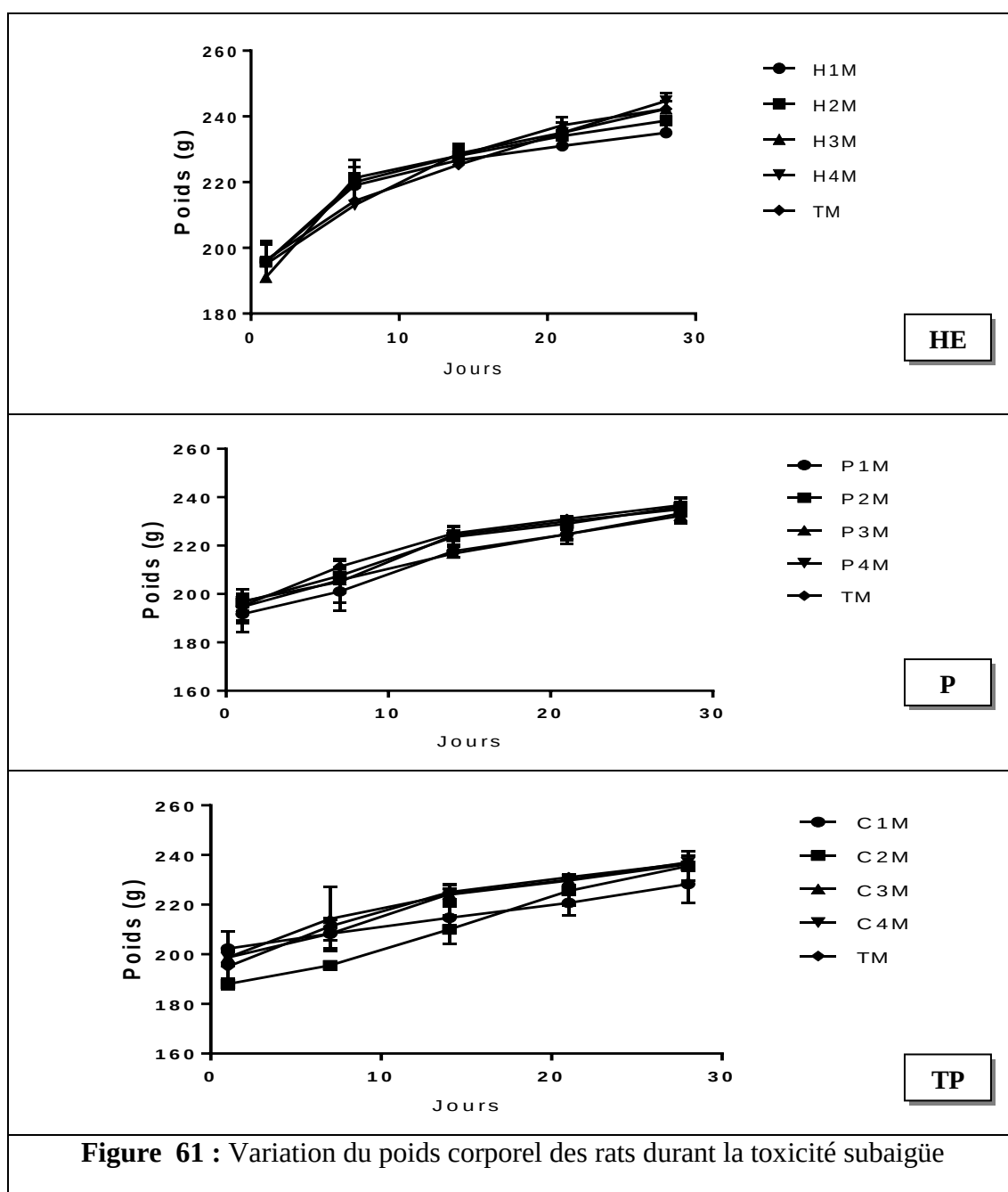


Figure 61 : Variation du poids corporel des rats durant la toxicité subaiguë

5.2.2. Poids des organes

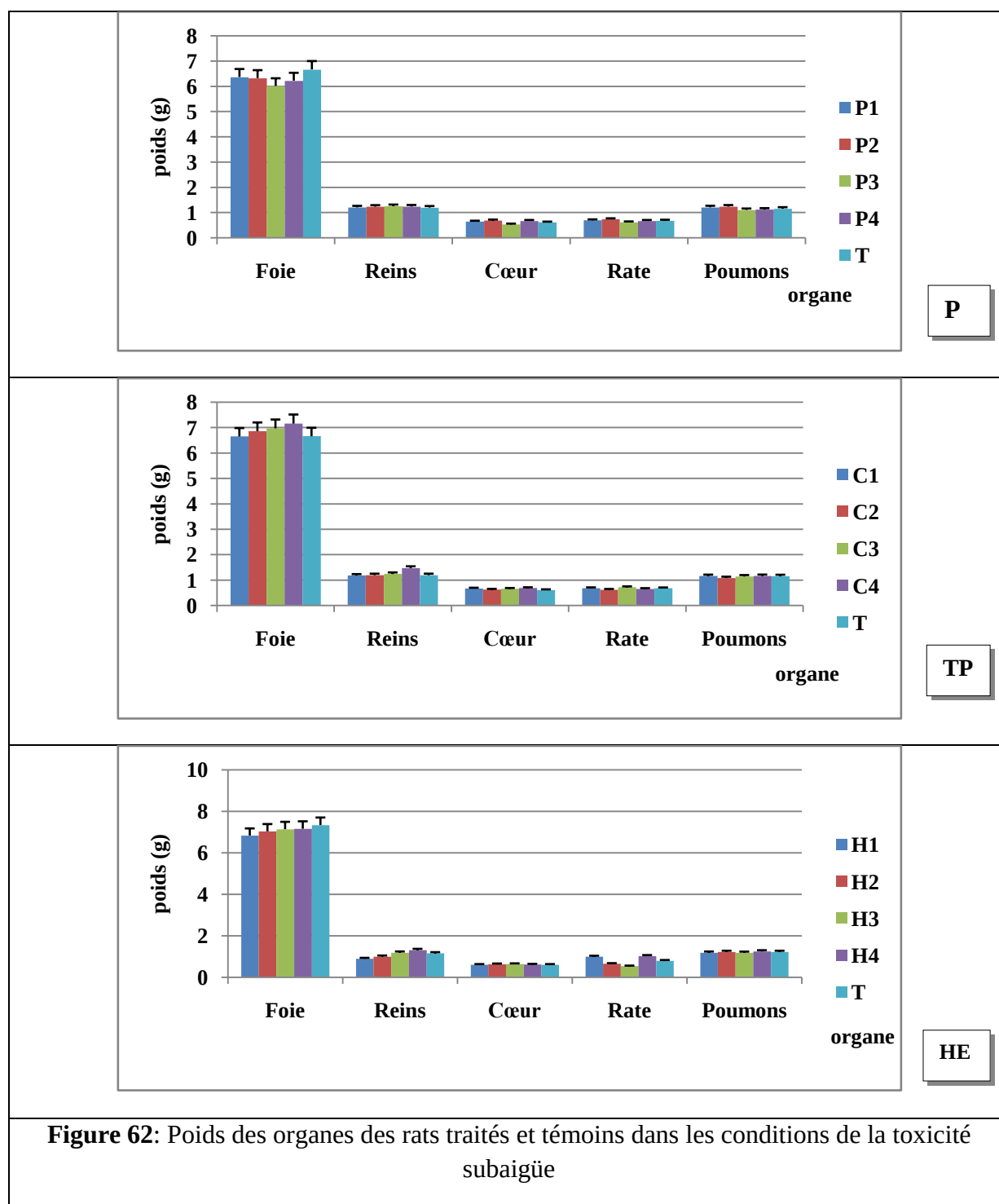
Après la période de surveillance, les rats ont été sacrifiés pour isoler les différents organes. Ces derniers présentaient à l'analyse un aspect normal similaire à celui des organes du lot témoin (Fig.62). Le poids des organes n'a montré aucun changement significatif. Cependant, pour les animaux traités par l'extrait acétonique (TP) de *Teucrium polium*, des élévations significatives des valeurs du poids des reins et du foie, sont observées. Nos résultats concordent avec les travaux de **Rasekh et al. (2005)**, de **Krache et al (2017)** et de **Al-Ashban et al (2006)**. On a enregistré aussi une augmentation du poids des reins et de rate chez les rats traités avec les doses 300 et 600 mg/kg de l'huile essentielle de la même plante.

Plus récemment, **Meguelliati et al (2019)** ont rapporté que l'administration orale pendant 28 jours avec les doses 500 mg/kg et 1000 mg/kg de l'extrait aqueux de *Teucrium polium* n'avaient aucun effet sur la morphologie des organes (le foie, les reins, les poumons, le cœur et l'estomac). De plus, le poids relatif des organes des rats traités n'a pas montré de changement significatif.

Patel et al. (2008) ont signalé que l'extrait de fruit entier de *P. granatum* n'a provoqué aucun signe clinique de toxicité, après une exposition de 90 jours à différentes doses de 60, 240 et 600 mg / kg p.c. par gavage, et aucune modification du poids relatif des organes chez les rats traités n'a été marquée.

Egalement, aucun changement significatif n'a été observé dans le poids des organes internes chez les rats traités avec 2g/kg d'extrait éthanolique de grenade pendant 28 jours par gavage (**Bhandary et al., 2013**).

Le changement du poids des organes internes est un indice de toxicité après l'exposition à une substance toxique (**Raza et al., 2002; Teo et al., 2002**). Cependant, ces résultats nécessitent des analyses sanguines et histologiques pour connaître l'effet de l'extrait sur ces organes.



5.2.3. Données hématologiques

Le système hématopoïétique est une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et de l'animal (Mukinda & Syce, 2007).

Les résultats hématologiques obtenus sont illustrés dans les tableaux 14 et 15. Aucune différence significative n'a été observée entre les taux moyens des différents paramètres hématologiques évalués chez les rats traités et leurs valeurs dans les groupes témoins correspondants. Néanmoins, on a enregistré une augmentation de plaquettes, des érythrocytes et des leucocytes chez les rats traités avec 600 mg/kg p.c. de l'extrait acétonique de *T. polium*. Cependant l'augmentation des érythrocytes et des leucocytes est due à l'augmentation de la production des éléments de régulation de l'hématopoïèse tels que les CSF (Colony stimulating factor), l'EPO (Erythropoietin), la TPO (Thrombopoietin) par les macrophages et les cellules stromales de la moelle osseuse (Chang-Gue *et al.*, 2003; Udu *et al.*, 2005).

Tableau 14 : Paramètres hématologiques des rats traités avec les extraits phénoliques (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe

SA	P1	P2	P3	P4	T	TP1	TP2	TP3	TP4
Hémoglobine (g/dl)	13,76 ±1,00	10,7 ±0,8	11,36 ±1,47	13,33 ±1,15	12,97 ±5,41	13,43 ±1,58	9,7 ±2,49	10,36 ±1,60	12,66 ±1,52
GR (x10⁶/µl)	5,86 ±0,49	6,63 ±1,28	5,22 ±0,31	6,38 ±0,57	5,79 ±0,59	5,53 ±1,04	5,63 ±1,28	5,32 ±0,94	6,37 ±0,60
GB (x10³/µl)	8,13 ±1,47	8,7 ±0,85	9,36 ±0,58	9,1 ±0,36	9,7 ±1,15	8,8 ±1,12	8,7 ±0,85	8,03 ±0,66	9,1 ±0,36
Plaquettes (x10³/µl)	647 ±90,07	667,66 ±20,52	688 ±38,3	681,33 ±44,28	685,33 ±11,01	647 ±124,95	664,33 ±17,92	704,66 ±39,87	814,66 ±57,97
Hématocrite (%)	34 ±5,36	155,26 ±4,63	44,26 ±2,98	44,84 ±2,14	45,83 ±0,98	35,33 ±6,47	40,76 ±3,35	40,93 ±3,81	49,5 ±2,76

Les données sont exprimées par moyenne ± SEM. (n=5); T: témoins ; GB : Globules blancs ; GR: Globules rouges. P : extrait acétonique de *P. granatum*, TP : extrait acétonique de *T. polium*.

Tableau 15 : Paramètres hématologiques des rats traités avec l'huile essentielle de *T. polium* (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe

SA	T _H	H1	H2	H3	H4
Hémoglobine (g/dl)	13,3±0,85	13,76±1,05	12,03±0,41	9,7±1,11	12,33±1,52
GR (x10⁶/µl)	5,99±0,13	5,53±0,24	6,3±0,78	4,98±0,52	6,72±0,31
GB (x10³/µl)	10,03±1,11	9,8±0,51	9,7±0,85	11,03±0,49	9,76±0,92
Plaquettes (x10³/µl)	711,66±33,38	675±81,06	687,66±6,42	708±36,42	756±61,22
Hématocrite (%)	46,17±1,10	42,9±3,56	43,43±4,28	43,26±4,45	47,84±2,20

Les données sont exprimées par moyenne ± SEM. (n=5); T_H: témoins ; GB : Globules blancs ; GR : Globules rouges.

On autre, le traitement subaiguë de six semaines des rats avec 75, 150 et 300 mg/kg p.c. de l'extrait méthanolique de *T. polium* a entraîné une augmentation significative des paramètres hématologiques (**krache et al., 2017**). **Meguellati et al. (2019)** ont signalé une augmentation significative de taux d'érythrocytes chez les souris traités avec 1000 mg/kg de l'extrait aqueux pendant 28 jours.

Des autres travaux réalisés sur *T. polium* indiquent qu'il n'y avait aucun changement significatif dans les paramètres hématologiques après un traitement chronique (6 semaines) avec l'extrait éthanolique (**Khleifat et al., 2002**) et l'extrait aqueux (44 jours) par rapport à leurs témoins (**Rasekh et al., 2005**).

Dans des études précédentes, l'administration orale pendant 28 jours de 2000 mg / kg d'extrait éthanolique de *P. granatum* n'avait aucun effet sur les paramètres hématologiques (**Bhandary et al., 2013**).

5.2.4. Données biochimiques

Les paramètres du bilan rénal ont montré des élévations significatives ($p < 0.05$) de l'urée et la créatinine chez les rats traités avec l'extrait acétonique de *T. polium* à la dose de 600 mg/kg p.c. /j (Tab.15). Ces résultats concordent avec les travaux de **Rasekh et al. (2005)**, **Khleifat et al. (2002)** et **Iriadam et al. (2006)**.

Dans des études précédentes, l'administration orale de l'extrait éthanolique/ aqueux / méthanolique de *T. polium* a provoqué une augmentation significative des paramètres rénaux, hépatiques et des valeurs lipidiques (**Khleifat et al., 2002 ; Al-Ashban et al., 2006 ; Rasekh et al., 2005 ; krache et al., 2017 ; Meguellati et al., 2019**). Cependant dans notre étude, des valeurs normales de l'ALAT, de l'ASAT, de la bilirubine T, et de la bilirubine D ont été retrouvées chez les rats traités avec l'extrait acétonique de *T. polium*.

Les travaux de **Rasekh et al (2005)** ont montré que le taux de transaminases ne s'élevé qu'avec la dose 300 mg/kg après 44 jours de traitement. Ceci implique l'origine botanique, la composition d'extrait pour expliquer cette différence.

Toutefois les résultats indiquent aussi une diminution significative du taux du cholestérol chez les rats traités avec les extraits phénoliques par rapport aux témoins (Tab.16). **Rasekh et al. (2001)** attribuent la diminution du taux du cholestérol total chez les rats traités avec l'extrait aqueux de *T. polium* à la présence de quelques polyphénols et flavonoïdes doués de propriétés anti hyperlipidémique.

Tandis que le niveau de la glycémie n'a enregistré aucune différence significative par rapport aux témoins. Selon **Khleifat et al. (2002)**, le taux de la glycémie n'a pas été affecté par le traitement chronique avec *T. polium*. L'effet hypoglycémiant de *T. polium* et d'autre genre *T. oliverianum* a été constaté après leur administration à court terme, ceci est probablement dû à un effet transitoire sur le métabolisme homéostatique des glucides (**Khleifat et al., 2002**). Néanmoins, les résultats d'**Al-Ashban et al. (2006)** ont montré que le taux de la glycémie a diminué avec la dose 100 mg/kg p.c. d'extrait éthanolique après 90 jours de traitement.

En revanche, pour les lots traités par les extraits de grenade, aucun changement significatif n'a été observé (Tab.16). Ces résultats corroborent ceux acquis par **Bhandary et al. (2013)** et **Patel et al. (2008)**.

Des études cliniques sur l'homme utilisant des doses d'extraits de fruits de grenade atteignant jusqu'à 1420 mg / jour (870 mg d'équivalents d'acide gallique) pendant 28 jours, n'ont signalé aucun changement indésirable des valeurs sanguines (**Heber et al., 2007 ; Bhandari, 2015 ; Jacinto, 2018**). Egalement, dix patients présentant une sténose de l'artère carotide ont montré que la consommation de jus (121 mg / équivalents de LEA) pendant trois ans n'a eu aucun effet toxique sur les paramètres sanguins (bilan rénal, hépatique et cardiaque) (**Aviram et al., 2004 ; Bhandari, 2015 ; Jacinto, 2018**).

Tandis que les études sériques effectuées sur les rats traités par l'huile essentielle de *T. polium* montrent une légère augmentation des paramètres PAL, ASAT, ALAT, Créa, Urée avec 300 mg /kg/j et 600 mg/kg/j par rapport aux témoins (Tab.17). **Skouti et al. (2012)** ont enregistré une augmentation significative du taux de glucose, AST et ALT chez les rats traités avec l'huile essentielle de *T. polium* (récoltées dans le stade de floraison, Syrie) par voie *IP* pendant 21 jours avec les doses 100 et 200 mg/kg.

L'augmentation de ces enzymes est un indice d'une toxicité probable au niveau des organes tel que le foie et les reins et nécessite l'étude histologique pour plus de précision sur l'état de l'organe.

Tableau 16 : Paramètres biochimiques des rats traités avec les extraits phénoliques (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe : extrait acétonique de *T. polium* (TP) et extrait acétonique de *P. granatum*

SA	P1	P2	P3	P4	T ₀	TP1	TP2	TP3	TP4
Gly	0.96 ±0,06	1,16 ±0,03	0,96 ±0,17	0,97 ±0,17	1,06 ±0,03	0,88 ±0,07	0,91 ±0,10	1,01 ±0,12	1,02 ±0,09
Chol	1.74 ±0,06	1,52 ±0,47	1,44 ±0,40	1,08 ±0,09	1,86 ±0,14	1,64 ±0,14	1,77 ±0,10	1,79 ±0,09	1,57 ±0,06
TG	1.08 ±0,16	1,05 ±0,14	1 ±0,12	1,03 ±0,09	1,11 ±0,07	0,77 ±0,04	0,76 ±0,04	1,24 ±0,01	0,9 ±0,13
ASAT	126 ±5	127,83 ±8,46	124,66 ±13,79	125 ±5	130,46 ±8,34	129,72 ±0,26	127,69 ±1,01	128,66 ±1,30	130,65 ±1,006
ALAT	41.66 ±3,51	41,33 ±3,05	44,66 ±2,51	44,33 ±4,04	44,83 ±2,78	37,93 ±2,40	36,93 ±0,51	33,7 ±1,21	20 ±3
PAL	136.66 ±7,63	132,33 ±11,23	136 ±10,14	140 ±5	147,49 ±7,89	161,43 ±11,32	151,01 ±2,64	150,18 ±7	140,98 ±11,06
BIL T	7.233 ±1,02	8,16 ±0,76	7,98 ±0,95	8,08 ±1,12	7,86 ±0,26	7,34 ±0,79	7,43 ±1,42	7,11 ±0,83	7,11 ±0,83
BILD	1.06 ±0,16	1,26 ±0,58	1,23 ±0,53	1,28 ±0,48	1,2 ±0,3	0,73 ±0,15	1,26 ±0,70	1,01 ±0,16	1,08 ±0,38
UREE	0.19 ±0,07	0.243 ±0,04	0,22 ±0,06	0,22 ±0,02	0,2 ±0,04	0,25 ±0,03	0,26 ±0,02	0,27 ±0,04	0,4 ±0,04
CREA	9.25 ±0,66	10.41 ±0,80	9,5 ±2,29	10,25 ±0,66	10 ±1,0	10,66 ±0,57	11,46 ±0,55	11,11 ±0,83	13,33 ±2,08

Tableau 17 : Paramètres biochimiques des rats traités avec l'huile essentielle de *T. polium* (D1, D2, D3, D4) dans les conditions de la toxicité subaigüe

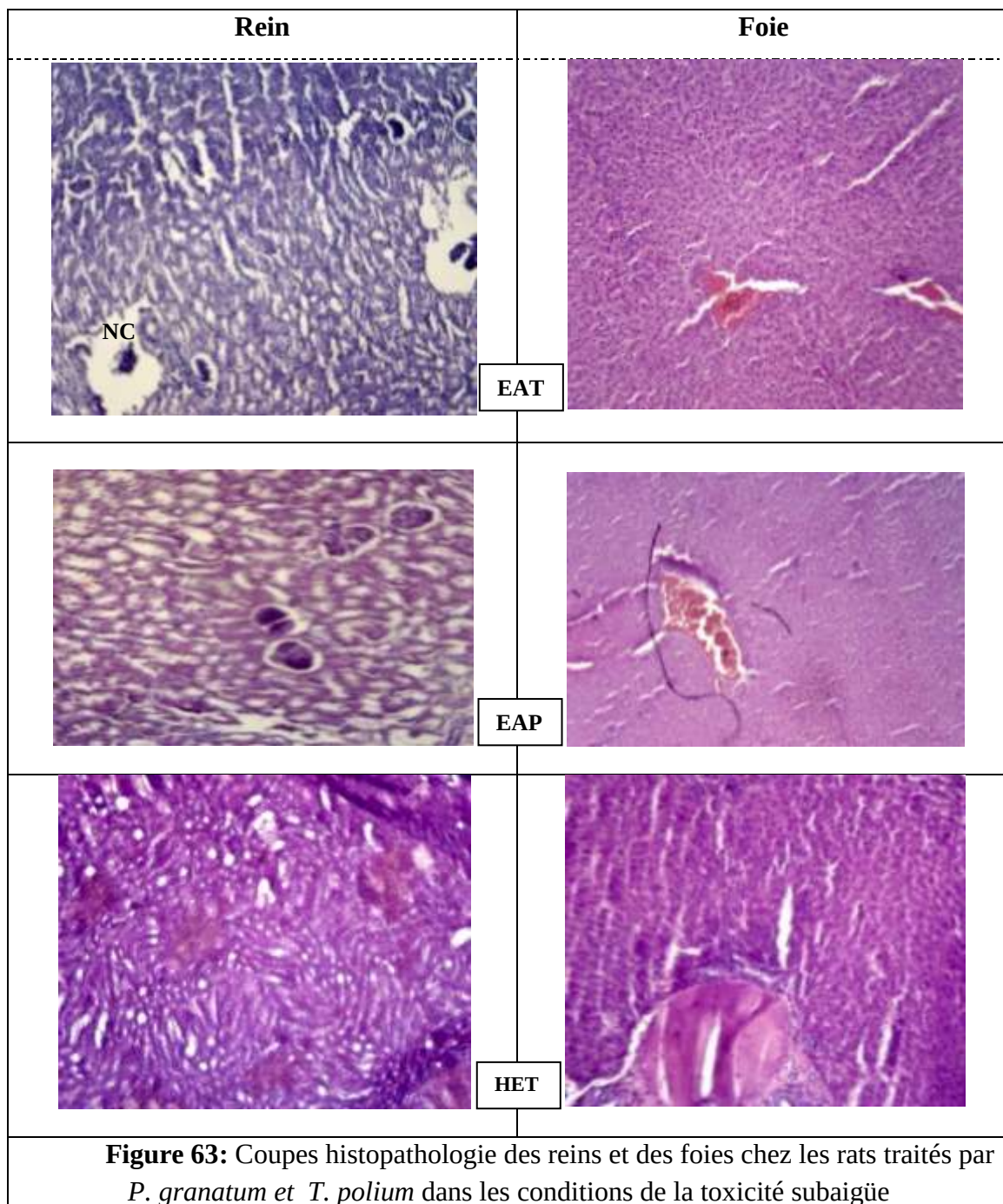
H-SA	T _H	H1	H2	H3	H4
Gly	1.07±0,15	1,1±0,10	1.51±0,12	1.103±0,11	1.1±0,10
Chol	2.09±0,17	1.96±0,06	1.46±0,13	2.046±0,22	1.86±0,11
TG	1.11±0,16	1.19±0,06	1.29±0,15	1.08±0,09	1.13±0,13
ASAT	130.66±2,08	120.33±1,52	127.016±3,88	134.66±2,51	135±2
ALAT	32±2,64	26±5,29	27.95±2,38	36±2	37.5±0,5
PAL	104±14,93	102.33±6,80	106.83±7,57	115±3	115±2
BIL T	8±1	7.78±1,33	3.93±1	7.45±1,38	8.93±0,95
BIL D	1.5±0,5	1.01±0,16	0.53±0,23	1.43±0,52	1.83±0,61
UREE	0.21±0,02	0.18±0,01	0.10±0,02	0.28±0,01	0.24±0,04
CREA	10.11±0,83	8.45±1,80	12±2,64	15.33±1,52	15.41±0,52

Les données sont exprimées par moyenne ± SEM. (n=5); T: témoins ; Gly ; Glycémie (g/l) ; Chol : Cholestérol (g/l) ; TG : Triglycéride (g/l); ASAT : Aspartate aminotransférase (U/l) ; ALAT :Alanine aminotransférase (U/l); PAL :Phosphatase alcaline (U/l) ; BILT: Bilirubine Totale (mg/l) ; BILD: Bilirubine directe (mg/l) ; CREA :Créatinine (g/l); Urée (g/l).

5.2.5. Histopathologie

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans la figure 63.

Les coupes histologiques du rein et du foie des rats traités avec l'extrait acétonique de *T. polium* (EAT) n'ont pas montré de modifications au niveau du parenchyme rénal par rapport aux témoins. Néanmoins, des néphro-calcinoses (NC) ont été observés pour certains lots (50mg/kg). Ce résultat ne dépend pas de la toxicité mais pourrait correspondre à une anomalie déjà préexistante.



Les travaux précédents ont montré que *T. polium* avait des effets toxiques sur les reins (**Khleifat et al., 2002 ; Rasekh et al., 2005**). **Krache et al. (2017)** ont signalé la présence des vacuoles intra-cytoplasmiques (vacuolisation) dans le rein des rats traités avec la dose de 300 mg/ Kg p.c. d'extrait méthanolique de *T. polium* (récoltées en Juin) durant six semaines.

De plus, **Baradaran et al. (2013)** ont été signalés, qu'il n'y avait aucun changement dans les reins des rats traités avec l'extrait éthanolique de *T. polium* pendant 28 jours consécutifs, avec différentes doses de 50, 100, 150, 200 mg/kg par voie *intra péritonéale*. Néanmoins, des lésions rénales (la dégénérescence, la destruction et la vacuolisation) sont apparues après 28 jours d'arrêt du traitement et le degré des lésions augmentait avec l'augmentation des doses de l'extrait.

Egalement, *T. polium* peut provoquer de dommages du foie (une congestion, une nécrose, et une infiltration inflammatoire) à des doses élevées (**Khleifat et al., 2002 ; Rasekh et al., 2005 ; Al-Ashban et al., 2006 ; Krache et al., 2017**). Une étude récente indiquait que 200 mg / kg d'extrait éthanolique de *T. polium* administré par voie *intra péritonéale* (IP), a provoqué des lésions hépatiques et rénales avec une augmentation significative de marqueurs biochimiques (**Ghasemi et al., 2019**).

Des rapports de cas décrivaient un échec aigu et grave du foie chez l'homme après administration prolongée de *T. polium*, *T. chamaedrys*, *Teucrium viscidum* et *T. capitatum* (**Mattéi et al., 1995 ; De Vincenzi et al., 2003 ; Larrey et al., 1992; Dourakis et al., 2002; Starakis et al., 2006 ; Poon et al., 2008 ; Abu Sitta et al., 2009**).

Mazokopakis et al. (2005) ont signalé qu'un dysfonctionnement du foie apparaît après un mois de traitement par une infusion de *T. polium*. **Savvidou et al. (2007)** ont rapporté deux cas d'hépatite chez deux femmes souffrant d'hyperlipidémie et qui se traitaient par *T. polium* pendant 2 à 3 mois.

L'effet hépatotoxique est attribué à la présence de diterpénoides furano-néoclérodanés en quantité importante dans l'extrait, qui sont transformés par le cytochrome P-450 A3 en des métabolites toxiques (**De Vincenzi et al., 2003 ; Rasekh et al., 2005 ; Pacifico et al., 2012**).

Tandis que l'effet néphrotoxique n'est pas bien élucidé, il peut-être dû aux métabolites toxiques résultant de biotransformation des xénobiotiques par les enzymes rénaux, ces sous-produits provoquent des lésions rénales soit par alkylation ou oxydation d'acide nucléique, dommages de protéines, superoxydation lipidique et rupture des brins d'ADN (**Perazella, 2009**).

Tandis que **Meguellati et al. (2019)** ont constaté que l'administration de l'extrait aqueux (500 et 1000 mg/kg p.c.) de *T. polium* (récoltées en Avril) ne provoquait aucuns changements pathologiques dans le foie et le rein d'animaux traités par rapport au témoin.

En revanche, le rein et le foie des rats traités par l'extrait acétonique de *P. granatum* (EAP) ne présentent pas de modifications histologiques par rapport au témoin (Fig.63). **Bhandary et al. (2013)** et **Patel et al (2008)** n'ont constaté aucune modification pathologique du foie et des reins des animaux traités avec les différentes doses des extraits de grenade.

Pour l'huile essentielle de *T. polium* (HET), il est remarqué qu'elle est toxique que les extraits phénoliques (Fig.63), des micro-vacuoles ont été observées dans les foies, et des vacuoles ont été trouvées dans les reins, des rats traités avec les doses 600 et 300 mg/kg p.c, respectivement. Cette toxicité peut-être dû à la composition de l'huile elle-même.

5.2.6. Conclusion

Dans la présente étude toxicologique, nous constatons que les doses des différents extraits, administrées aux rats (600 mg/kg et 300 mg/kg et 150 mg/kg pour EAP, EAT, et HET respectivement) sont bien tolérées, dans le sens où il n'y a aucun cas de mortalité ; de même qu'aucun signe d'intoxication dû aux substances n'est observé au cours des 28 jours du test, confirmé par les analyses biochimiques et histologiques.

6. Anti-inflammatoire intestinale

Dans un premier temps, les AINS « indométacine » augmentent la perméabilité intestinale. Selon l'hypothèse proposée par le groupe de Bjarnason 1987, cet effet reposerait principalement sur le blocage de la phosphorylation oxydative dans les entérocytes sous l'effet des fortes concentrations intra-luminales d'AINS lors des cycles entérohépatiques répétés (**Thiéfin & Beaugerie, 2005**).

Une étude expérimentale a montré que l'indométacine se liait dans la bile (la bile à la phosphatidylcholine) et pourraient éliminer ou remplacer la phosphatidylcholine conduisant à la production de simples micelles, toxiques ou super toxiques pour la muqueuse intestinale (**Barrios, 2000**). Les AINS inhibent également les deux isoenzymes de la cyclo-oxygénase (**Sigthorsson et al, 2002 ; Tanaka et al., 2002**), et par conséquent, il y a une réduction de la synthèse des médiateurs anti-inflammatoires (**Vemu et al, 2016**).

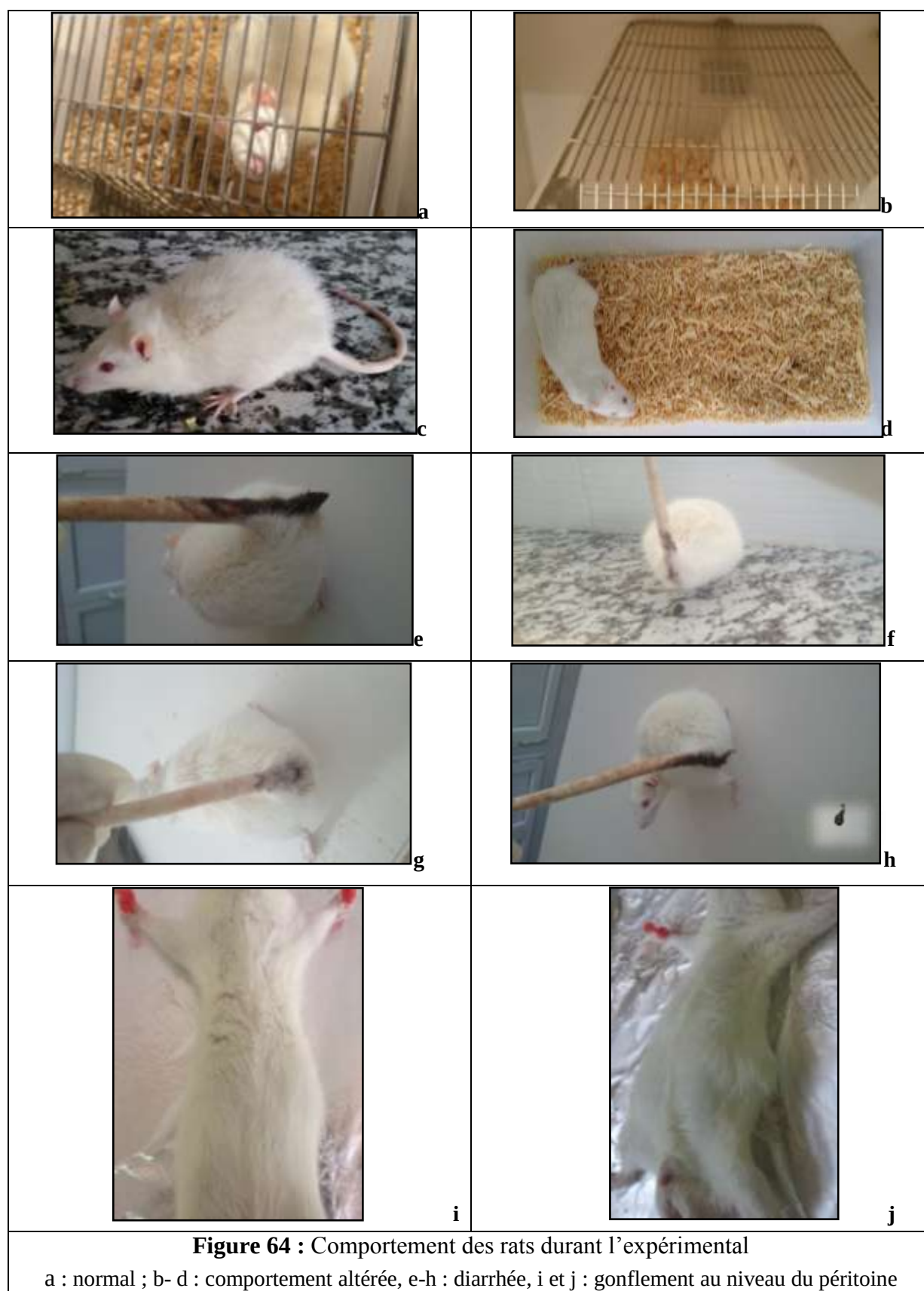
La deuxième étape du processus pathogénique est l'agression de la muqueuse par les bactéries de la lumière et leurs produits participent également à la réaction inflammatoire. L'AINS permet d'induire facilement une inflammation aiguë ou chronique de l'intestin grêle et du côlon qui peut être associée à des lésions extra-intestinales (**Elson et al. 1995 ; Thiéfin & Beaugerie, 2005**).

6.1. Paramètres cliniques

6.1.1. Indice DAI, la consommation d'aliment & la perméabilité intestinale

A partir de 2 jours et durant toute la période du suivie (29 jours), les rats survivants se trouvent à l'état normale (avec des variations dans les poids et la consommation alimentaire), à l'exception dans la phase chronique, des gonflements au niveau du péritoine (Fig.64) sont remarqué chez les rats traités avec l'huile (2/6) et rats non traités (3/6) qui sont caractérisés par des comportements altérés (isolement, diarrhée.. voir Fig.64). On a observé également qu'il y a des mortalités dans les groupes non traités (2/6).

Jagtab et al (2011) a signalé que l'inflammation intestinale induite par l'indométacine, pourrait provoquer de péritonite locale.



Différents paramètres surveillés sur l'animal au cours de l'expérimentation permettent de contrôler et de mesurer le développement et la sévérité de l'inflammation induite. Celle-ci se manifeste par la diminution de la consommation alimentaire associée à une chute de la prise de poids, voire à une perte de poids.

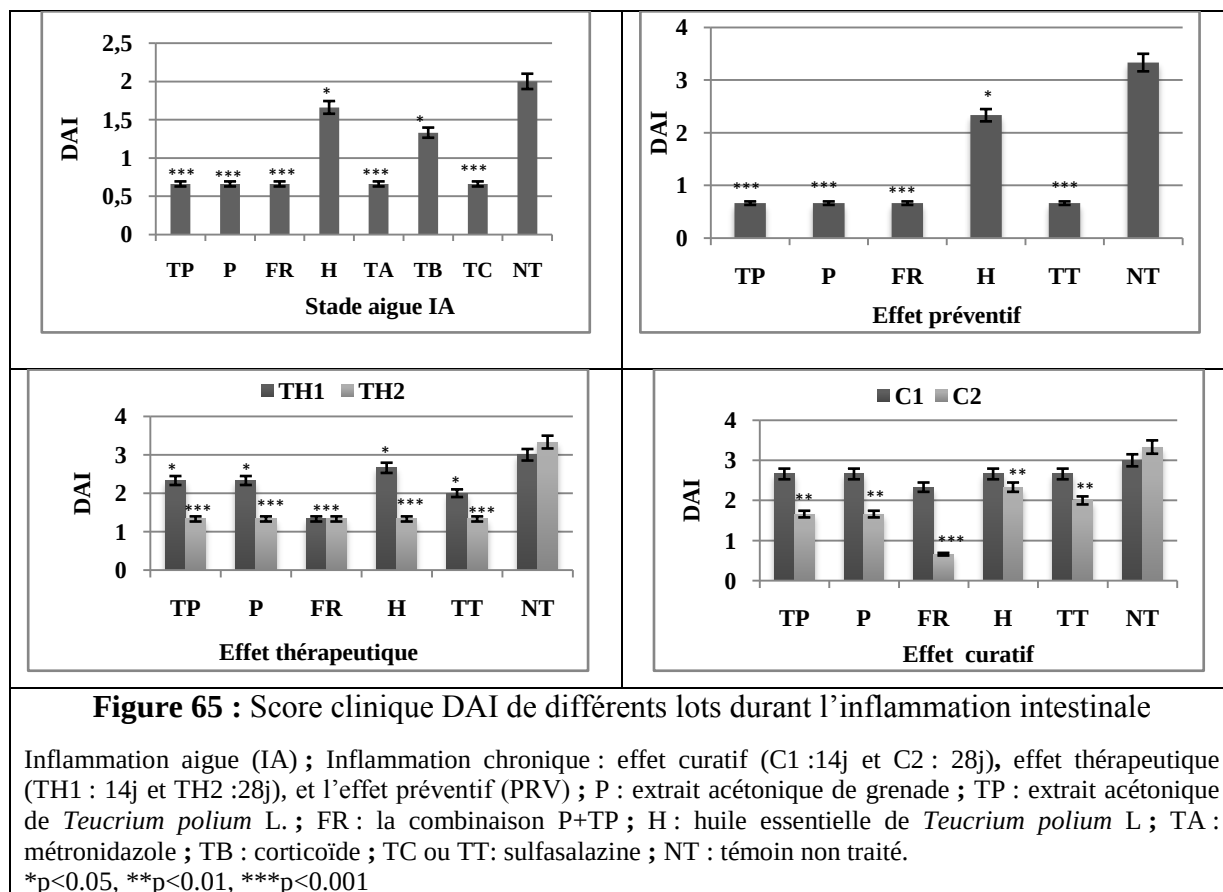
La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée (**Mukinda & Syce, 2007**).

Nos résultats montrent une diminution de poids corporel chez les rats non traités (groupe indométacine) par rapport aux témoins. Cette diminution est traduite par la forte perte de poids corporel (Annexe 7).

plusieurs investigations montrent la changement du couleur de la fèces du marron brun vers noir (Fig.64 : a vs h) chez les animaux souffrant l'inflammation intestinale, pourrait être dû à un saignement gastro-intestinal important (**Lanas et al., 2012; Rainsford et al, 2003, Singh et al, 2016**).

En effet, le score clinique DAI (Disease activity index) a été augmenté chez le groupe non traité et diminué chez les groupes traités, dans les différents stades de l'inflammation (Fig.65). Cependant une diminution significative ($P \leq 0.001$) de l'indice DAI a été enregistré chez le lot traité par la combinaison (FR : TP+P), lot traité par le sulfasalazine, lot traité par les extraits phénoliques TP et P, lot traité par l'huile essentielle de *Teucrium polium* (H) ($p < 0.05$) par rapport au lot non traité, durant le stade chronique (TH, C et PRV).

Plusieur travaux ont montré que l'inflammation intestinale se caractérise par l'altération de la muqueuse intestinale, une diarrhée avec /sans sang occulte, une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de la consommation alimentaire des animaux associée à une diminution de la prise de poids (**Kullmann et al., 2001 ; Gonçalves et al., 2013 ; Singh et al, 2016 ; kikuchi et al., 2019 ; kim et al, 2020**), ceci révèle l'augmentation de l'indice DAI (**Nandi et al, 2010 ; Holgersen et al., 2014 ; Gonçalves et al., 2013**).



D'après nos résultats, on observe que les 03 extraits phénoliques (FR, P et TP) ont des effets bénéfiques sur l'ensemble de paramètres cliniques de l'inflammation intestinale dont la perméabilité intestinale, la consommation d'aliments et l'indice DAI, par rapport l'huile essentielle (Tab.18, 19 et 20 ; Fig.65).

La perméabilité intestinale a été évaluée par la méthode de phénolsulfonephtaléine (PSP). Ce marqueur passe par les voies para-cellulaires des cellules épithéliales intestinales dans la circulation sanguine, et sont excrétés dans l'urine sans être métabolisés dans l'organisme (**Suzuki & Hara, 2010**). En effet, les niveaux d'excrétion chez les groupes non traités (groupe indo) étaient plus élevés que ceux des groupes témoins (Tab.18 et 20). Ceci est dû à l'altération de la muqueuse intestinale durant l'inflammation intestinale (induite expérimentale par l'indo). Nos résultats concordent avec les travaux de **Kume et al (2014)** et **Kikuchi et al. (2019)**.

L'excrétion urinaire de PSP durant l'inflammation aiguë et chronique a été influencée par les différents traitements (Tab.18 et 20).

Cependant, le traitement par la combinaison de 02 extraits phénoliques (FR : extrait acétonique de *Punica granatum* et de *Teucrium polium*) a permis de diminuer significatif la perméabilité intestinale et par conséquence une amélioration de la quantité de nourriture absorbée et de la consommation alimentaire. Cet effet est dû à la présence de flavonoïdes et de tannins dans les 02 extraits acétoniques.

Les flavonoïdes semblent avoir des effets bénéfiques pour traiter les MICI (**H. Yu et al, 2011 ; Da Silva et al., 2016**). La présence de tanins suggéré la capacité à jouer un rôle majeur comme un agent anti-diarrhéique et anti-hémorragique (**Awoyinka et al., 2007**).

Souli et al (2015) a montré la capacité anti-diarrhéique des extraits de grenade chez les rats.

De nombreux produits naturels, tels que les extraits végétaux ont rapporté de puissants effets protecteurs contre les MICI en raison de leur capacité à réguler les cytokines induites par l'inflammation et les voies de signalisation (**Farombi et al, 2013; Sobczak et al, 2014 ; Chen et al, 2015 ; Kim et al, 2020**).

Tableau 18 : Consommation d'aliment et la perméabilité intestinale suivie durant l'inflammation aigue

IA	T sain	TP	P	FR	H	TA	TB	TC	NT
Aliments (g/j/rat)	24,2*** ±2,21	23,83*** ±1,25	22,93*** ±2,00	21,93*** ±2,15	17,16** ±1,90	15,66** ±1,52	16,66** ±1,52	21,33** ±1,52	12,33 ±1,52
PI%	0,85*** ±1,53	5,035* ±1,33	3,35** ±1,26	2,76** ±1,09	4,53** ±1,33	5,53* ±3,8	4,53** ±1,81	6,21* ±1,53	10,60 ±2,20

T sain : témoin sain, P : extrait acétonique de grenade, H : huile essentielle de *Teucrium polium* L, TP : extrait acétonique de *Teucrium polium* L., FR : la combinaison P+TP, TA : métronidazole, TB : corticoïde, TC: sulfasalazine. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Des études ont montré que le métronidazole (un antibactérien vis-à-vis la plupart des bactéries anaérobies Gram négatif et Gram positif) est capable de réduire l'inflammation et les pertes sanguines chez les patients prenant des AINS (**Lanas & Scarpignato, 2006 ; Fornai et al., 2016 ; Colucci et al., 2018**).

Les corticostéroïdes oraux sont généralement insuffisants dans les MICI sévères et aiguës et les corticostéroïdes intraveineux, le tacrolimus et le mAb anti-TNFα sont mis en œuvre en tant que traitement primaire (**Baumgart & Sandborn, 2007 ; Ordas et al, 2012; Holgersen et al, 2014**).

Tableau 19 : Aliments consommés par différents lots durant l'inflammation chronique

Aliments (g/j/rat)	C1	C2	TH1	TH2	PRV
T sain	24,52 ±1,2 ^{***}	26,01± 1,2 ^{***}	24,7±2,78 ^{***}	25,33 ±1,2 ^{***}	25,87 ±3,8 ^{***}
TP	15,83±1,54 ^{**}	19,58±2,34 ^{**}	20,33±5,05 ^{**}	20,78±3,05 ^{**}	28,83±2,75 ^{***}
P	19,25±1,83 ^{**}	20,15±2,75 ^{**}	21,916±1,75 ^{***}	20,33±1,28	28,5±2,78 ^{***}
FR	18,58±2,86 ^{**}	22,25±1,87 ^{***}	22,83±2,26 ^{***}	25,25±2,38 ^{***}	30,41±1,66 ^{***}
H	12,83±1,16	13,25±1,62	13±2,41	15,33±3,50	25,83±4,310 ^{***}
TT	22,41±2,29 ^{***}	21,33±3,83	24,833±1,70 ^{***}	26,66±1,75 ^{***}	30,5±1,73 ^{***}
NT	10,41±0,71	9,16±0,62	10,41±1,87	9,16±1,76	11,66±1,18

p<0.01, *p<0.001

Tableau 20 : Perméabilité intestinale suivie durant l'inflammation chronique

PI%	C1	C2	TH1	TH2	PRV
T sain	1,1±0,53 ^{***}	0,91±1,03 ^{***}	1,02 ±1,08 ^{***}	1,05±1,03 ^{***}	1,02±1,13 ^{***}
TP	4,46±0,92	4,19±1,034 ^{**}	4,196±0,76 ^{**}	4,53±0,35 ^{**}	3,356±0,76 ^{**}
P	4,69±0,85 ^{**}	4,69±1,44 ^{**}	4,884±0,81 ^{**}	4,22±1,45 ^{**}	4,04±1,03 ^{**}
FR	4,93±1,52 ^{**}	3,60±0,90 ^{**}	4,363±1,61 ^{**}	3,18±0,17 ^{**}	2,383±0,81 ^{***}
H	6,04±0,82 [*]	6,04±1,23 [*]	5,87±1,26 [*]	6,54±1,007 [*]	4,41±1,41 ^{**}
TT	5,203±1,26 [*]	3,524±1,00 ^{**}	3,69±1,25 ^{**}	3,28±0,76 ^{**}	2,34±1,26 ^{***}
NT	8,05±1,23	10,23±1,71	8,84±0,30	9,90±1,53	8,32±3,57

Effet curatif (C1 :14j et C2 : 28j), effet thérapeutique (TH1 : 14j et TH2 :28j), et l'effet préventif (PRV); P : extrait acétonique de grenade, H : huile essentielle de *Teucrium polium* L, TP : extrait acétonique de *Teucrium polium* L., FR : la combinaison P+TP, TT : sulfasalazine.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

6.1.2. Ration P/L & pH fécal

Le traitement statistique des résultats obtenus montre qu'il n'y a aucune différence significative du pH fécal chez tous les groupes par rapport au groupe témoin (Tab.21). Cependant, l'administration du l'indo a diminué le pH fécal (Arndt *et al* , 1999).

D'après Singh *et al* (2016) l'administration de l'AINS a changé de manière significative le pH luminal gastrique et intestinal, il est possible que le pH modifié soit une conséquence des changements du microbiote intestinal.

Tableau 21: Variation de pH fécal chez les rats témoins et traités durant l'inflammation intestinale

pH fécal	IA	TH1	TH2	C1	C2	PRV
T sain	7,51±1,12	7,55±1,22	7,51±0,21	7,67±1,12	7,55±0,32	7,61±1,08
TP	6,17±0,15	6,2±0,49	5,82±0,095	7,90±0,17	6,65±0,75	6,95±0,05
P	6,21±0,16	6,83±0,046	6,40±0,35	5,84±0,27	6,79±0,96	7,25±0,06
FR	6,16±0,04	6,56±0,15	6,31±0,028	6,01±0,29	7,52±0,54	7,40±0,056
H	6,51±0,02	7,43±0,041	6,23±0,043	5,99±0,08	7,20±0,59	7,57±0,11
TA	6,25±0,11	/	/	/	/	/
TB	6±0,055	/	/	/	/	/
TC	5,95±0,21	5,45±0,050	5,79±0,20	7,45± 0,58	7,07±0,045	6,97±0,026
NT	6,26±0,12	6,17±0,88	6,05±0,1	6,17±1,083	6,05±0,1	6,17±0,1

T sain : Témoin, P : extrait acétonique de grenade, H : huile essentielle de *Teucrium polium* L, TP : extrait acétonique de *Teucrium polium* L., FR : la combinaison P+TP, TA : métronidazole, TB : corticoïde, TC ou TT : sulfasalazine.

La figure 66 représente la variation de la ration P/L des intestins déterminés chez les différents lots. Une augmentation significative ($p<0.001$) de la ration p/L de l'intestin grêle (IG) chez le groupe non traité (Fig.66) par rapport au groupe témoin, signifie la diminution de la longueur de l'intestin grêle. Cette diminution est due à l'inflammation induite par l'indométacine.

Une diminution significative de la ration p/L de l'IG a été enregistrée chez le lot traité par la combinaison (FR : TP+P), lot traité par le sulfasalazine ($p<0.01$), lot traité par les extraits phénoliques TP et P, et significative chez le lot traité par l'huile essentielle ($p<0.05$) de *Teucrium polium* (H) par rapport au lot non traité, durant le stade chronique (TH, C et PRV). Ceci se manifesta par un rétablissement significatif de la longueur de l'intestin grêle (Fig.66).

Durant le stade aiguë (Fig.66), on note une diminution significative de la ration P/L de l'IG chez le groupe traité par le sulfasalazine (TC) ($p<0.01$), significative chez le lot traité par la combinaison des extraits phénoliques (FR : TP+P) ($p<0.01$) et le lot traité par le corticoïde (TB) ($p<0.05$), et une diminution non significative chez le lot traité par les extraits acétoniques TP et P, et le lot traité par le métronidazole (TA).

Alors que, aucune variation significative n'a été observée dans la ration p/L du colon chez tous les groupes par rapport témoin. Cependant une augmentation significative de la ration p/L de colon chez les groupes non traités (groupe Indo) dans le stade chronique de l'inflammation intestinale par rapport aux témoins.

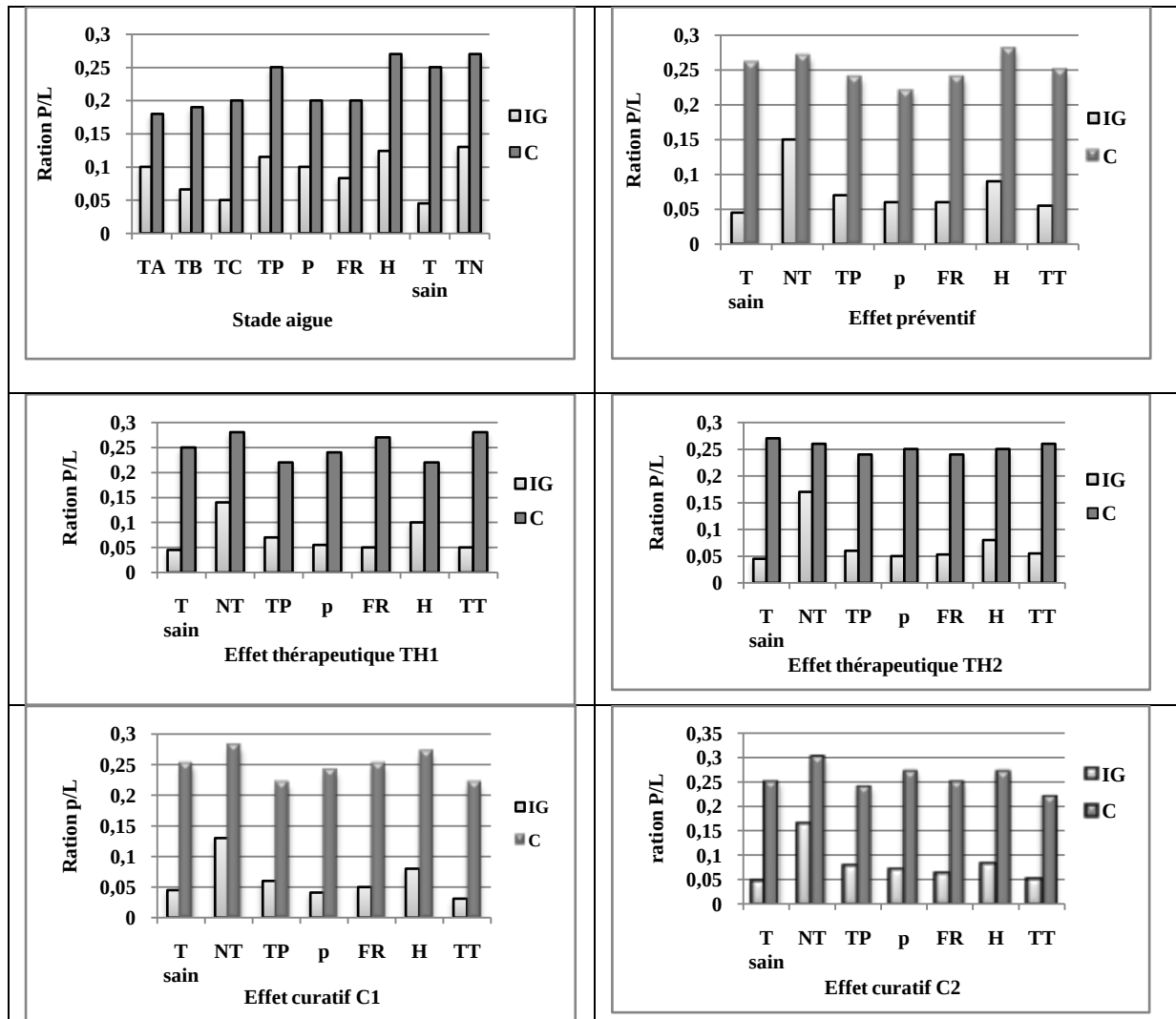
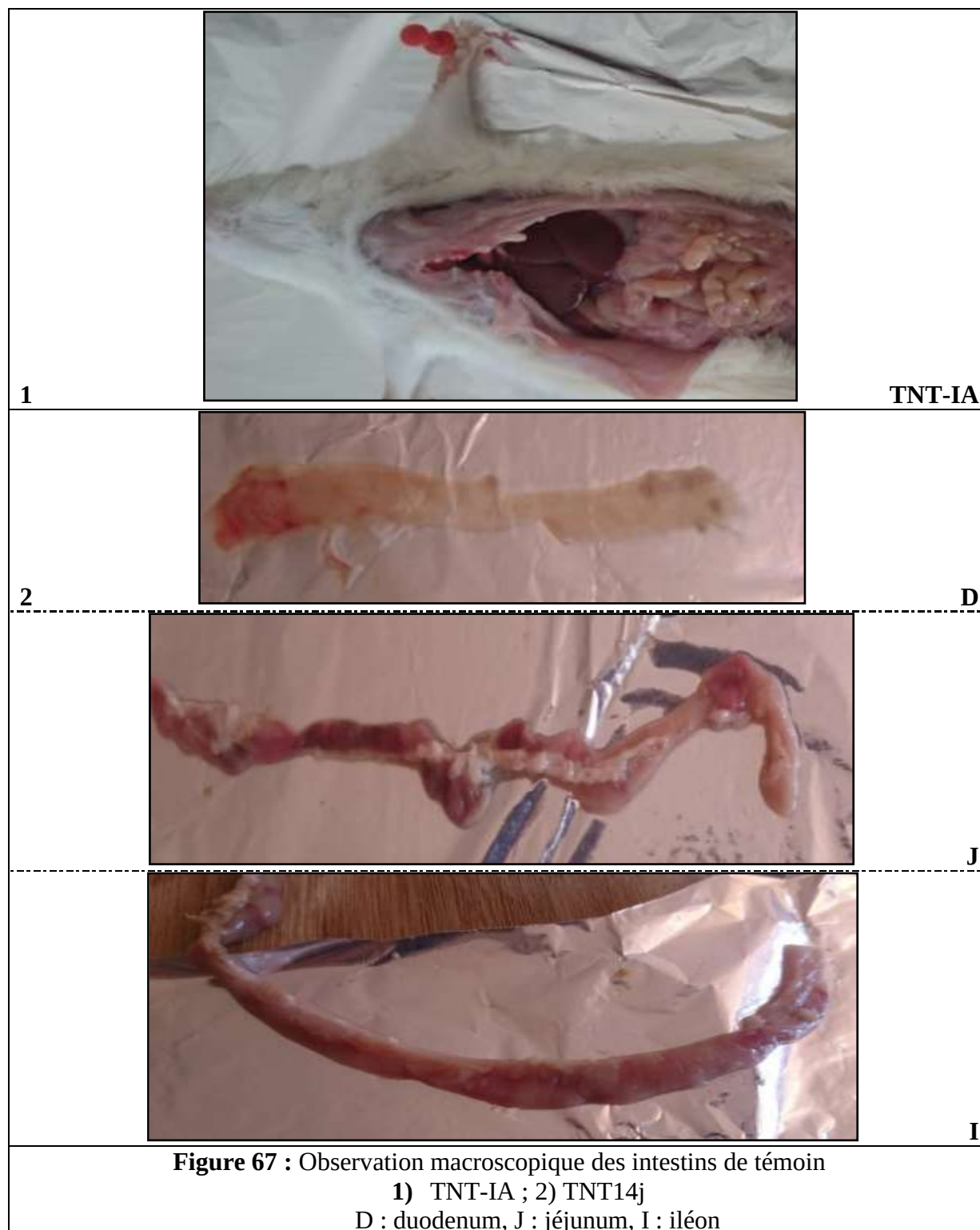


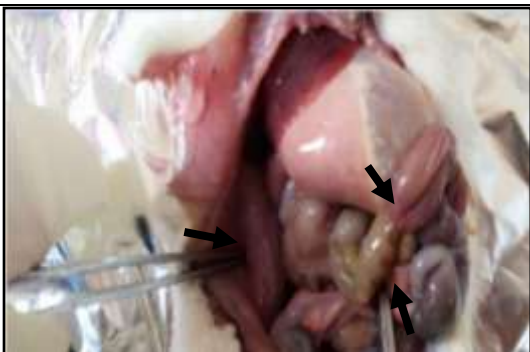
Figure 66 : Effet de différents traitements sur la ration P/L des intestins

IG : intestin grêle, C : colon, P : extrait acétonique de grenade, H : huile essentielle de *Teucrium polium* L., TP : extrait acétonique de *Teucrium polium* L., FR : la combinaison P+TP, TA : métronidazole, TB : corticoïde, TC ou TT : sulfasalazine.

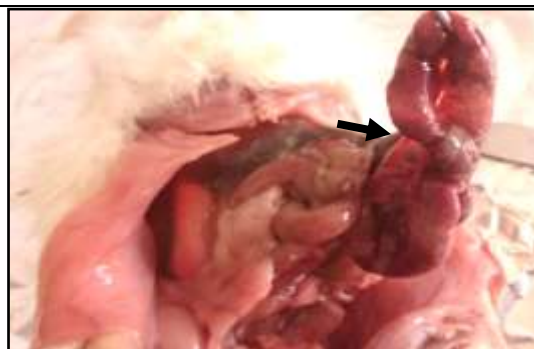
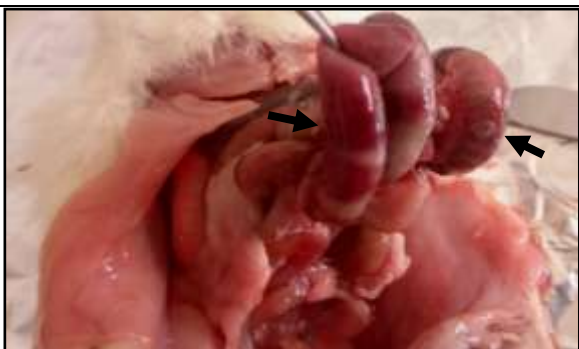
Cependant, l'administration de l'indométacine a produit une inflammation sévère dans l'intestin du rat (Arndt *et al.*, 1999 ; Jagtap *et al.*, 2011 ; Holgersen *et al.*, 2014; Vemu *et al.*, 2016). Ces dommages sont traduits ; par le changement de la longueur de l'intestin, du poids et l'épaisseur de l'intestin en raison des ulcérations, nécrose, et l'inflammation de la muqueuse intestinale (Menozzi *et al.*, 2011 ; Abimosleh *et al.*, 2013 ; Vemu *et al.*, 2016). La partie médiane de l'intestin grêle, à savoir le jéjunum et l'iléon est la plus touchée par rapport à la partie proximale de l'intestin grêle. Des taches hémorragiques et de nécrose ont été trouvées dans le caecum. L'iléon présentait de nombreuses lésions (ulcération, occlusion). Chez certains animaux, on a trouvé des lésions hémorragiques dans le gros intestin (Fig.67, 68, 69).

Il y a suggéré que le MC peut affecter l'ensemble du tube digestif (**Ordas *et al*, 2013; Baumgart & Sandborn, 2012**), mais 96% des patients MC présentent des lésions dans l'iléon et / ou le côlon (**Thia *et al*, 2010; Holgersen *et al.*, 2014**).

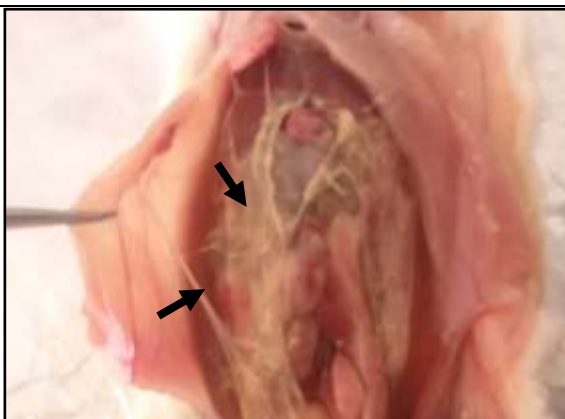




occlusion intestinale /péritonite/ ulcération



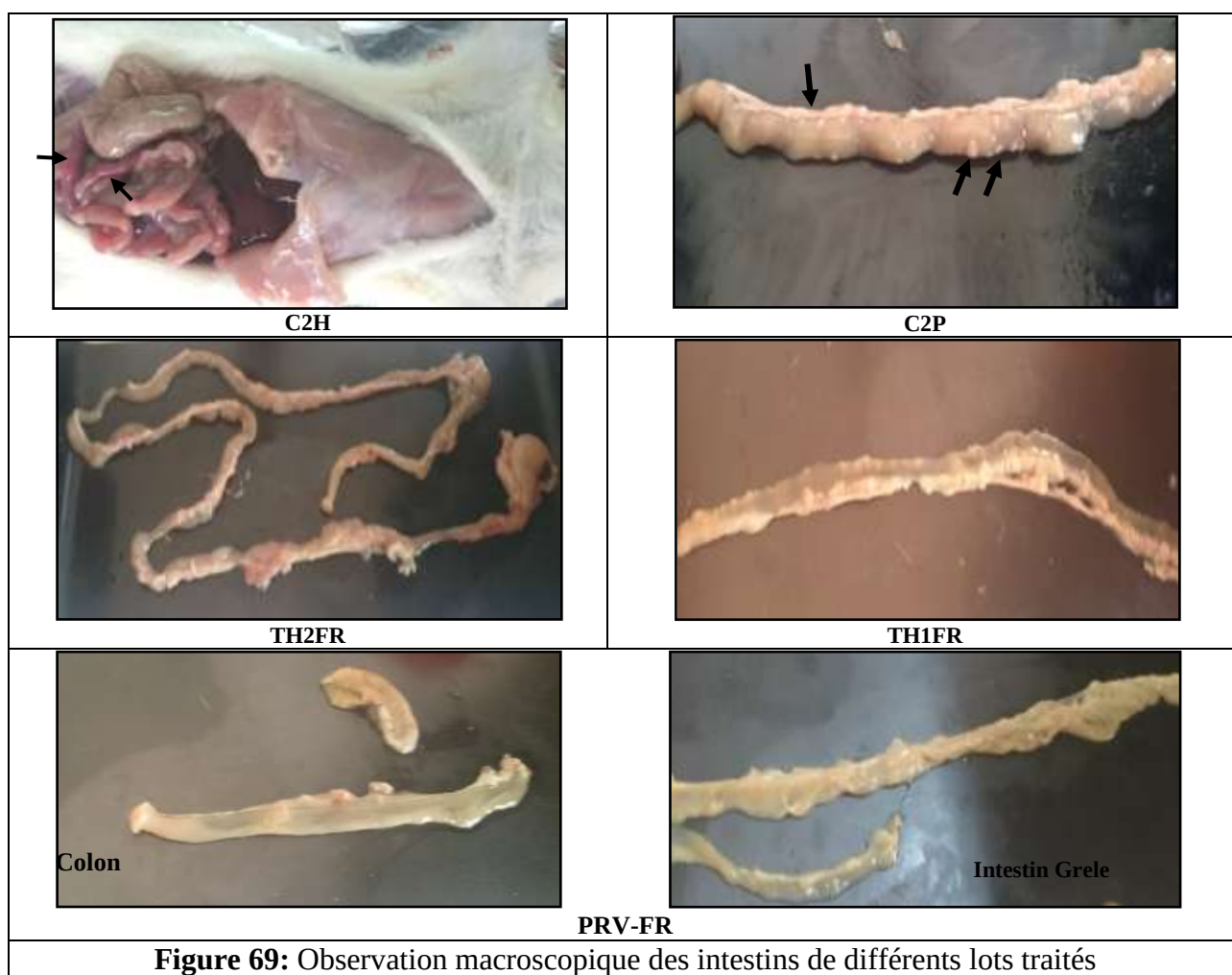
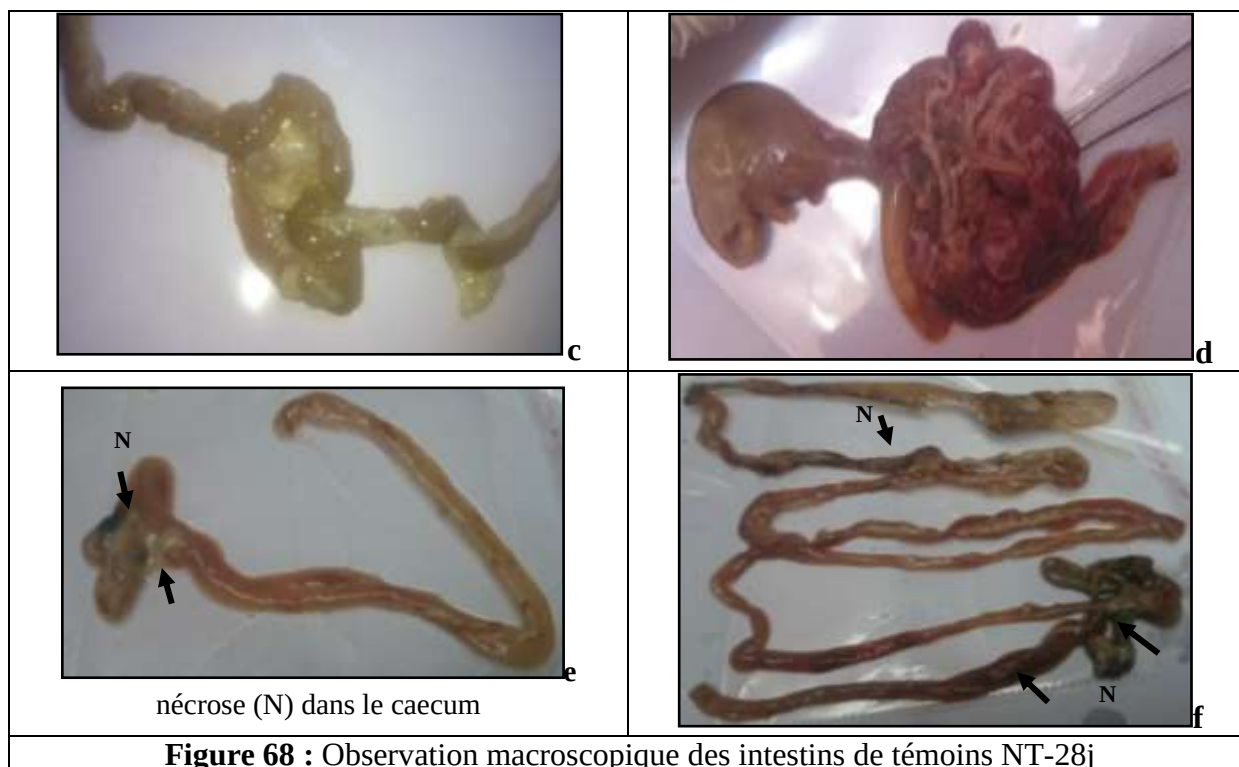
Inflammation du colon



Manifestation extra-intestinale : inflammation du péritoine



Occlusion intestinale



6.1.3. Analyses sanguines

D'après nos résultats obtenus, on observe qu'il y a une augmentation significative des globules blancs, et une diminution significative ($P \leq 0,05$) des érythrocytes, des plaquettes, de l'hémoglobine et de l'hématocrite chez les groupes non traités (NT : groupe Indo), en comparaison avec lot témoin.

Cependant, le traitement avec les différents extraits pendant (effet thérapeutique), avant (effet préventif) et après (effet curatif) l'induction de l'inflammation par l'indométacine a réduit le nombre des globules blancs par rapport aux groupes non traités (Tab.22).

Plusieurs travaux ont suggéré que le taux de GR, hémoglobine et hématocrite diminué, et le taux de GB augmenté durant l'inflammation intestinale (Gonçalves *et al.*, 2013 ; Oliveira *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2016).

L'augmentation des leucocytes pourrait indiquer la migration de ces cellules vers le site inflammatoire durant l'inflammation, qui se caractérise par une colonisation rapide de la muqueuse colique par les PNN (Roitt *et al.*, 2002 ; SerTEYN *et al.*, 2003 ; Hall *et al.*, 2011).

L'inflammation intestinale chronique provoque une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoire causant des dommages à la muqueuse intestinale, ce qui entraîne une perte sanguine intestinale récurrente et une anémie. Ces cytokines contribuent également à l'anémie inflammatoire (Gasche *et al.*, 2004 ; Weiss *et al.*, 2005) par la perturbation du métabolisme du fer et par la suite la perturbation de l'érythropoïèse (Nemeth *et al.*, 2004).

Tableau 22 : Variation de quelques paramètres sanguins

A. Stade Aigue

IA	T sain	NT	H	FR	P	TP	TA	TB	TC
GR ($\times 10^6/\text{ml}$)	5,69 $\pm 2,01$	4,99 $\pm 2,88$	5,60 $\pm 0,54$	5,34 $\pm 0,43$	6,07 $\pm 0,17$	6,16 $\pm 0,46$	5,31 $\pm 0,17$	5,51 $\pm 0,69$	5,29 $\pm 0,29$
GB ($\times 10^3/\text{ml}$)	6,35 $\pm 2,71$	8,76 $\pm 0,17$	7,3 $\pm 1,15$	7,51 $\pm 0,49$	7,25 $\pm 2,12$	8,12 $\pm 2,25$	7,66 $\pm 0,57$	6,8 $\pm 0,14$	7,1 $\pm 1,27$
Hémoglobine (g/ml)	16,64 $\pm 2,12$	14,18 $\pm 2,33$	14,31 $\pm 1,71$	15,02 $\pm 0,31$	14,9 $\pm 0,14$	14,93 $\pm 1,42$	17,11 $\pm 0,57$	17,10 $\pm 2,19$	15,55 $\pm 0,31$
Hématocrite %	49 $\pm 2,1$	44,33 $\pm 5,61$	50 ± 0	49 $\pm 1,41$	50 ± 0	52 $\pm 4,47$	50 ± 0	49 $\pm 1,41$	49 $\pm 1,41$
Plaquette ($\times 10^3/\text{ml}$)	390 $\pm 20,51$	290 $\pm 69,76$	366,66 $\pm 15,27$	372,5 $\pm 38,89$	410 $\pm 14,14$	419 $\pm 34,16$	325 $\pm 43,30$	350 $\pm 42,42$	340 $\pm 56,56$
CRP (mg/ml)	5 $\pm 1,21$	7,22 $\pm 1,01$	5,33 $\pm 0,57$	5,13 $\pm 0,31$	5 ± 0	6,52 $\pm 1,60$	5,15 $\pm 0,25$	6,37 $\pm 1,94$	5,67 $\pm 0,95$
Albumine (g/l)	41,5 $\pm 2,5$	40,44 $\pm 1,17$	40,41 $\pm 1,42$	42,92 $\pm 1,30$	42,11 $\pm 2,20$	42,2 $\pm 2,31$	39,62 $\pm 1,19$	41,175 $\pm 0,24$	39,67 $\pm 1,87$

B. Stade chronique : effet thérapeutique

TH1	NT	T sain	TP	P	FR	H	TT
GR (x10 ⁶ /ml)	5,35 ±1,2	5,69 ±2,01	5,73 ±1,5	5,46 ±2,01	5,84 ±1,21	5,1 ±2,51	5,56 ±2,17
GB (x10 ³ /ml)	9,3 ±2,1	6,35 ±2,71	6,55 ±1,91	6,53 ±2,01	6,85 ±2,31	7,53 ±1,93	6,5 ±1,33
Hémoglobine (g/ml)	14,48 ±1,51	16,64 ±2,12	15,73 ±2,15	17 ±1,04	18,18 ±1,12	15,86 ±2,19	15,59 ±2,52
Hématocrite %	44,51 ±2,01	49 ±2,1	48,5 ±2,51	50,66 ±2,31	50 ±2,101	47 ±2,12	50 ±1,91
Plaquette (x10 ³ /ml)	375 ±24,01	390 ±20,51	350,5 ±25,22	342,33 ±27,33	320 ±41,12	375 ±42,71	300 ±40,01
CRP (mg/ml)	7,66 ±2,01	5 ±0,5	6,5 ±0,51	6,5 ±1,54	5 ±2,42	7,16 ±1,33	5,7 ±1,08
Albumine (g/l)	39,5 ±0,81	41,5 ±2,5	42,5 ±2,81	43,91 ±2,51	41 ±2,15	40 ±2,45	40 ±2,52

TH2	NT	T sain	TP	P	FR	H	TT
GR (x10 ⁶ /ml)	4,44 ±1,01	5,69 ±2,01	5,115 ±2,5	5,17 ±3,1	5,19 ±1,2	4,94 ±2,51	5,35 ±1,25
GB (x10 ³ /ml)	9,3 ±2,12	6,35 ±2,71	9,65 ±1,51	8 ±1,08	8,55 ±1,25	9,45 ±1,21	6,9 ±2,75
Hémoglobine (g/ml)	14,48 ±1,21	16,64 ±2,12	15,24 ±1,51	16,05 ±2,41	16,01 ±2,41	15,55 ±1,08	15,73 ±1,09
Hématocrite %	44,51 ±2,12	49 ±2,1	47,5 ±2,1	49,5 ±1,22	49,5 ±1,28	48 ±1,25	42,5 ±1,32
Plaquette (x10 ³ /ml)	375 ±30,12	390 ±20,51	310 ±35,12	305 ±40,33	320 ±34,1	360 ±33,24	237,5 ±41,25
CRP (mg/ml)	8,1 ±2,1	5 ±0,7	6,85 ±0,5	6,22 ±1,21	6,12 ±2,11	6,92 ±2,01	6 ±0,5
Albumine (g/l)	38,75 ±1,21	41,5 ±2,5	40,42 ±2,1	40,85 ±1,8	42,37 ±2,8	40,35 ±1,5	41,5 ±2,1

C. Stade chronique : effet curatif

C1	NT	T sain	TP	P	FR	H	TT
GR (x10 ⁶ /ml)	4,96 ±0,15	5,69 ±2,01	5 ±0,28	5,35 ±0,35	5,34 ±0,05	5,44 ±0,25	5,35 ±0,17
GB (x10 ³ /ml)	10,45 ±0,49	6,35 ±2,71	9,3 ±0,28	9,45 ±0,77	8,4 ±0,84	9,66 ±0,77	5,33 ±0,57
Hémoglobine (g/ml)	14,44 ±0,47	16,64 ±2,12	16,25 ±0,87	16,15 ±1,54	15,55 ±11,65	16,37 ±11,43	15,69 ±0,57
Hématocrite %	47,66 ±1,52	49 ±2,1	48,5 ±2,12	50 ±1,10	50 ±0,9	50 ±0,82	50 ±1,102
Plaquette (x10 ³ /ml)	313,33 ±23,09	390 ±20,51	375 ±141,42	352,5 ±74,24	320 ±50,81	440 ±49,49	366,66 ±43,30
CRP (mg/ml)	7,66 ±0,57	5 ±0,7	6,5 ±0,70	6,85 ±0,14	6,25 ±0,35	7,075 ±0,10	5 ±0,25
Albumine (g/l)	39,33 ±0,57	41,5 ±2,5	41,175 ±1,66	41 ±1,41	41 ±0,35	42,5 ±0,70	39 ±1,19

C2	NT	T sain	TP	P	FR	H	TT
GR (x10 ⁶ /ml)	4,77 ±0.21	5,69 ±2,01	5,46 ±0.41	5,49 ±0.11	5,56 ±0.45	4,9 ±0.41	5,56 ±2,07
GB (x10 ³ /ml)	9,5 ±1	6,35 ±2,71	8,13 ±1.55	7,625 ±0.89	6,86 ±0.57	8,13 ±0.28	7,2 ±1,15
Hémoglobine (g/ml)	14,73 ±0.77	16,64 ±2,12	17,02 ±1.30	18,01 ±0.35	17,72 ±1.74	17,51 ±1.64	15,24 ±2,07
Hématocrite %	45,5 ±2.51	49 ±2,1	49,33 ±1.15	50 ±0	50 ±0	49,66 ±0.57	47 ±2,21
Plaquette (x10 ³ /ml)	350 ±34.64	390 ±20,51	418,33 ±50.08	386,66 ±41.54	410,66 ±51.73	421,66 ±50.08	265 ±45,12
CRP (mg/ml)	8,2 ±4.61	5 ±0,7	6,5 ±3.78	6,38 ±0.53	5,9 ±0.88	7,2 ±1.77	6,5 ±1,12
Albumine (g/l)	38,5 ±1.52	41,5 ±2,5	42 ±2	43 ±3.60	42,58 ±2.40	44,08 ±2.69	40,5 ±2,18

D. Stade chronique : effet préventif

PRV	T sain	NT	TP	P	FR	H	TT
GR (x10 ⁶ /ml)	5,69 ±2,01	4,9 ±0.15	5,165 ±0.09	5,06 ±0.12	5,11 ±0.12	4,79 ±0.7	5,55 ±0.38
GB (x10 ³ /ml)	6,35 ±2,71	9,1 ±0.49	8,65 ±0.07	8,15 ±0.91	7,87 ±1.16	8,8 ±0.28	6,59 ±2.68
Hémoglobine (g/ml)	16,64 ±2,12	14,93 ±0.47	16,19 ±0.11	15,675 ±0.26	16,26 ±0.01	14,91 ±0.02	15,73 ±0.78
Hématocrite %	49 ±2,1	44,51 ±1.52	49,5 ±0.70	48 ±1.41	50 ±0	46 ±0	44,5 ±4.24
Plaquette (x10 ³ /ml)	390 ±20,51	375 ±23.09	335 ±49.49	357 ±35.35	300 ±0	300 ±0	257,5 ±49.49
CRP (mg/ml)	5 ±0,7	7,66 ±0.57	5,67 ±0.45	4,745 ±0.55	5,87 ±0.17	5,75 ±1.06	6 ±3.53
Albumine (g/l)	41,5 ±2,5	39,5 ±0.57	42 ±0,9	41,95 ±1.13	40,17 ±0.24	41,35 ±1,15	41,5 ±0.70

GR : globule rouge, GB : globule blanc, CRP : protéine C-réactif.

Il y a une légère diminution du taux de l'albumine chez le groupe non traité avec 41,5±2,5 à 38,5±1.52 g/l (Tab.22), cette diminution pouvait s'expliquer par une fuite protéique intestinale (Thiéfin & Beaugier, 2004). kikuchi *et al.* (2019) a également trouvé une légère diminution du taux de l'albumine chez les rats souffrant de l'inflammation intestinale.

Il y'a suggéré que l'hypoalbuminémie et l'hypoglobulinémie chez les patients atteints de MC, sont des conséquences de l'augmentation de la perméabilité intestinale (Ferrante *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2012 ; kikuchi *et al.*, 2019).

Les polyphénols a réduit significativement le taux de CRP (p<0.05) par rapport l'huile essentielle (Tab.22).

La CRP a été largement utilisée en clinique comme marqueur systémique non spécifique de l'inflammation (**Bottazzi et al, 2010**) et est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus importants de la maladie de Crohn (**Peyrin-Biroulet et al, 2011**).

Les mécanismes de régulation de la synthèse de la CRP par le foie comprennent l'interleukine IL-6 en tant qu'inducteur puissant de son expression chez l'homme (**Bataille & Klein, 1992**). Le TNF- α et l'IL-6 sont les principales cytokines pro-inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux, ce qui suggère que l'inflammation au sein de la graisse mésentérique peut contribuer à une augmentation de taux de CRP dans la MC (**Desreumaux et al, 1999**). De plus, la MC est caractérisée par une perméabilité intestinale et une translocation bactérienne accrues (**Sedman et al, 1994**). La graisse mésentérique est une source importante de CRP dans la MC. La production de CRP par les adipocytes mésentériques peut être déclenchée par une inflammation locale et une translocation bactérienne vers la graisse mésentérique (**Batra et al, 2009 ; Peyrin-Biroulet et al, 2011**).

Il est connu que l'injection d'indométacine supprime la production de PGE2 dans l'intestin grêle et induit la production de TNF- α et d'IL-6 (**Nandi et al., 2010 ; Kume et al, 2014**). D'après les études de **Dervis et al (2015) et Kume et al (2014)**, aucune augmentation des concentrations sanguines de cytokines n'a été observée. Cependant, ils y ont eu une augmentation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 dans l'iléon chez les animaux souffrant une inflammation intestinale induite par l'indométacine.

Les produits issus de *P. granatum* sont susceptibles d'inhiber l'activation de NF- κ B et par conséquent, empêcher l'expression et la production des cytokines inflammatoires IL1- β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23 et TNF- α (**Hayden & Ghosh, 2008; Shih et al. 2011; Ismail et al. 2012**).

Teucrium a réduit l'activité MPO colique et les concentrations de TNF- α et IL-1 β , chez les rats atteints de colite induite par TNBS (**Abdolghaffari et al., 2010**).

Il a été indiqué que 500 mg / kg p.c. de l'extrait éthanolique de *T. polium* a produit une inhibition significative de l'inflammation induite par la carraghénine chez le rat ($p < 0,05$) (**Tariq et al., 1989**). Les auteurs ont conclu que la présence de flavonoïdes et de stérols pourrait être responsable de l'activité anti-inflammatoire de cette plante.

Il y a suggéré que l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *T. polium* pourrait être médié par la dégradation oxydative de l'O₂ et du HOCl dans les phagocytes (**Passos et al., 2007 ; Menichini et al., 2009 ; Bahramikia & Yazdanparast, 2012**).

6.2. Masse relative des organes (ROW)

Le poids relatif des organes renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier.

Les résultats obtenus (Fig.70) montrent une augmentation significative du poids relatif de la rate, le foie et les intestins (intestins grêle et le colon) chez le groupe non traité par rapport au groupe témoin ($p < 0.001$), par ailleurs, on note une légère amélioration du poids relatif de certains organes chez le groupe traité par la combinaison (FR :P+TP) comparativement avec le groupe traité par l'extrait acétonique de *Punica granatum* (P), l'extrait acétonique de *Teucrium polium* (TP), l'huile essentielle (H) de *Teucrium polium*.

L'augmentation du poids relatif d'un organe peut être liée à une congestion par résorption du sang dans le tissu, l'hypertrophie tissulaire (**Rasekh et al., 2008**) ou par la présence d'un infiltrat inflammatoire (**Betti et al., 2012**).

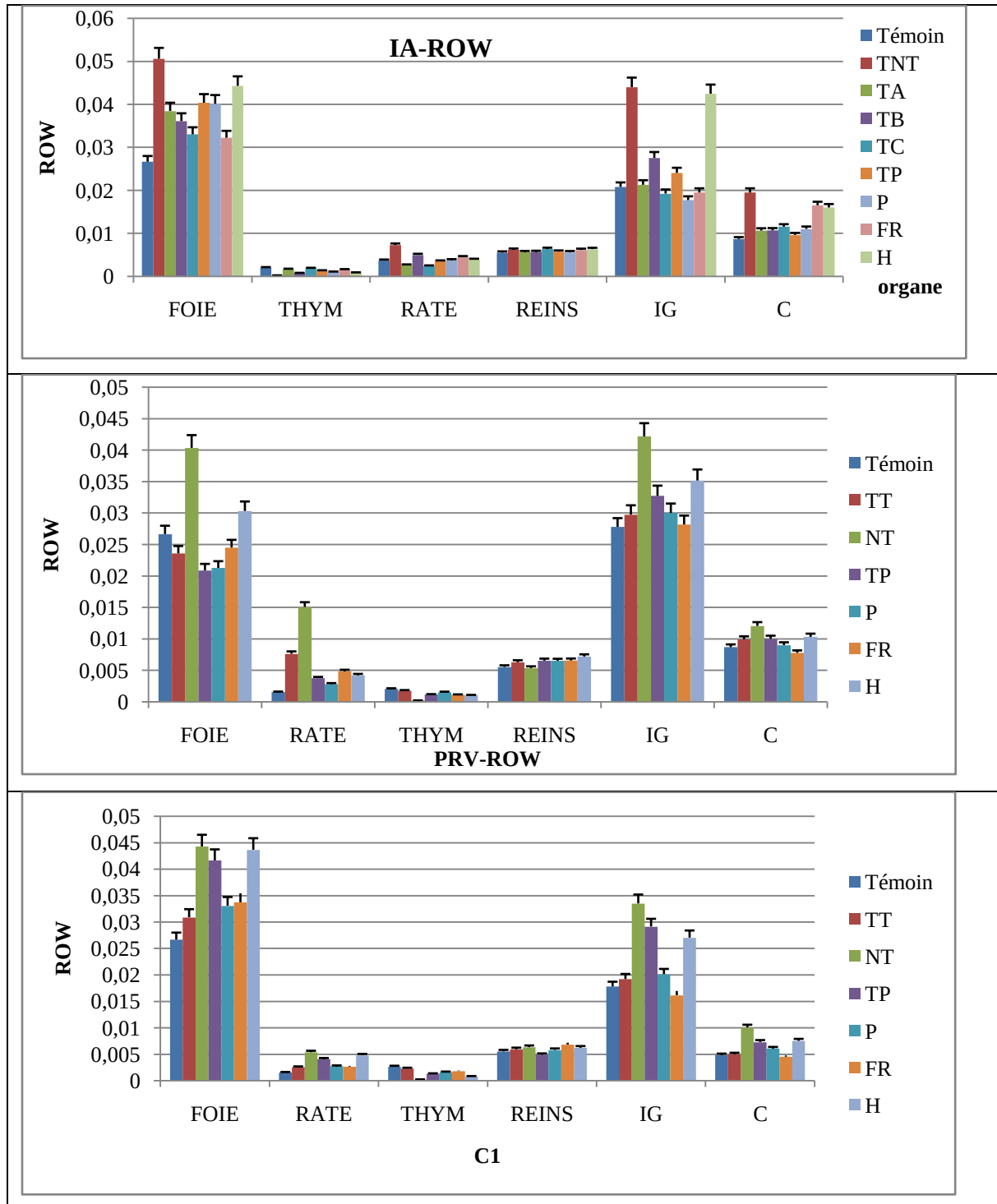
L'augmentation du poids de l'intestin et la réduction de poids corporel de rat traité avec indométacine augmentaient la masse relative de l'intestin (**Vemu et al., 2016**). Cette variation est due à des dommages intenses résultants par l'inflammation.

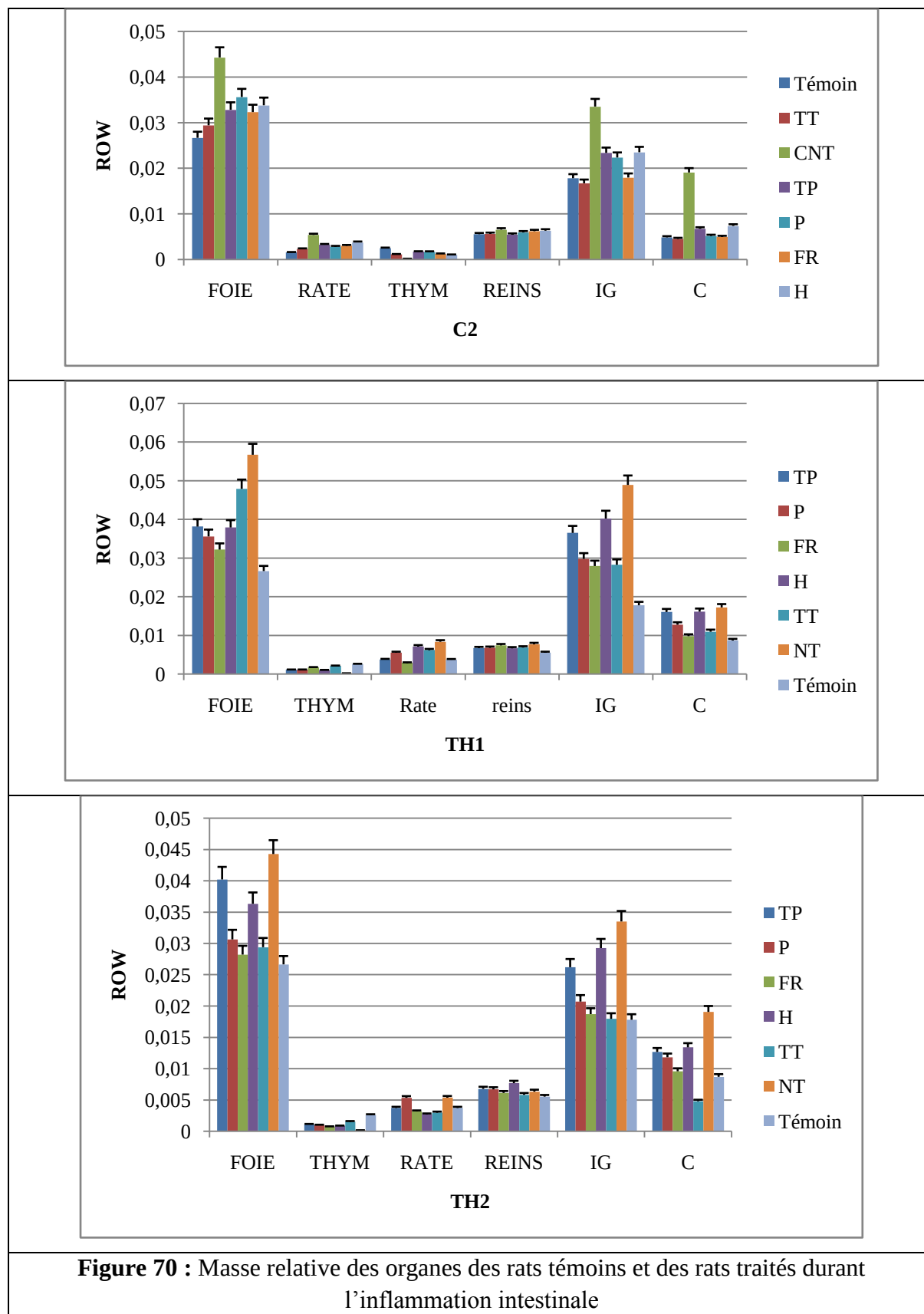
De plus, l'augmentation de poids de l'intestin et du côlon, peuvent avoir représenté par une hyperémie et un œdème des muqueuses, sous-muqueuses ou musculaires, potentiellement associés à une infiltration de cellules inflammatoires et à l'exsudat, ce qui entraînerait probablement une augmentation du poids gastro-intestinal (**Abimosleh et al., 2013**).

La rate est un organe immunitaire périphérique avec une grande variété de cellules immunitaires; il est connu qu'un certains d'infections et de maladies peuvent contribuer à une hypertrophie du tissu splénique (**Pillarisetty et al, 2004 ; Da Silva et al, 2016**).

Ainsi, une augmentation du poids de la rate est généralement corrélée avec le degré d'inflammation et de l'anémie dans le modèle colite induite par le DSS (**Chassaing et al, 2014 ; Zhang et al., 2015 ; Da Silva et al, 2016**). En effet, le poids de thymus a diminué (**Filaretova et al. 2011; Abimosleh et al., 2013**).

En outre, l'augmentation du poids de la rate après l'administration d'indométacine doit être poursuivie en relation avec la diminution du poids du thymus. Ces études pourraient déterminer la contribution de la régulation des lymphocytes T (CD4 + et CD8 +) et B dans le thymus et la rate, respectivement (**Abimosleh et al., 2013**).





6.3. Statut stress oxydatif

Il a été bien documenté que l'infiltration de neutrophiles conduit à la production d'anion superoxyde et à l'initiation d'une cascade pour la production de diverses espèces réactives, qui contribuent de manière significative à la progression de la nécrose tissulaire (**Wera et al, 2016 ; Bennike et al, 2015**).

L'intestin a de faibles mécanismes de défense contre le stress oxydatif (**Vemu et al., 2016**). Plusieurs rapports suggèrent que les niveaux des antioxydants ont été diminués chez les animaux souffrant de l'inflammation intestinale induite par l'indométacine, et le MDA a été augmenté (**Pozzoli et al, 2006 ; Menozzi et al, 2011 ; Vemu et al, 2015 ; 2016**).

Les niveaux élevés de MDA indiquent des espèces réactives d'oxygène (ROS) plus élevées dans les tissus gastro-intestinaux (**Singh et al., 2016**).

Il est bien connu que SOD, CAT, GPx et GR jouent un rôle important comme enzymes de protection contre la peroxydation des lipides dans les tissus. En particulier, la SOD et la CAT sont considérées comme des enzymes primaires car elles sont impliquées dans l'élimination directe des espèces réactives de l'oxygène. Cependant, la CAT et la GPx catalysent la transformation de H_2O_2 en sous-produits sans danger pour empêcher la destruction cellulaire. Pendant le piégeage de H_2O_2 , le GSH est oxydé en glutathion oxydé par l'enzyme GPx (**Pandurangan et al ,2015**).

La figure 71 représente le statut du stress oxydatif chez les différents lots traités et non traité durant les différents stades de l'inflammation. Le MDA a augmenté et le niveaux des enzymes antioxydants (CAT et SOD) a diminué chez les rats non traité (groupe Indo) par rapport au témoin.

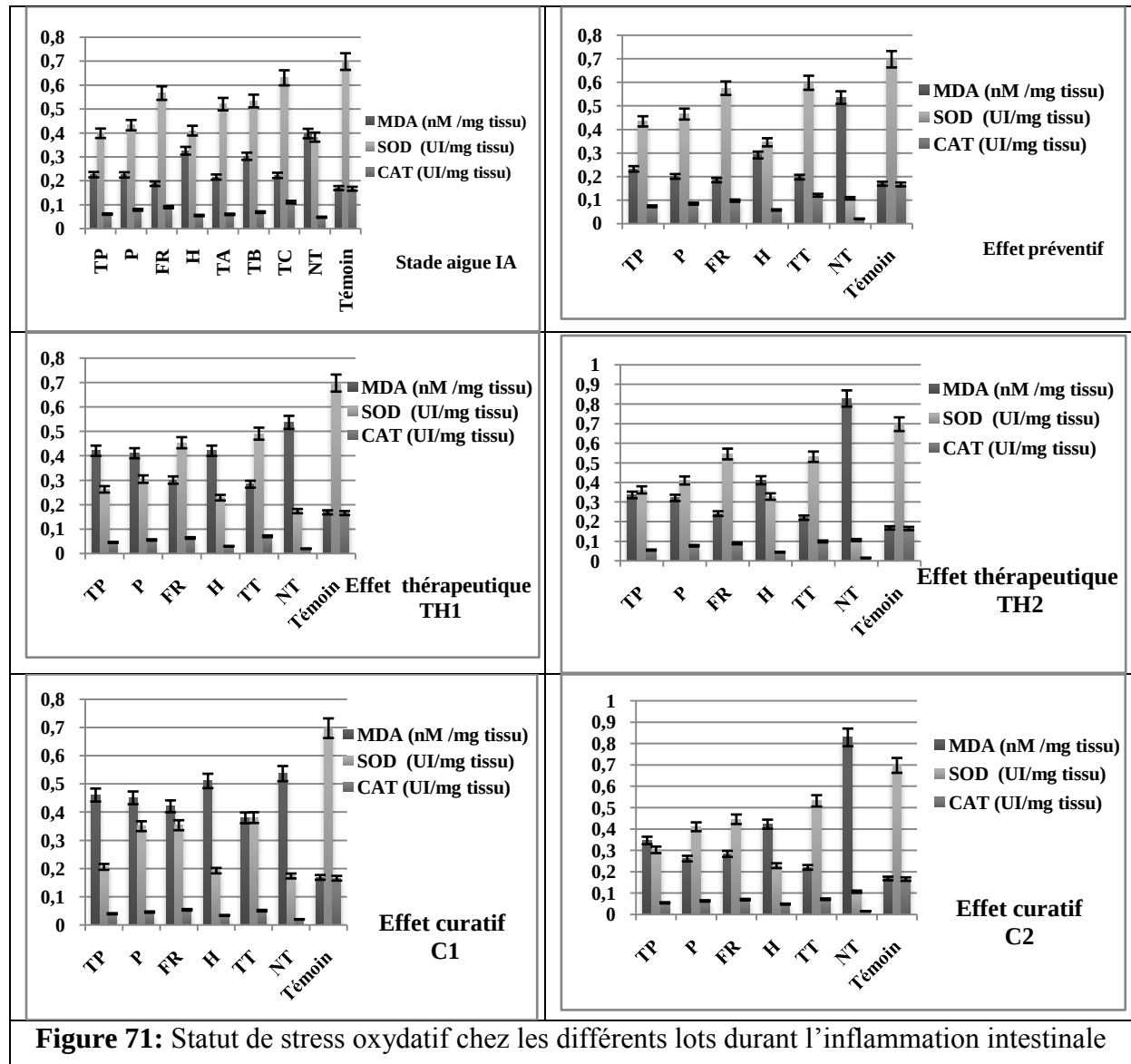


Figure 71: Statut de stress oxydatif chez les différents lots durant l'inflammation intestinale

Cependant, on note une amélioration du statut oxydatif chez les rats traités par métronidazole (ATB) par rapport le corticoïde, **Holgersen et al (2014)** a signalé que le prednisolone n'a provoqué aucune atténuation de la colite chez les souris (PAC IL-10 k.o.), et en général le traitement par corticostéroïdes oraux semble moins efficace dans les modèles de MICI (**Sha et al, 2013**). Alors que le métronidazole (**Freeman et al., 1997**) réduit l'inflammation (**Colucci et al., 2018**).

Le taux de MDA a diminué significative chez les rats traités par le mélange des extraits phénoliques (Fr : TP+P) et le sulfasalazine ($p < 0.01$), et l'extrait acétonique de *Punica granatum*, et de *Teucrium polium* ($p < 0.05$), et non significative par l'huile essentielle de TP. Cependant le niveaux des enzymes antioxydants a augmenté significatif chez les rats traités par les extraits phénoliques ($p < 0.01$).

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de montrer que la consommation du mélange des extraits phénoliques (Fr : TP + P) et les extraits phénoliques individuels avant et pendant l'induction de l'inflammation par l'indométacine, pouvait moduler les altérations macroscopiques de l'intestin, les populations immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire ainsi que le stress oxydant associé.

L'effet protecteur et thérapeutique des extraits phénoliques est probablement dû à sa richesse en biomolécules actives : les flavonoïdes et les tanins.

D'après l'analyse chromatographique, on a identifié de flavonoïdes (catéchine, l'épicatéchine, le kaempférol glucoside, le kaempférol, la quercétine, le myricétine, les procyanidines, l'épigallocatechine gallate) et l'acide gallique dans l'extrait acétonique de *P. granatum*, et dans l'extrait acétonique de *Teucrium polium*, on a également détecté la présence de flavonoïdes (l'épicatéchine gallate, le kaempférol glucoside, le kaempférol, la quercétine, les procyanidines, l'épigallocatechine, et l'épigallocatechine gallate), de l'acide caféique et de resvératrol (stilbènes).

Les bénéfices thérapeutiques des catéchines sont médités par la glutathion peroxydase, le glutathion et par la régulation négative des cellules immunitaires du système inné et induit et de leurs voies de signalisation associées (NF-kB, MAPK) (**Fan et al, 2017 ; Hoensch & Weigmann, 2018**).

Une consommation alimentaire régulière d'extrait de thé vert (épigallocatechine gallate) réduit les dommages à l'ADN et augmente la capacité antioxydante du plasma sanguin (**Ellinger et al, 2011 ; Hoensch & Weigmann, 2018**). Dans une étude de **Najafzadeh et al (2009)**, les flavonoïdes, en particulier la quercétine et l'épicatéchine, inhibent la puissance des dommages à l'ADN du à H₂O₂ et quinoléine (IQ) dans des lymphocytes isolés de patients atteints de MICI.

Néanmoins, la capacité antioxydante des extraits ont été confirmé *in vitro* par le profil de piégeage des radicaux DPPH et la réduction de fer.

Il est établi que la sulfasalazine agit sur le gène NF-kB (Nuclear Factor Kappa B) et il a une activité anti-inflammatoire et antioxydante (**Vemu et al., 2016**).

L'étude **Pandurangan et al (2015)** a montré que l'acide gallique (AG) augmentait les niveaux d'antioxydants enzymatiques chez les souris souffrant l'inflammation colique induite

par le DSS, et réduit le niveau de MDA. Par conséquent, l'AG peut renforcer le système de défense enzymatique et réduire les radicaux libres pour atténuer ultérieurement l'inflammation, et réduire la sévérité des lésions de la muqueuse du côlon.

Teucrium a réduit les concentrations de peroxydes lipidiques cellulaires chez les rats atteints de colite induite par TNBS (**Abdolghaffari et al., 2010**). Le prétraitement par 200 mg / kg p.c de *T. polium* avec la Vitamine C (250 mg / kg) par gavage, pendant 7 jours, a montré leur capacité à se protéger des dommages oxydatifs (peroxydations lipidiques et diminution des enzymes antioxydantes: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx)) et des changements biochimiques (marqueurs hépatiques et rénaux sériques)) induits par l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité chez le rat, par le carbone tétrachlorure (CCl₄) (**Rahmouni et al, 2019**). **Mahmoudabady et al. (2018)** a montré que l'administration de l'extrait hydroalcoolique de *T. polium* a provoqué une augmentation significative des antioxydants endogènes du myocarde (SOD, CAT, Thiol) et une réduction de la peroxydation lipidique (stress induit par une lésion ischémique-reperfusion).

Il a été signalé que la grenade et ses composants inhibent les dommages à l'ADN, l'extrait de grenade (400, 600 et 800 mg / kg pc) a significativement réduit les dommages à l'ADN induits par le cyclophosphamide chez la souris avec une augmentation concomitante des enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase, catalase, la glutathion S-transférase (**Dassprakash et al, 2012 ; Turrini et al, 2015**).

6.4. Translocation bactérienne

Il y a de plus en plus d'arguments en faveur d'un rôle clé du microbiote dans l'homéostasie intestinale et dans la pathogénie des MICI (**Seksi, 2010**).

Les figures 72, 73, 74, 75 et 76 représentent la translocation bactérienne (TB) vers les différents organes pendant le stade chronique de l'inflammation intestinale. On note une déséquilibre de la flore intestinale dans les intestins (la dysbiose) et le phénomène de la TB était abondante dans les différents organes internes : foie, rate, et les reins chez le groupe non traité (groupe Indo) par rapport aux témoins.

Le traitement avec les extraits phénoliques (FR, P et TP) et le sulfasalazine durant l'inflammation (effet thérapeutique), a diminué ($p < 0.05$) la translocation bactérienne. Tandis que le traitement avec les extraits phénoliques et le sulfasalazine avant l'induction de l'inflammation, a permis de moduler la TB. On remarque également une diminution

significative de l'ensemble de germes étudiés dans les organes internes chez la majorité des rats traités pendant 28j, après l'induction de l'inflammation (effet curatif).

Trois facteurs sont réputés responsables de TB : l'altération de la barrière muqueuse intestinale, l'altération de la microflore intestinale et les anomalies des défenses immunitaires. Des études ont montré que l'augmentation de la perméabilité intestinale causée par l'injection de l'indométacine, endommage la fonction de la barrière intestinale, ceci provoque la formation d'ulcères et favorise la translocation bactérienne (**Yamada et al., 1993 ; Porras et al., 2006; Kume et al., 2014**). Il a été mis en évidence une altération de la perméabilité intestinale entraînant l'augmentation de la translocation bactérienne et provoque la dysbiose (**Olivier et al., 2017 ; Putignani et al., 2016 ; Vrakas et al., 2017**).

L'analyse métagénomique a révélé que l'administration des AINS induit une augmentation de l'abondance relative des protéobactéries et Bacteroidetes, et une diminution des Firmicutes. (**Syer et al., 2015 ; Fornai et al., 2016 ; Colucci et al., 2018**), et ont suggéré que ces changements microbiens pourraient contribuer à des lésions intestinales induites par les AINS.

D'après nos résultats, on remarque un déséquilibre de la flore intestinale dans les intestins et la présence des entérobactéries dans les organes internes (le foie, la rate et les reins). Chez le groupe Indo, on a identifié quelques germes appartiennent de la famille des entérobactéries (Fig.77, annexe 8) : *E. coli* 2, *Pantoea* spp1, *Pantoea* spp4, *Salmonella* spp. , *Schegela* sp, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*.

Une surreprésentation des gamma protéobactéries et des Enterobacteriaceae (effet pro-inflammatoire) au niveau de l'épithélium et dans la *lamina propria* a été rapportée, alors que *F. prausnitzii* (effet anti-inflammatoire) est retrouvée en quantité faible dans les biopsies de patients souffrant de MC et RCH (**Lepage et al., 2011; Lopez-Siles et al., 2016; Quévrain et al., 2016**). Cependant, il y a suggéré que les bacilles à Gram négatif de la famille des Entérobactéries (notamment *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* sp), sont les bactéries les plus aptes à transloquer (**Pauwels, 2008**).

Le lipopolysaccharides (LPS), ou endotoxine, qui est un constituant de la paroi externe des bacilles à Gram négatif serait libéré par les bactéries du tube digestif dans certaines conditions pathologiques (MICI,...) et transloqué dans les capillaires intestinaux par la voie des TLR4 (**Neal et al, 2006**), puis transporté dans les organes sous l'effet de lipoprotéines et

de chylomicrons (**Vreugdenhil et al, 2003**). Il stimulerait la production de cytokines pro-inflammatoires par liaison au CD14 des cellules immunitaires (**Sweet & Hume, 1996; Olivier et al, 2017**).

Colucci et al. (2018) a signalé une expression plus élevée de TLR, associée à une activation en aval de la voie NF-kB, suggère l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la pathogenèse de l'inflammation intestinale induite par AINS. En effet, TLR-4 s'est avéré être un récepteur du LPS (composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram-négatives) tandis que TLR-2 se lie au peptidoglycane et à l'acide lipotéichoïque (principaux composants de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives).

Nandi et al (2008) a signalé qu'il est possible que la libération d'endotoxine bactérienne d'*E. coli*, puisse contribuer aux dommages intestinaux induits par Indo, par surproduction de NO, augmentant ainsi l'iNOS dans la muqueuse intestinale.

D'après nos résultats, on note également une augmentation des aérobies et des anaérobies durant l'inflammation. Ceci est en parfaite concordance avec les rapports de **Swidsinsk et al. (2002) et Gophna et al. (2005)** qui ont montré l'augmentation du taux des aérobies et des anaérobies chez les patients atteints de MC.

Alors que les lactobacilles ont diminué durant l'inflammation chez les groupes non traités par rapport aux témoins. Des études ont mis en évidence une diminution des *Lactobacillus* et des *Bifidobacteria* dans le microbiote fécal des patients atteints de MC (**Giaffer et al, 1991; Seksik et al., 2003 ; Seksi, 2010**), connus pour leur effets bénéfiques contre l'inflammation intestinale.

En effet l'augmentation du poids de la rate peut être due à la présence des bactéries transloquer, et la fonction filtre de la rate ne protège pas complètement des TB.

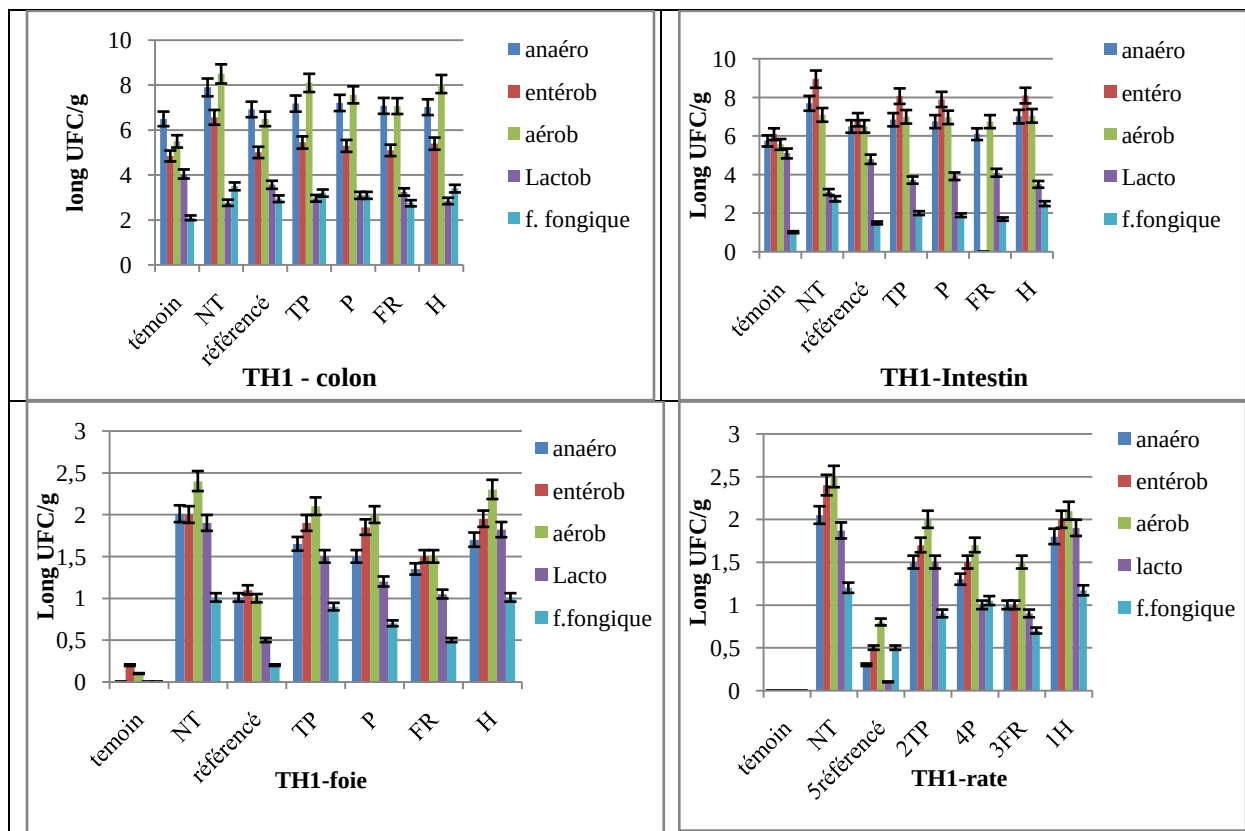
La majorité du sang veineux intestinal atteint le foie via la veine porte. En raison de ce système unique d'approvisionnement en sang, le foie est vulnérable à l'exposition de produits bactériens (molécules associés aux agents pathogènes ou PAMP) transférés de la lumière intestinale vers la circulation sanguine, lorsque les fonctions de la barrière épithéliale intestinale sont perturbées (**Wang et al, 2015**).

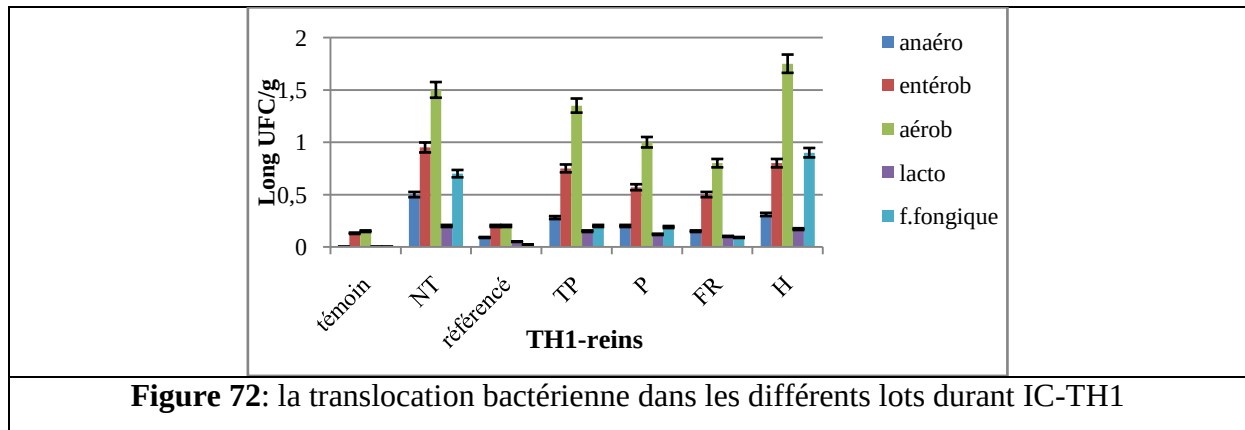
Cependant l'effet des polyphénols est assurée par plusieurs mécanismes: une protection contre les troubles gastro-intestinaux et les agents pathogènes, un renforcement des

jonctions serrées intestinales, une augmentation de la sécrétion de mucus, la stimulation des cytokines et la modulation de la réponse immunitaire (Ozdal *et al.*, 2016; Catinean *et al.*, 2018 ; Talukder *et al.*, 2019).

L'acide caféique inhibe la croissance de nombreuses bactéries pathogènes intestinales, telles que *E. coli*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp, *Clostridium* sp et *Bacteroides* sp (Lee *et al.*, 2006). Le resvératrol et l'EGCG se sont révélés capables de réduire la translocation bactérienne, l'EGCG réduisait la translocation bactérienne en augmentant la barrière immunologique (induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens) (Wan *et al.*, 2016 ; Ling *et al.*, 2016).

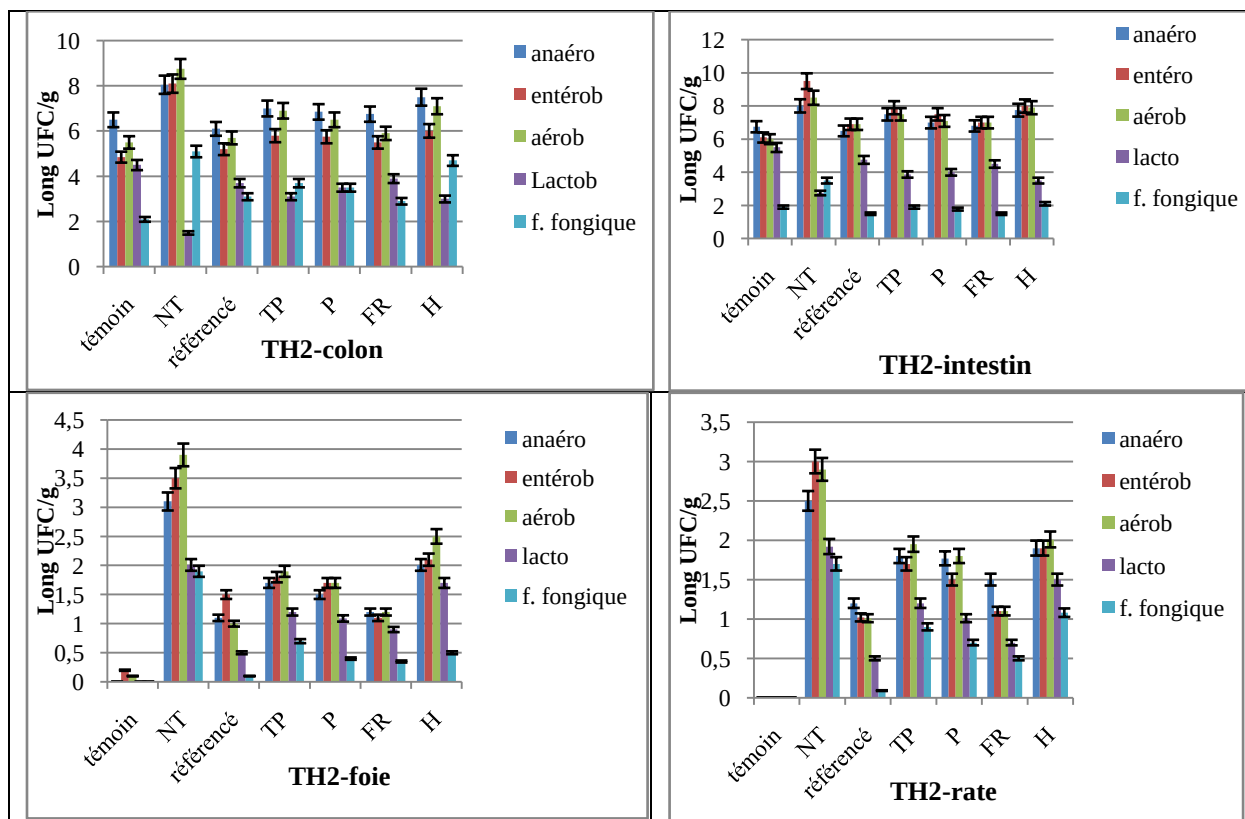
Le sous-groupe des flavonoïdes, quercétine, myricétine et kaempférol, améliore l'intégrité de la barrière dans les cellules intestinales Caco-2 (Suzuki, 2013). La quercétine augmente la résistance électrique transépithéliale (TER; l'un des paramètres les plus courants utilisé pour évaluer la perméabilité intestinale) et réduit le flux paracellulaire à travers les monocouches Caco-2 de manière dose-dépendante (Amasheh *et al.*, 2008 ; Suzuki & Hara, 2009).

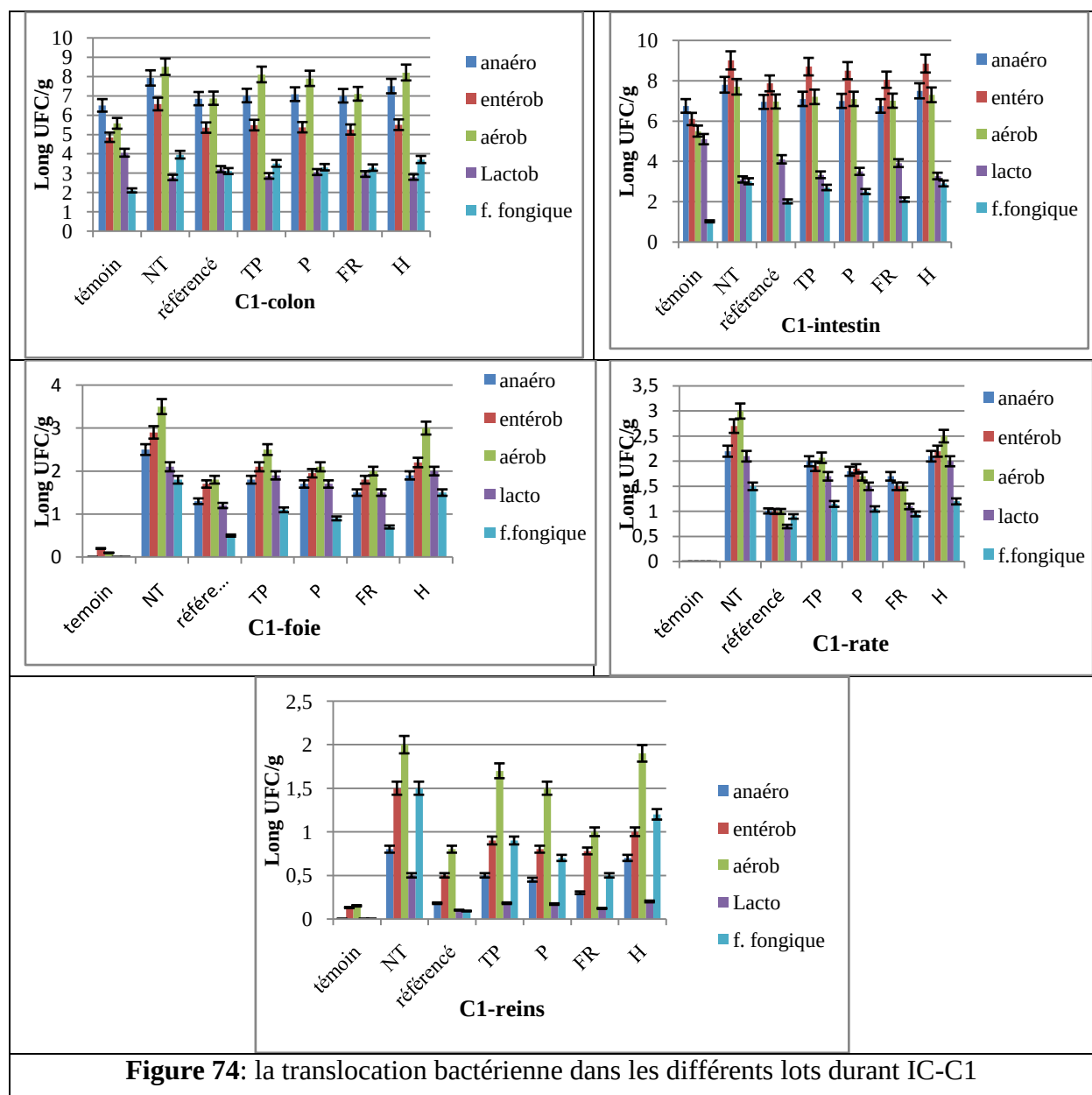
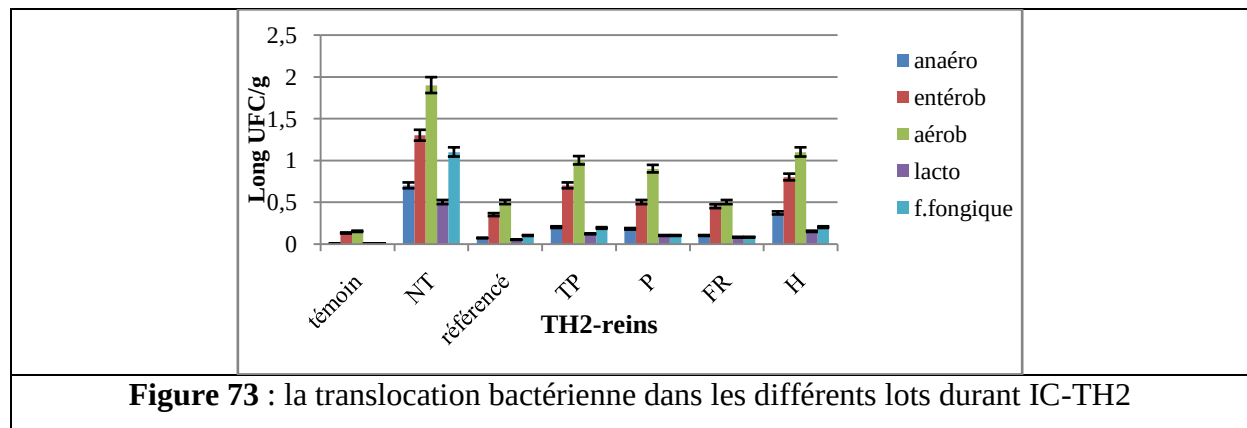




Donder et al. (2017) a trouvé que la fréquence de translocation bactérienne était significativement augmentée dans les cultures d'échantillons de sang et d'échantillons de foie, de rate et de ganglions lymphatiques mésentériques dans le groupe atteints colite. *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp. et *K. pneumoniae* ont été observés pour impliquer dans la translocation bactérienne. Il a signalé que la diminution de la translocation bactérienne était plus importante chez le groupe recevant 5 mg / kg / jour de quercitrine.

De plus, plusieurs travaux ont signalé l'effet antimicrobien de *P. granatum* (Mahboubi et al, 2015 ; Elatki et al, 2019) et celle de *T. polium* (Kerbouche et al, 2015 ; Elmasri et al, 2016 ; Daghbouche et al, 2018).





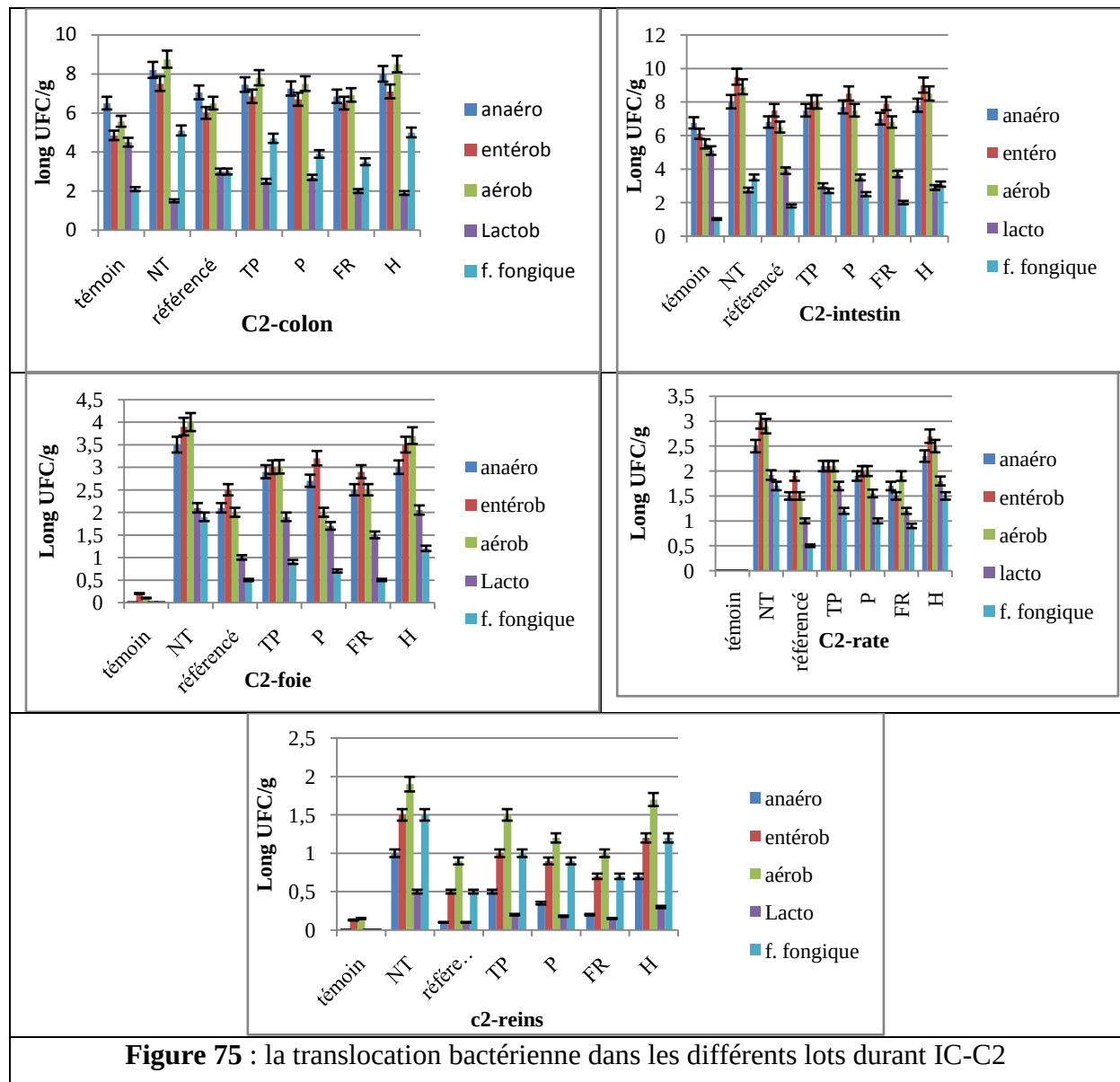
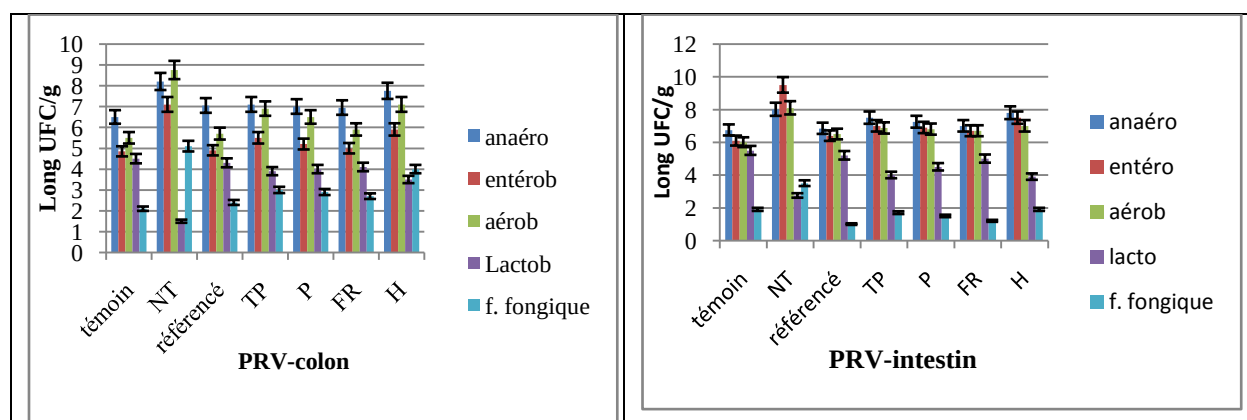


Figure 75 : la translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-C2



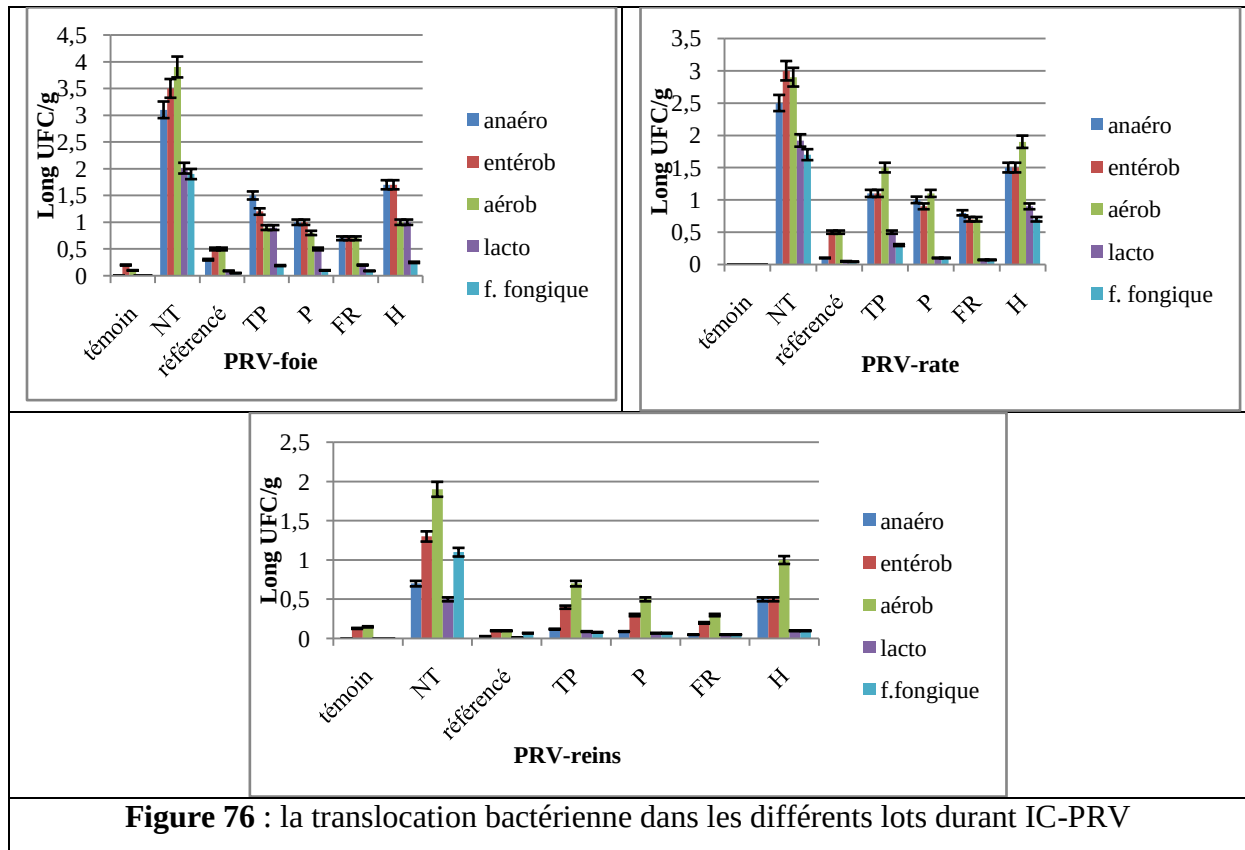
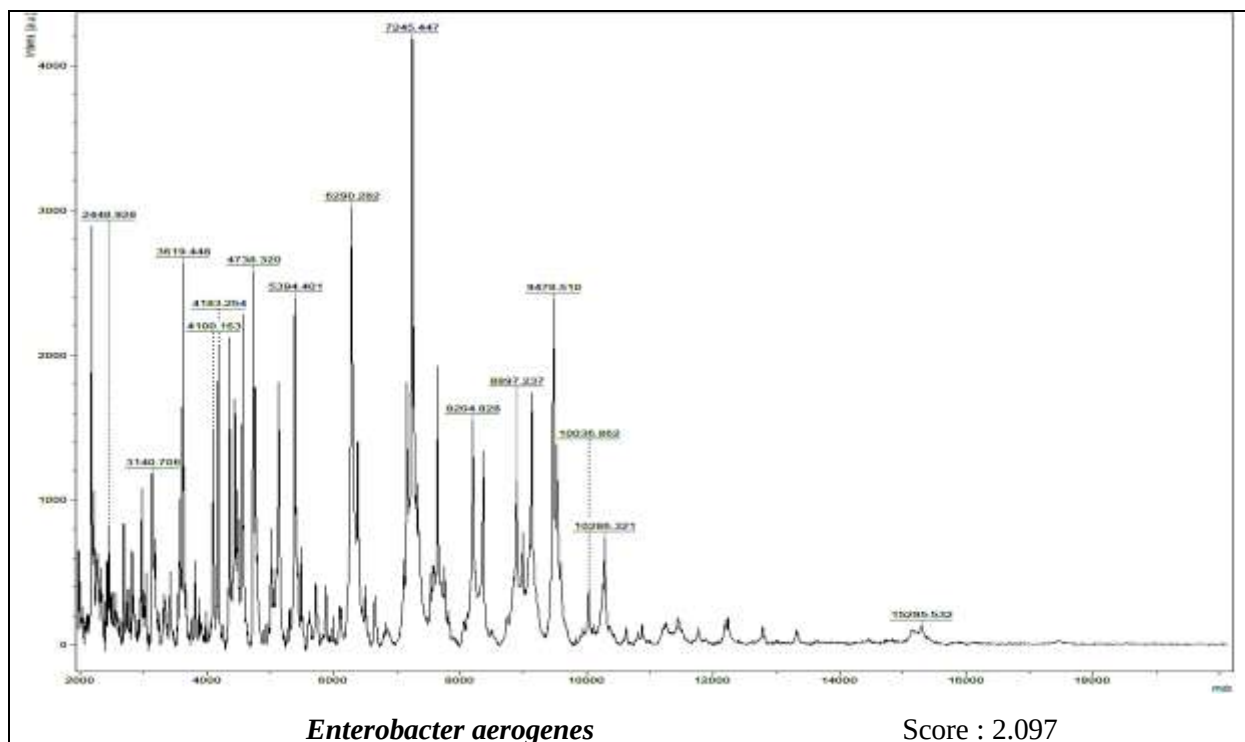
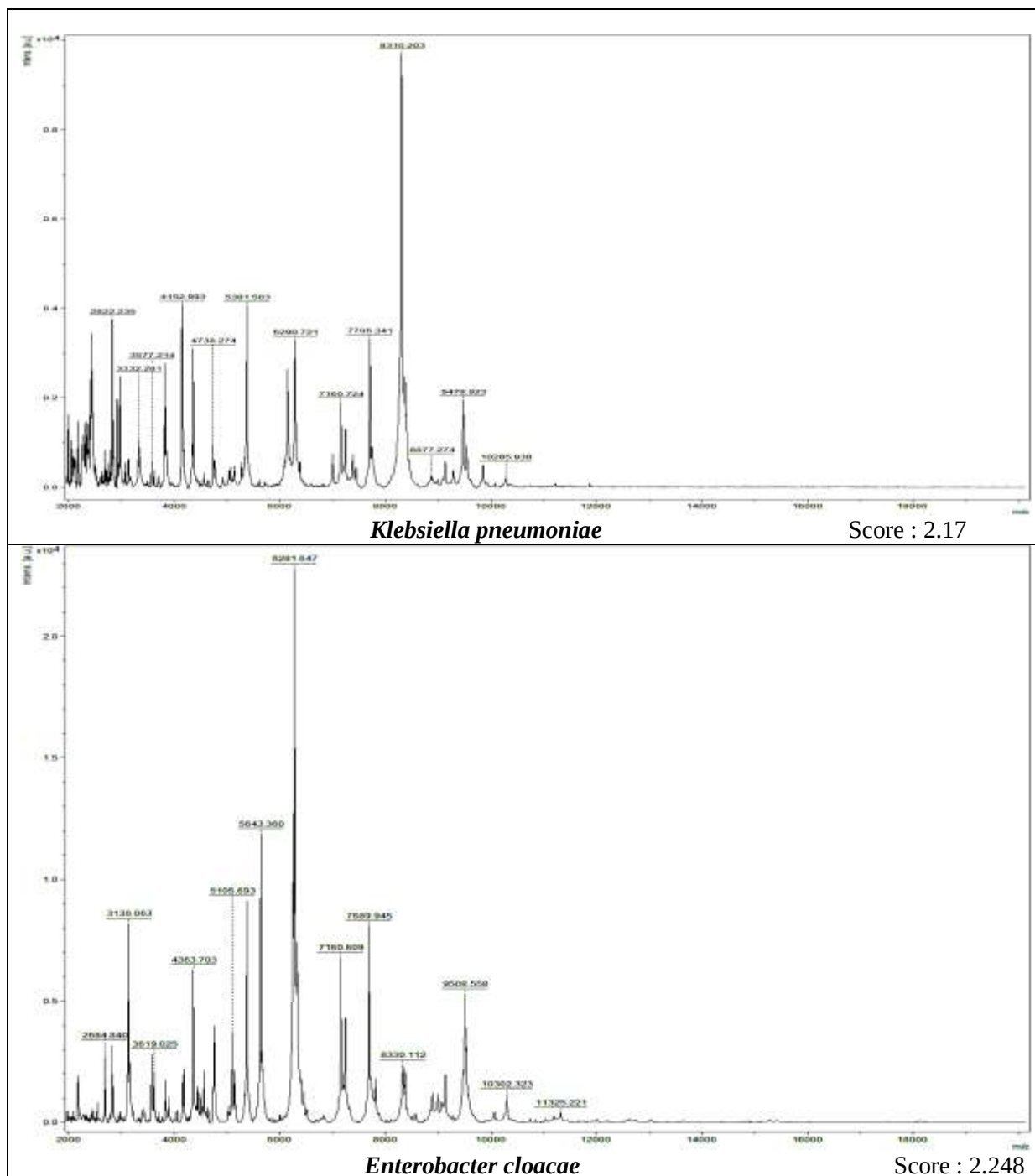
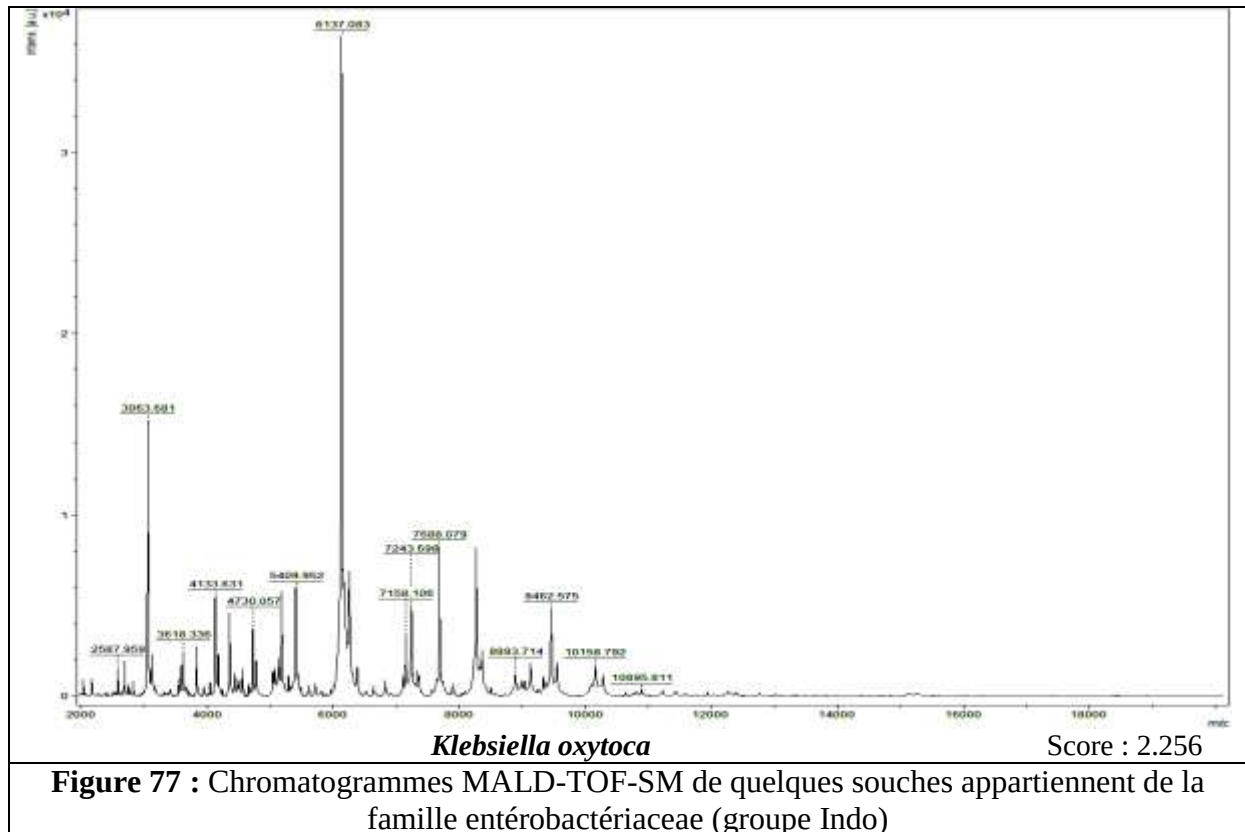


Figure 76 : la translocation bactérienne dans les différents lots durant IC-PRV







6.5. Histologique

L'observation microscopique d'une coupe histologique au niveau de duodénum de l'intestin grêle des rats témoins, montre que la paroi de l'intestin grêle constitue cinq couches superposées. En surface la muqueuse **(1)** qui contient des villosités intestinales **(VI)** bien dessinées, bordées par un plateau strié, un chorion **(C)** conjonctivo-vasculaire régulier. En deuxième une musculaire-muqueuse **(2)**, viens ensuite une sous muqueuses **(3)** qui comporte des glandes claires de Brunner. Puis une couche musculuse **(4)** et la séreuse de protection **(5)**. Ailleurs pour le Jéjunum et l'iléon, on trouve le même aspect sauf absence des glandes de Brunner (Fig.78).

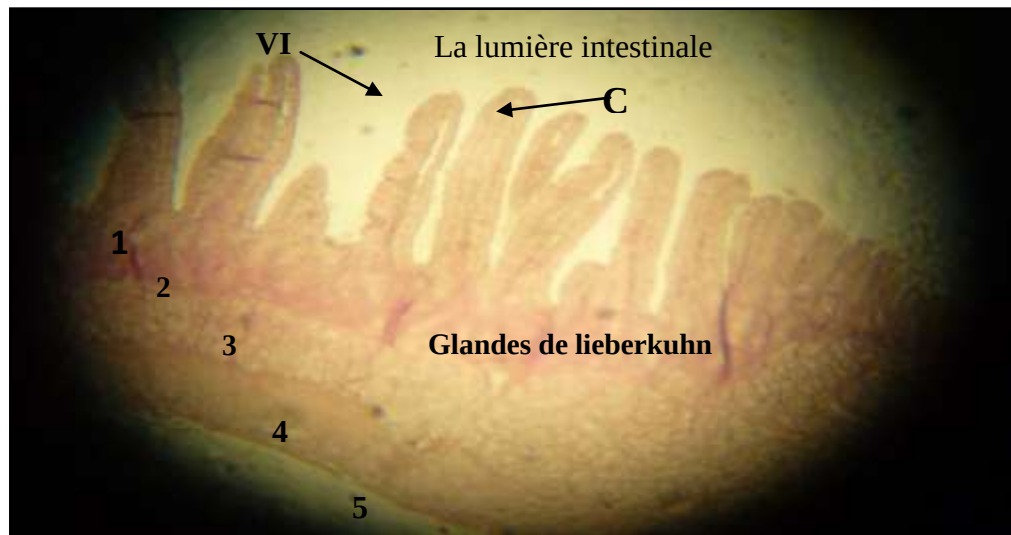


Figure 78: Coupe histologique au niveau du duodénum avec un faible grossissement ($\times 50$)

L'observation microscopique d'une coupe histologique au niveau de l'iléon de l'intestin grêle montre une paroi intestinale grêlique à cinq couches superposées. Cette observation illustre des plaques de Peyer et une hauteur de villosités conservées ainsi que leur plateau strié au niveau de la muqueuse (Fig.79 et 80).

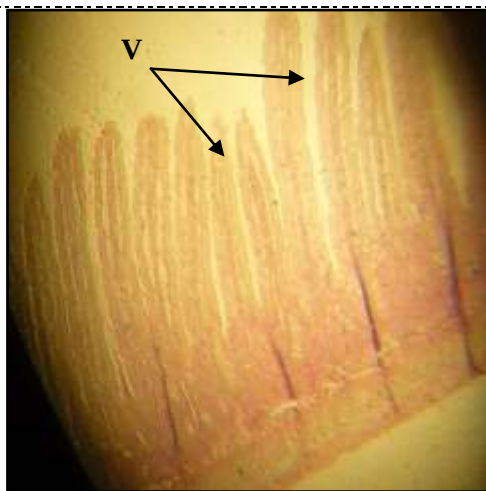


Figure 79: villosité intestinale de l'iléon visualisée à faible grossissement ($\times 50$)

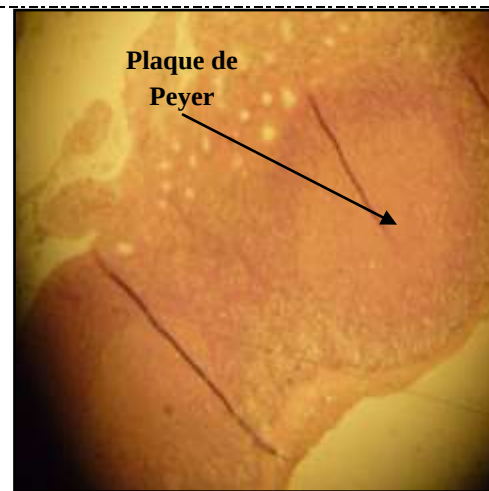
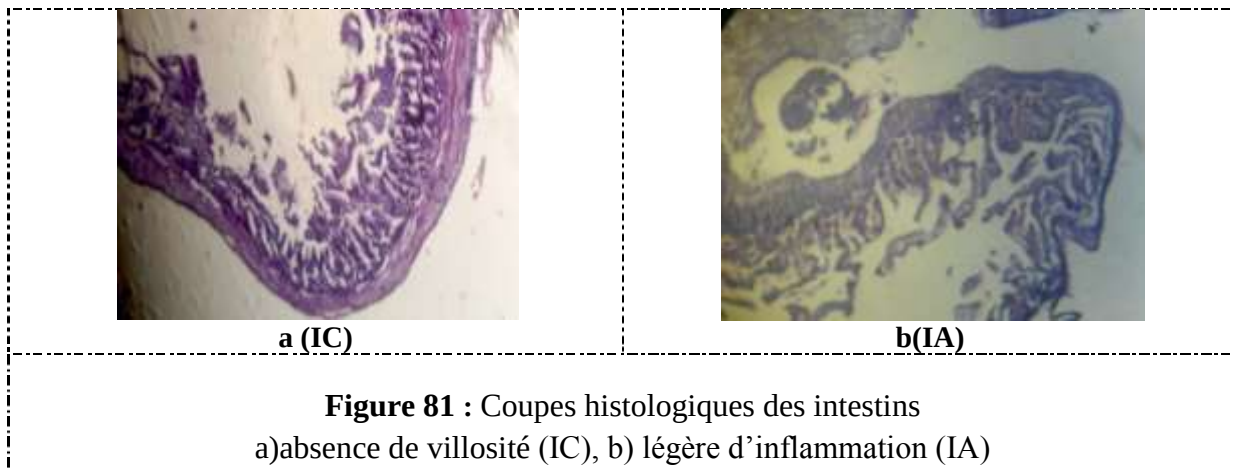


Figure 80: Plaque de Peyer (Follicule lymphatique) situé au niveau de la muqueuse de l'iléon, visualisée à moyen grossissement ($\times 100$)

En accord avec les travaux précédents (Yamada *et al.*, 1993; Kume *et al.*, 2014 ; Pozzoli *et al.*, 2006 ; Abimosleh *et al.*, 2013 ; Vemu *et al.*, 2016), nous avons observé que l'indométacine induisait de graves lésions intestinales dans l'intestin grêle du rat représentée par un certain nombre de lésions hémorragiques, affectant profondément la paroi intestinale ; entraînant une perte d'épithélium de surface, une perte de villosité, une nécrose et une infiltration massive de cellules inflammatoires (Fig.81, annexe 8)



Les extraits phénoliques Fr, P, et TP ont des activités anti-inflammatoires importantes par rapport l'huile essentielle de TP *in vivo*. Ceci du à la présence de flavonoïdes et tannins.

Des études *in vivo* soutiennent l'activité anti-inflammatoire de la grenade et son potentiel dans la prévention du cancer du côlon. Récemment, il a été rapporté que l'acide ellagique prévient l'inflammation intestinale *in vivo* et le développement de cancer (CRC) associé. Dans un modèle de colite aiguë et chronique induite par le sulfate de dextrane sodique, un régime supplémenté avec l'acide ellagique à 2% a légèrement amélioré la colite aiguë. Dans le modèle chronique, l'acide ellagique a inhibé de manière significative l'inflammation intestinale, diminué les médiateurs inflammatoires tels que COX-2 et iNOS, et bloqué les voies de signalisation p38 MAPK (protéine kinase activée par un mitogène), NF- κ B et IL6 / STAT3 (transducteur de signal et activateur de la transcription 3) dans le côlon (Marin *et al.*, 2013 ; Turrini *et al.*, 2015).

Abdolghaffari *et al.* (2010) a montré que Teucrium à toutes les doses a amélioré les dommages macroscopiques et histologiques des rats atteints de colite.

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels et peuvent empêcher l'activation du système immunitaire inné et adaptatif (Hoensch & Oertel, 2015).

Certains flavonoïdes tels que les flavonoïdes du thé (apigénine et épigallocatechine gallate) empêchent l'activation des cellules immunitaires et de ses effecteurs (chimiokines, TNF- α et cytokines) (Cialdella-Kam *et al*, 2017; Hoensch & Weigmann, 2018). L'activité anti-inflammatoire intestinale de la lutéoline et de la quercétine a été confirmée par des expériences *in vivo* et *in vitro* (Nishitani *et al*, 2013 ; Dodda *et al*, 2014 ; Da Silva *et al*, 2016).

Camuesco *et al*. (2004) a montré que le traitement par la quercitrine améliore les dommages au côlon induits par le DSS chez les rats, associé à une amélioration du stress oxydatif intestinal et à une régulation négative de l'activité NOS colique médiée par la réduction de l'expression de la protéine iNOS. L'inhibition d'iNOS produite par la quercitrine est corrélée à l'inhibition de l'activité NF-kB, et donc il contribue à la résolution de l'inflammation.

La présence d' α -Terpinéol dans l'huile essentielle de TP, contribue à son effet anti-inflammatoire, ce composé a la capacité d'inhiber la migration cellulaire des neutrophiles vers la zone enflammée (Choa *et al*., 2005 ; Quintans-Júnior *et al*., 2005). Il a le pouvoir d'inhiber la synthèse des molécules impliquées dans le processus inflammatoire, telles que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine et les prostaglandines (Quintans-Júnior *et al*., 2005).

En plus, l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Garcinia brasiliensis* dans le modèle d'œdème de la patte induit chez les rats par la carragénine, due à la présence de **spathulenol** (8,7%) comme le constituant principal (Martins *et al*., 2008 ; Menichini *et al*, 2009).

Les mécanismes possibles de protection, mentionnons l'accélération de cicatrisation par la migration accrue des cellules épithéliales, avec ou sans prolifération accrue et augmentation de la production de PGE2 muqueuse (Han *et al*, 2000).

En outre, le traitement avec l'extrait de grenade à 7,5% (40% d'acide ellagique) pourrait accélérer le processus de guérison de la plaie incisée chez les rats par rapport à témoin, les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes de la grenade seront mises en synergie dans le processus de cicatrisation des plaies (Yuniarti *et al*, 2018). Il y'a suggéré que l'activité antioxydante des flavonoïdes contribue à la guérison des plaies (Bahramikia & Yazdanparast, 2012).

Mehrabani et al. (2009) ont déterminé l'effet curatif de *T. polium* dans l'ulcère gastrique induit chez le rat *in vivo*. Ils ont clairement indiqué que le traitement avec *T. polium* pendant 4 semaines a entraîné une réépithélialisation, une prolifération, une hyperplasie muqueuse, une migration des cellules épithéliales gastriques et une diminution des cellules inflammatoires.

La combinaison des extraits phénoliques a meilleur effet dans les différents stades de l'inflammation. Il y'a suggéré que les combinaisons de polyphénols, peuvent cibler les différents phases du processus cancérigène. Par exemple, la combinaison de l'EGCG avec d'autres flavan-3-ols tels que l'épicatéchine, inhibe la croissance et la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules CRC (**Araújo et al, 2011**).

6.6. Conclusion

L'ensemble de résultats pharmacologie suggèrent fortement que les polyphénols extraits de *Teucrium polium* et *Punica granatum* récoltés dans notre Wilaya de Mascara, sont avérées efficace pour le traitement des MICI et en particulier MC par rapport l'huile essentielle de *Teucrium polium*, et la combinaison des extraits retarde significativement la perte de poids et l'augmentation du DAI en limitant l'apparition de diarrhée ou de saignements intestinaux et la rétraction de l'intestin, et réduit fortement la mortalité.

Ces biomolécules sont considérés comme des nouvelles alternatives thérapeutiques aux corticoïdes, antibiotiques et AINS. Ces composants ont des activités antioxydantes *in vitro* et anti-inflammatoires intestinale *in vivo*.

Conclusion Générale

Et Perspectives

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes «polyphénols et les huiles essentielles».

Ce travail de thèse avait pour objectif de valoriser des plantes médicinales locales et étudier l'évolution des molécules bioactives «polyphénols et huile essentielle» durant les différents stades de développement.

Les résultats d'extraction et du dosage des polyphénols totaux ont montré que leur teneur n'est pas stable, et varie beaucoup avec la variété, la région, le climat, la saison et les périodes de récoltes, que le stade végétatif est le meilleur stade d'extraction des polyphénols et des huiles essentielles de *T. polium* L. avec une meilleure activité antioxydante. Le taux de polyphénols a été diminué durant la maturation du fruit *Punica granatum* L. Cependant, l'extrait acétonique de l'écorce de *P. granatum* récolté dans le stade S2 a relevé une activité antioxydante importante.

L'identification chromatographique des polyphénols a permis d'identifier des flavonoïdes (catéchine, l'épicatéchine, le kaempférol glucoside, kaempférol, quercétine, myricétine, procyanidine, épigallocatechine gallate), des acides phénols (acide gallique, acide vanillique et acide caféique) et resvératrol. Tandis que les huiles essentielles de *T. polium* L. sont marquées par la prédominance de limonène et spathulenol, déterminés par CPG-SM.

L'absence de signes cliniques de toxicité graves et de rats décès durant la période d'observation indique que les extraits phénoliques de *P. granatum* et *T. polium* et même l'huile essentielle de *T. polium*, administrés par voie orale sont dépourvus de toxicité aiguë et subaiguë chez le modèle rat.

Le modèle d'inflammation intestinale expérimentale aiguë et même chronique réalisé, a montré que les extraits acétoniques de *P. granatum* et *T. polium* ont présenté une activité anti-inflammatoire significative par rapport à l'huile essentielle de *T. polium*. Cependant, la combinaison de 02 extraits phénoliques a révélé une meilleure activité anti-inflammatoire intestinale.

Le traitement avec les 03 extraits de *P. granatum* et *T. polium* ont montré un rétablissement des valeurs de marqueurs de l'inflammation intestinale, cliniques, biochimiques, le statut de stress oxydatif, et microbiologiques.

Nos résultats montrent que les polyphénols de *T. polium* et *P. granatum* testées témoignent des activités antioxydante *in vitro* et anti-inflammatoire *in vivo*. Ces études pourront être approfondies par d'autres :

- 1) Fractionnement et isolement des biomolécules actives ;
- 2) Evaluation des effets biologiques étudiés dans le présent travail sur les molécules isolées ;
- 3) Elargir leur spectre d'activité : évaluer d'autres effets thérapeutiques.

Références bibliographiques

- **Abdolghaffari AH, Baghaei A, Moayer F, Esmaily H, Baeeri M, et al. 2010.** On the benefit of *Teucrium* in murine colitis through improvement of toxic inflammatory mediators. *Human and Experimental Toxicology*. 29 (4): 287-295. DOI: 10.1177/0960327110361754.
- **Abdollahi A., Karimpour H., Monsef-Esfehani H. 2003.** Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacol. Res.* 48:31-35
- **Abimosleh SM, Tran CD, Howarth GS. 2013.** Emu oil reduces small intestinal inflammation in the absence of clinical improvement in a rat model of indomethacin-induced enteropathy. *Evid Based Complement Alternat Med*: 429706. 10p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/429706>
- **Abreu, M.T. 2010.** Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10(2): p. 131-44.
- **Abu Sitta KH, Shomah MS, Salhab AS. 2009.** Hepatotoxicity of *Teucrium polium* L tea: supporting evidence in mice models. *Austr. J. Med. Herb.* 21: 106-108.
- **Achitei D., Ciobica A., Balan G., Gologan E., Stanciu C., Stefanescu G. 2013.** Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipidperoxidation inactive and non-active inflammatory bowel disease patients, *Dig.Dis.Sci.* 58(5): 1244–1249. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-012-2510-z>.
- **Afaq F., Saleem M., Krueger C.G., Reed J.D., Mukhtar H., 2005.** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulate MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 Mice. *International Journal of Cancer*, 113: 423-433
- **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.
- **Aharoni, A., Galili, G. 2011.** Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 239–244.
- **Aktan, F.2004.** iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75: 639- 653.
- **Al-Ashban R., Barrett D., Shah A. 2006.** Effects of chronic treatment with ethanolic extract of *Teucrium polium* in mice. *Journal of herbs, Spices & Medicinal plants*, 11(4): 27-36
- **Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F. 2005.** Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun- dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties growth in Oman. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7592– 7599.
- **Al-Hamwi M, Aboul-Ela M, El-Lakany A, Nasreddine S. 2021.** Anticancer Activity of *Micromeria fruticosa* and *Teucrium polium* growing in Lebanon. *Pharmacog J.* 13 (1):103-9.
- **Ali N., Jamil A., Shah S. W. A, Shah I., Ahmed G. 2017.** Spasmogenic and spasmolytic activity of rind of *Punica granatum* Linn. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17:97. DOI 10.1186/s12906-017-1616-4.
- **Al-Maiman S.A., Ahmad D.2002.** Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry* 76, 437–441.
- **Al-Muammar, M. N. and F. Khan 2012.** "Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*).*" Nutrition* 28(6): 595-604.
- **Alreshidi M, Noumi E, Bouslama L, Ceylan O, N. Veetil V et al. 2020.** Phytochemical Screening, Antibacterial, Antifungal, Antiviral, Cytotoxic, and Anti-Quorum-Sensing Properties of *Teucrium polium* L. Aerial Parts Methanolic Extract. *Plants*, 9, 1418; doi: 10.3390/plants9111418
- **Al-SaidF.A., Opara U.L., Al-Yahyai R.A.2009.** Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering* 90, 129–134.
- **Amasheh, M., Schlichter, S., Amasheh, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J. D. 2008.** Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 138: 1067-1073.
- **Amiot J.M., Tacchini M., Aubert S.Y., Oleszek W.1995.** Influence of cultivar, maturity stage and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruit, *J. Agric. Food*

Chem. 43 1132–1137.

- **Andreoli A, Meddi P, Pantanella P et al. 1998.** Diagnostic and Therapeutic Role of Endoscopy. In: Roberto Tersigni, Cosimo Prantera (eds.). *Crohn's Disease; A Multidisciplinary Approach*. Springer-Verlag Italia. 2010; doi 10.1007/978-88-470-1472-5. Ann Surg, **228**(2): p. 188-93.
- **Anthony A, R. E. Pounder, A. P. Dhillon, A. J. 2000.** Wakefield & The Inflammatory BOWEL Disease Study Group: Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther*; 14: 241-245.
- **Anton R., Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ; Tec&Doc. Paris, pp 522
- **Araújo J R., GonçalvesP, Marte F.2011.** Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research* 31 : 77–87
- **Arndt H, Kullmann F, ReuB F, Scholmerich J and Palitzsch K-D. 1999.** Glutamine Attenuates Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion in Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation in the Rat. *Journal Of Parenteral And Enteral*. 23(1):12-18.
- **Arndt H, Palitzsch K-D, Schölmerich J. 1998.** Leucocyte endothelial cell adhesion in indomethacin induced intestinal inflammation is correlated with faecal pH. *Gut*. 42:380–386. doi: 10.1136/gut.42.3.380.
- **Asghari AA, Mokhtari-Zaer A, Niazmand S, Mc Entee K, Mahmoudabady M. 2020.** Anti-diabetic properties and bioactive compounds of *Teucrium polium* L. *Asian Pac J Trop Biomed* ; 10(10): 433-441.
- **Ashokkumar, P. and G.Sudhandiran .2008.** "Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis." *Biomed Pharmacother* **62**: 590-597
- **Atreya, I, R. Atreya and M.F. Neurath .2008.** "NF-kappaB in inflammatory bowel disease." *J Intern Med* **263**: 591-596
- **Autore G., Capasso F., De Fusco R., Fasulo M.P., Lembo M. , Mascolo N., MenghiniA., 1984.** Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. *Pharmacol. Res.Comm.*, 1:16. In: Rasekh H. R., Yazdanpanah H., Hosseinzadeh L., Bazmohammadi N. andKamalinejad M., 2005. Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4: 245-249.
- **Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D. 2004.** Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intimamedia thickness, blood pressure, and LDL oxidation. *Clin Nutr* 23: 423-433
- **Awoyinka O.A., Balogun i.O. Ogunnowo A.A. 2007.** Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *J. Med. Plant. Res.* Vol. 1(3) : 063- 065.
- **Bahramikia S and Yazdanparast R. 2012.** Phytochemistry and Medicinal Properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother. Res.* DOI: 10.1002/ptr.4617.
- **Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Ceconello I. 2007.** Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. (4):464- 71
- **Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nematbakhsh M, Asgari A. 2013.** Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* in Wistar rats. *Pak. J. Med. Sci.* **29**(1) Suppl: 329-333.
- **Barbieri N, Costamagna M, Gilabert M, et al. 2016.** Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharm Biol.* 54(1):168-173. doi:10.3 109/13880209.2015.1028077
- **Barnett MP, Cooney JM, Dommels YE, Nones K, Brewster DT, Park Z et al. 2013.** Modulation of colonic inflammation in Mdr1a(-/-) mice by green tea polyphenols and their effects on the colon transcriptome and proteome. *J Nutr Biochem*; 24:1678- 90.
- **Barrios JM, Lichtenberger LM. 2000.** Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection

and NSAID injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology*. 118:1179–86.

• **Baser KHC., Buchbauer G., 2010.** Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

• **Baser KHC .2002.**Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl Chem* 74:527–545

• **Bashir H.A, Abu-Goukh A-B.A.2003.** Compositional changes during guava fruit ripening, *Food Chem.* 80: 557–563.

• **Baskar V., Venkatesh R., Ramalingam S. 2018.** Flavonoids (antioxidant systems) in higher plants and their response to stresses. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*; Springer: Cham, Switzerland, pp. 253–268.

• **Bataille R, Klein B.1992.** C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. *Arthritis Rheum.* 35:982e4.

• **Batra A, Zeitz M, Siegmund B. 2009.** Adipokine signaling in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 15:1897e905.

• **Baumgart DC, Carding SR. 2007.** Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369(9573): 1627-1640

• **Baumgart DC, Sandborn WJ. 2007.** Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 369:1641–57.

• **Baumgart DC, Sandborn WJ. 2012.** Crohn's disease. *Lancet.*380:1590–605.

• **Beaugerie L, Itzkowitz SH. 2015.** Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 2(372):1441–52. doi:10.1056/NEJMra1403718

• **Belkhodja H ., Meddah B, Tir Touil A & Pascal S. 2016.** Effect of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* in Biomarkers Level in Osteoarthritis Experimental Model.*J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 6(5), 35-42.

• **Belmekki, N, Bendimerad, N, Chahrazed B, X.F., 2013.** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Eastern Algeria. *J. M ed. Plants Res.* 7(14), 898–902. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1160>.

• **Belmimoun A., Meddah B., T. T. Meddah A., Gabaldon J., Sonnet P. 2020.**Antifungal activity of *Myrtus communis* and *Zygophyllum album* extracts against human pathogenic fungi. *European Journal of Biological Research.* 10(2): 45-56

• **Belmimoun A., Meddah B., T.Meddah A. and Sonnet P.2016.** Antibacterial And Antioxidant Activities Of The Essential Oils And Phenolic Extracts Of *Myrtus communis* And *Zygophyllum album* From Algeria. *J Fundam Appl Sci.* 8(2), 510-524.

• **Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves A.V, Fraser G.R, Colombatto D, McAllister T.A. et al., 2008.** Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology.* 145 : 209–228

• **Bennike, T.B., Carlsen TG., Ellingsen T. et al .2015,** *Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies.* *Inflamm Bowel Dis.* 21(9): 2052-2067.

• **Bernadet M. 2000.** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Editions Dangles.

• **Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH et al.2009.** Maladies inflammatoires chroniques intestinales: une approche globale. In: World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, <http://www.worldgastroenterology.org/inflammatorybowel-disease.html>.

• **Betti H.A., Stein A.C., Dallegrave E. Barth Wouters A T, Negrão Watanabe TT, 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).

• **Bhandari, P. 2015.** Pomegranate (*Punica granatum* L.) ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurologic*

Diseases. 2(03):171- 184.

- **Bhandary B. S. K., Sharmila K.P., Kumari N. S., Bhat S. V.** 2013. Acute And Subacute Toxicity Study of the Ethanol Extracts Of *Punica granatum* (Linn). Whole Fruit And Seeds And Synthetic Ellagic Acid In Swiss Albino Mice. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6, Suppl 4, 2013, 192 198
- **Bharti S. K., Krishnan S., Kumar A., Kumar A.** 2018. Antidiabetic phytoconstituents and their mode of action on metabolic pathways. *Therapeutic Advances in Endocrinology and metabolism*, 9(3), 81-100.
- **Bhonde R., Shukla R.C., Kanitkar M., Shukla R., Banerjee M., Datar D.** 2007. Isolated islets in diabetes research. *Indian J Med. Res.* 125:425-440.
- **Bibiloni R., Fedorak RN, Tannock GW, Madsen K L, Gionchetti P et al.** 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 100 (7):1539-46. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41794.x.
- **Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz AL, De Carvalho JE, Pastore GM.** 2011. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol*. 49(7):1610-1615. doi:10.1016/j.fct.2011.04.012.
- **Bjarnason, I., Zanelli, G., Prouse, P., Smethurst, P., Smith, T., Levi, S., et al.** 1987. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 2, 711–714. doi: 10.1016/S01406736(87)91075-0.
- **Bloemendaal, A. L. A., Buchs, N. C., George, B. D., & Guy, R. J.** 2016. Intestinal stem cells and intestinal homeostasis in health and in inflammation: a review. *Surgery*. 159 (5): 1237-1248.
- **Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, et al.** 2010. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol*. 28:157e83.
- **Bouayed J., Rammal H., Younos C., Dicko A. et Soulimani R.,** 2008. Caractérisation et bio évaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Springer*. France : 4.
- **Boukhatem MN, Hamaidi MS, Saidi F, Hakim Y.** 2010. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie »*. N° 03 :37-45.
- **Boukhatem MN, Ferhat A et Kameli A.** 2019. Méthodes D'extraction Et De Distillation Des Huiles Essentielles : *Revue De Littérature. Revue Agrobiologia*, 9(2): 1653-1659
- **Boukhebti H, Ramdani M, Lasmi I, Katfi F, Chaker AN , Lograda T.** 2019. Chemical composition, antibacterial activity, and anatomical study of *Teucrium polium* L. *Asian J Pharm Clin Res*, 12 (6): 337-341.
- **Boukhenoufa A, Maizi Y, Tir Touil Meddah A, Meddah B.** 2020. Antifungal Activity of Topical Formulation Containing *Artemisia Herba Alba* Asso Essential Oil. *Archives of Ecotoxicology*, 2 (4): 69-73.
- **Boullard B.** 2003 *Plantes médicinales du monde : réalités et croyances*. Paris, p. 1092- 1107
- **Bouskra, D. Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G.** 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456: 507-510.
- **Bozov P, N. Penchev P.** 2019. Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* (rouy) D. Wood. *Phytochemistry Letters* 31 : 237–241.
- **Brada M., Mohamed B., Michel M., Annabelle C.** 2007. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de L'Algérie. *Biothnol. Argon. Soc. Environ*; 11(1) : 3-7.
- **Brand- Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.** 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30
- **Brezani V, Smejkal K, Hosek J, Tomasova V.** 2018. Anti-inflammatory Natural Prenylated Phenolic Compounds - Potential Lead Substances. *Current Medicinal Chemistry*. 25 (10): 1094 -

1159, DOI: 10.2174/0929867324666170810161157.

• **Bridel F., Bailly C., Dion N., Patiny A., Guimarães O., Geirnaert E., 2004.** Guide visual des espèces. ABCorpus. GNU F.D.L. 85. ;

• **Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, et al .1997.** Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*; 151: 97–110.

• **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire, 3eme édition. 484-634 p.

• **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie: Plantes médicinales, Eds.Technique et documentation Lavoisier, Paris.

• **Bruneton J. 2015.** Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, *Tec and Doc,Lavoisier, Paris.* 1504pp.

• **Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Fini, A.; Pollastri, S.; Tattini, M. 2013.** Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *Int. J. Mol. Sci.* 14:3540–3555.

• **Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V. 2005.** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry.* 280 (7) : 5636-5645.

• **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007.** Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science.* 90: 2580–2595.

• **Camuesco D, Comalada M, Rodriguez-Cabezas M.E, Nieto A, Lorente M D., Concha A et al .2004.** The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology* 143 : 908–918

• **Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. 2008.** Crohn's Disease-associated *Escherichia coli* LF82 Aggravates Colitis in Injured Mouse Colon via Signaling by Flagellin. *Inflamm Bowel Dis* .Volume 14(8): 1051-1060.

• **Catinean A, Neag MA, Muntean DM, Bocsan IC, Buzoianu AD. 2018.** An overview on the interplay between nutraceuticals and gut microbiota. *Peer J* 6:e4465. <https://doi.org/10.7717/peerj.4465>

• **Celiksoy V, RL. Moses , Sloan AJ., Moseley R, Heard CM. 2020.** Evaluation of the In Vitro Oral Wound Healing Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind Extract and Punicalagin, in Combination with Zn (II). *Biomolecules*, 10, 1234; doi:10.3390/biom10091234

• **Cerda, B., Ceron, J.J., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C., 2003.** Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural. Food Chemistry*, 51: 3493-3501.

• **Chabane S, Boudjelal A, Napoli E, Benkhaled A, Ruberto G. 2020.** Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil, *Journal of Essential Oil Research*, DOI: 10.1080/10412905.2020.1842260

• **Chabane S., Boudjelal A., Keller M., Doubakh S., Potterat O. 2020.** *Teucrium polium* - wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile. *South African Journal of Botany.*137:1-8.

• **Chao, L. K., Hua, K. F., Hsu, H. Y., Cheng, S. S., Liu, J. Y, Chang, S. T. 2005.**Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum mosmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18): 7274- 7278

• **Chang-Gue S., Seung-Hyun H., Jung-Hyo C., Jang-Woo S., Chin-Ho C., Yeon Weol L., Chong-Kwan C., 2003.** Induction of hemopoiesis by saenghyuldan, a mixture of *Ginseng radix*, *Paeoniae radix alba*, and *Hominis placenta* extracts. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 120–126.

• **Charles M., Benbrook P-D. 2005.** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture ET à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances

scientifiques. *The Organic Center*: 10.

- **Chassaing B., Aitken J. D., Malleshappa M., Vijay-Kumar M., 2014.** Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*.104: 15-25.
- **Chemat F., Fabiano-Tixier A. S., Vian M. A., Allaf T., Vorobiev E. 2015.** Solvent- free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71:157- 168.
- **Chen J, Liao C, Ouyang X, Kahramanoglu I, Gan Y, Li M.2020.** Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel and Its Applications on Food Preservation. *Journal of Food Quality*, 8, Article ID 8850339, <https://doi.org/10.1155/2020/8850339>
- **Chen P., Zhou X., Zhang L., Shan M., Bao B., Cao Y., Kang A., Ding A. 2015.** Anti-inflammatory effects of huangqin tang extract in mice on ulcerative colitis. *J. Ethnopharmacol.* 162: 207–214, doi:10.1016/j.jep.2014.12.039.
- **Cheng J, Palva AM., De Vos WM., Satokari R. 2013.** Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 323-46
- **Cialdella-Kam L, Ghosh S, Meaney MP, Knab AM, Shanely RA, Nieman DC. 2017.** Quercetin and Green Tea Extract Supplementation Downregulates Genes Related to Tissue Inflammatory Responses to a 12-Week High Fat-Diet in Mice. *Nutrients.* 9: DOI: 10.3390/nu9070773
- **Cicile J.-C., 2002 :** Distillation. Absorption Etude pratique. *Techniques de l'ingénieur J* 2610 pp 1-20.
- **Clairborne A., 1985.** Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research.* *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 283-284.
- **Clevers, H. 2013.** The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274– 284.
- **Colucci R, Pellegrini C, Fornai M, Tirota E, Antonioli L, Renzulli C, et al. 2018.** Pathophysiology of NSAID-Associated Intestinal Lesions in the Rat: Luminal Bacteria and Mucosal Inflammation as Targets for Prevention. *Front. Pharmacol.* 9:1340. doi: 10.3389/fphar.2018.01340.
- **Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. 2011.** Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; 140:1785–94. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.055.
- **Cotin, S., Calliste, C.A., Mazon, M.C., Hantz, S., Duroux, J.L., Rawlinson, W.D., Ploy, M.C., & Alain, S. 2012.** Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antivir. Res.* 96, 181–186. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.010.
- **Cowan M-M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12 (4): 564-582.
- **Cozzani V., Gubinelli G., Salzano E., 2005.** Criteria for the escalation of fires and explosions. In: *Proceedings of the 7th Process Plant Safety Symposium*, American Institute of Chemical Engineers, New York, NY, p. 225.
- **Crosnier C., Stamatakis D., Lewis J.2006.** Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 7(5): p. 349-59
- **Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN.2009.** Dietary phenolics: -chemistry bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*; 26:1001-43
- **D. Esther L, Ameer K, P. Immanuel, Galal AE, Naif AAD, Mariadhas VA. 2020.** Photo-activated synthesis and characterization of gold nanoparticles from *Punica granatum* L. seed oil: An assessment on antioxidant and anticancer properties for functional yoghurt nutraceuticals. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* 206:111868
- **Da Silva L.M, Machado Farias J.A, Boeing T, Somensi L. B, Beber A. P., Cury B. J., Santin J. R., De Andrade S. F. 2016.** Hydroalcoholic Extract from Inflorescences of *Achyrocline satureioides* (Compositae) Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis in Mice by Attenuation in the Production of Inflammatory Cytokines and Oxidative Mediators. *Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 3475356, 15P.

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3475356>

- **Daghbouche S, Daghbouche AE, Boulessnam B, Snoussi SA, Djazouli ZE. 2018.** Influence of phenological stages on chemical composition and antimicrobial activities of *Teucrium polium* essential oils from North East of Algeria. *J Fundam Appl Sci.* 10(5S):32-65. doi:10.4314/jfas.v10i5s.3.
- **Danese S., Fiocchi C. 2006.** "Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases." *World J Gastroenterol* 12: 4807-4812.
- **Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, et al. 2004.** High prevalence of adherent- invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*; 127(2): 412-21.
- **Dassprakash M.V., Arun R., Abraham S. K., and Premkumar K.. 2012.** *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract, *Pharmaceutical Biology.* 50 (12):1523–1530.
- **De Lima VT, Vieira MC, Kassuya CA, Vieira M.C., Kassuya C.A.L. , Alves J.M. et al. 2013.** Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*. *Phytomedicine.* 21(11):1298-1302. doi:10.1016/j.phymed.2014.07.004.
- **De Vincenzi M., Maialetti F., Silano M. 2003.** Safety data review Constituents of aromatic plants: teucriin A. *Fitoterapia* 74 (2003) 746–749
- **Deadman. 1971.** Evaluation of chromogens suitable for occult blood in faeces. 1971. *Clinica Chimica Acta*: 35:273-276.
- **Dear KL, Compston JE, Hunter JO. 2001.** Treatments for Crohn's disease that minimize steroid doses are associated with a reduced risk of osteoporosis. *Clin Nutr*; 20: 541-6.
- **Dehghani F., Khozani T.T., Panjehshahin M.R., Karbalaedoost S. 2005.** Effect of *Teucrium polium* on histology and histochemistry in rat stomach. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 24(3):126-127
- **Del RD, Borges G, Crozier A. 2010.** Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nutr*, 104 Suppl3: S67-S90.
- **Demarne FE. 1985.** Le géranium rosat. *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62.
- **Denis MC, Furtos a, Dudonne S, Montoudis a, Garofalo C, Desjardins Y et al 2013.** Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One* 2013; 8:e53725.
- **Dervis H G, Soyuturk M, Unlu M, Ataca P, Karaman M, Sagol O, Borekci E, Yilmaz O. 2015.** Mucosal healing effect of nilotinib in indomethacin-induced enterocolitis: A rat model. *World J Gastroenterol.* 21(44):12576-12585. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i44.12576>
- **Desreumaux, P., Foussat A., Allez M, et al. 2012.** Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 143(5): 1207-1217 e1201-1202.
- **Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K .2009.** Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* 1(2): 123-35
- **Djabou N., Muselli A., Allali H., Dib M. E. A., Tabti B., Varesi L., Costa J., 2012.** Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83: 51-62.
- **Djidel S, Bouaziz A, Bentehar A, Khennouf S , Baghiani A, Dahamna S and Amira S. 2018.** Effect of Methanol Extract Prepared from Leaf of *Pistacia lentiscus* on Plasma Antioxidant Activity and Biomarkers of Oxidative Stress in Liver Tissue of Healthy Rats. *Annual Research & Review in Biology*, 23(4): 1-10
- **Dodda D., Chhajed R., Mishra J., Padhy M., 2014.** Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of

quercetin,” *Indian Journal of Pharmacology*, 46(3): 286–291,

- **Donder Y, B. Arikan T , Baykan M , Akyuz M , A. Oz B. 2017.** Effects of quercitrin on bacterial translocation in a rat model of experimental colitis. ARTICLE IN PRESS. *Asian Journal of Surgery* 1e8.
- **Doré. J, Simrén.M, Buttle.L, Guarner.F. 2013.** Hot topics in gut microbiota. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1, 311–318. <https://doi.org/10.1177/2050640613502477>
- **Dorman HJD and Deans SG. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316.
- **Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG and Deans SG. 2000.** In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 12-16.
- **Dourakis SP, Papanikolaou IS, Tzemanakis EN, Hadziyannis SJ. 2002.** Acute hepatitis associated with herb (*Teucrium capitatum* L.) administration. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 14:693–5.
- **Drarabpour E, Hossein Motamedi , Seyyed Mansour seyed Nejad.2010.**Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens.*Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 124-127.
- **Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R. 1997.**La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- **Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gu`rel A, Aktas, L, Gesheva E .2008.** Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol* 34:67–78.
- **El Atki Y., Aouama I., El kamari F, Taroq A., Lyoussi B., Oumokhtar B., Abdellaoui A.2019.** Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arabian Journal of Chemistry* . Article in press.
- **El Atki Y., Aouama I., El kamari F., Zejli H., Taroq A., Lyoussi B., Taleb M., Abdellaoui A.. 2020.** Antioxidant activities, total phenol and flavonoid contents of two *Teucrium polium* subspecies extracts. *Mor. J. Chem.* 8(2) : 446-455
- **El Gharra, H. 2009.** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512
- **Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y, Nasri N and Ferchichi A. 2012.**Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(xx), pp. 4724-4730. DOI: 10.5897/JMPR11.995
- **Elgorashi E.E., McGaw L.J.2019.** African plants with *in vitro* anti-inflammatory activities: A review. *South African Journal of Botany* 126: 142–169.
- **El-Hadary AE & Ramadan MF. 2019.** Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *J Food Biochem*, e12803. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12803>
- **Ellinger S, Müller N, Stehle P, Ulrich-Merzenich G. 2011.** Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytomedicine* .18: 903-915. PMID: 21802928. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.06.006.
- **Elmasri W.A., F.Hegazy M.E., Aziz M., Koksai E., Amor W., Mechref Y., Hamood A.N., Cordes D.B., Paré P.W., 2014.** Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103: 107-113
- **Elmasri WA., F. Hegazy M-E, Mechref Y, Paré PW.2016.** Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals . *Phytochemistry Letters* 15 : 81-87
- **Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH.1995.** Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 109: 1344-67.
- **Enders G. 2015.** Le charme discret de l'intestin, tout sur un organe mal aimé. Actes sud.

- **Engel, M. A. and M. F. Neurath. 2010.** New pathophysiological insights and modern treatment of IBD." *J Gastroenterol* 45(6): 571-583.
- **Esmaeili, M.A., Yazdanparast, R. 2004.** Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol.* 95:27-30.
- **Ezejiofor AN, Orish CN, Orish EO. 2013.** Effect of aqueous leaves extract of costus afer Ker Gawl (*Zingiberaceae*) on the liver and kidney of male albino wistar rat. *Ancient Sci Life.* 33:4–9.
- **F. do Nascimento M, C. Cardoso C , S. Santos T , A. Tavares L , N. Pashirova T, Severino P , B. Souto E, L. C. de Albuquerque-Junior R. 2020.** Development and Characterization of Biointeractive GelatinWound Dressing Based on Extract of *Punica granatum* Linn. *Pharmaceutics* , 12, 1204; doi:10.3390/pharmaceutics12121204
- **Famularo G, Minisola G.2010.** Laboratory Tests. In: Roberto Tersigni, Cosimo Prantera (eds.). *Crohn's Disease; A Multidisciplinary Approach.* Springer-Verlag Italia; doi 10.1007/978-88-470-1472-5
- **Fan FY, Sang LX, Jiang M. 2017.** Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules.* 22. PMID: 28335502. DOI: 10.3390/molecules22030484.
- **Farombi, E.O.; Adedara, I.A.; Ajayi, B.O.; Ayepola, O.R.; Egbeme, E.E. Kolaviron, 2013.** A natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Basic Clin.Pharmacol. Toxicol.* 113: 49–55, doi:10.1111/bcpt.12050.
- **Fasano A.1998.**Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. *Trends Biotechnol* 16(4): 152-7
- **Fawole, O.A, Opara U.L. 2013a.** Seasonal variation in chemical composition, aroma volatiles and antioxidant capacity of pomegranate during fruit development.Afr. J. Biotechnol. 12(25), 4006–4019.DOI: 10.5897/AJB2013.12337.
- **Fawole O.A, Opara U.L.2013b.** Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Sci. Hortic.* 150, 37–46.
- **Fawole O. A., Opara U. L.2013c.** Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. Bhagwa). *South African Journal of Botany* 85: 23–31.
- **Fawole O. A., Opara U.L. 2013d.**Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review *Scientia Horticulturae* 159 ;152–161
- **Ferhat, M. A., Boukhatem, M. N., Hazzit, M., & Chemat, F. 2016.** Rapid extraction of volatile compounds from Citrus fruits using a microwave dry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(3), 753-781.
- **Ferrante M, Penninckx F , De Hertogh G, Gebos K, D’Hoore A, Noman M, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Assche G. 2006.** Protein-losing enteropathy in Crohn’s disease. *Acta Gastroenterol Belg.* 69 : 384-389.
- **Filaretova L.P., Bagaeva T. R., Morozova O. Y. et al. 2011.** Thehealing of NSAID-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects,|| *Journal of Physiology and Pharmacology.* 62 (6):. 619–625.
- **Fiorentino A., D’Abrosca B., Pacifico S., Scognamiglio M., D’Angelo G., Gallicchio M., Chambery A., Monaco P., 2011.** Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against HepG2 human cells of neo-clerodane diterpenes from *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 72 (16): 2037-2044
- **Fleuriet A. & Macheix J-J., 2003.** Phenolics acids in fruits and vegetables. *Marcel Dekker*, NewYork: 1-41.
- **Floch, M.H.2003.***Probiotics, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Disease.* Curr Treat Options Gastroenterol, 6(4): 283-288.
- **Fornai M, Antonioli L, Pellegrini C, Colucci R, Sacco D, et al. 2016.** Small Bowel Protection

against NSAID-injury in Rats: Effect of Rifaximin, a poorly absorbed, GI targeted, antibiotic. *Pharmacological Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.031>.

• **Fourati M , Smaoui S , Ben Hlima H , Elhadek K , Ben Braïek O , et al. 2020.** Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Pomegranate (*Punica granatum*) Seeds - A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00863-7>

• **Fraga, C.G.; Croft, K.D.; Kennedy, D.O.; Tomás-Barberán, F.A. 2019.** The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*, 10:514–528.

• **Freeman, C. D., Klutman, N. E., and Lamp, K. C. 1997.** Metronidazole, A therapeutic review and update. *Drugs*. 54: 679–708. Doi: 10.2165/00003495-199754050-00003.

• **Fertout-Mouri N, Latrèche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F, Khaled M.B. 2016.** Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15:346-353. DOI 10.1007/s10298-016-1048-1

• **Galvez, J., M.E. Rodriguez-Cabezas, and A. Zarzuelo. 2005.** Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 49(6): 601-8.

• **Garber A & Regueiro M .2019.** Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. *Current Gastroenterology Reports*. 21: 31. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0698-1>

• **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A., 2010.** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and Vegetable samples. *Molecules*. 15: 8813-8826.

• **Gasche C., Lomer M. C. E., Cavill I., Weiss G. 2004.** Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*, 53(8): 1190-1197.

• **Gavahian M., Farahnaky A., Farhoosh R., Javidnia K., Shahidi F. 2015.** Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioprocess Technology*, 94: 50-58.

• **Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, Johnson IT. 1998.** Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med*; 25:19-25.

• **Gerbe F, Legraverend C, Jay P .2012.** The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci*. 69(17): 2907-17

• **Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Pajk F., Kreft I. 2009.** Selenium concentration in St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) herb after foliar spraying of young plants under different UV-B radiation levels. *Food Chem*. 117: 204–206.

• **Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. 2014.** The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe*; 15 (3):382–92.

• **Gharaibeh MN, Elayan HH, Salhab AS. 1988.** Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *J Ethnopharmacol* 24: 93–99.

• **Ghasemi T., Keshavarz M. and Parviz M. 2019.** Acute Hepatorenal Dose Dependent Toxicity of *Teucrium polium* Hydro Alcoholic Extract in Rat. *Int J Pediatr*. 7(9): 10099- 10107. DOI: 10.22038/ijp.2019.41222.3475.

• **Ghoraishian, S.M. 2006.** The effect of hazel-leaf decoction on blood glucose reduction in the diabetic rats. *World Journal of Medical Sciences*. 1(2):144-146.

• **Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. 1991.** The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol*. 35:238-43.

• **Gil M.1., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A., 2000.** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4581-4589

• **Gilly G. 1997.** Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse. L’HARMATTAN, Paris, pp: 11-19.

• **Goldstein J.L., Swain T. 1963.** Changes in tannins in ripening fruits, *Phytochem*. 2371-383.

• **Gonçalves FC, Schneider N, Mello HF, Passos EP, Meurer L, Cirne-Lima E, Paz AHR. 2013.**

Characterization of Acute Murine Dextran Sodium Sulfate (DSS) Colitis: Severity of Inflammation is Dependent on the DSS Molecular Weight and Concentration. *Acta Scientiae Veterinariae*. 41:1142.

• **Gonzalez-Sarrias A, Romo-Vaquero M, Garcia-Villalba R, Cortes-Martin A, Selma MV, Espin JC. 2018.** The endotoxemia marker lipopolysaccharide-binding protein is reduced in overweight-obese subjects consuming pomegranate extract by modulating the gut microbiota: a randomized clinical trial. *Mol Nutr Food Res*. 62(11)

• **Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ. 2006.** Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*. 44:4136-41.

• **Gori A, Nascimento LB, Ferrini F, Centritto M, Brunetti C. 2020.** Seasonal and Diurnal Variation in Leaf Phenolics of Three Medicinal Mediterranean Wild Species: What Is the Best Harvesting Moment to Obtain the Richest and the Most Antioxidant Extracts?. *Molecules*, 25, 956; doi: 10.3390/molecules25040956

• **Grabsch H.I. 2013.** Alimentary system. In Underwood's Pathology: A Clinical Approach S.S. Cross, ed. (Elsevier), pp. 731

• **Groschwitz K.R., Hogan, S.P. 2009.** Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124: 3–20.

• **Grubescic R J., Vladimir-Knezevic S., Kremer D., Kalodera Z Et Vukovic J., 2007.** Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia, Bratislava*, Vol. 62/2: 148-156.

• **Gupta A, Singh P.P, Singh P, Singh K, Singh AV, Singh SK, Kumar A. 2019.** Medicinal Plants under Climate Change: Impacts on Pharmaceutical Properties of Plants: Chapter 8 in *Climate Change and Agricultural Ecosystems*. ISBN 978-0-12-816483-9, DOI: 10.1016/B978-0-12-816483-9.00008-6. 55p.

• **H. Yu, L.-H. Wu, Z.-L. Xu, D. Dong, and S.-A. He. 2011.** Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS induced IBD model of mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8 p.

• **Hagerman, A., And Butler, L. G., 1989,** Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin, *J. Chem. Ecol*. 15: 1795-1810.

• **Hall, L. J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K & Melgar, S. 2011.** Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Digestive diseases and sciences*, 56(1): 79-89.

• **Halliwell B. 2006.** Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*. 141(2): 312–322. Doi: 10.1104/pp.106.077073

• **Hammada T, Lemdaoui M.-C., Boutra F., Zoughailech D. Asselah H .2010.** Aspects épidémiologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans une population algérienne. *J. Afr. Hépatol. Gastroentérol*. 5:293-302. DOI 10.1007/s12157-011-0327-6

• **Hammoudi R, Hadj-Mahammed M, Ould El-Hadj MD. 2013.** Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Teucrium polium geyrii* (Labiatae). *J Med Plant Res*. 7(20):1506-1510. doi:10.5897/jmpr13.5082

• **Han DS, Li F, Holt L, Connolly K, Hubert M, et al. 2000.** Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279: G1011–G1022,

• **Hasani P., Vasa N., Mohammadirad A., Dehghani G., Abdollahi M.; 2007.** *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium* as compared to α-tocopherol. *Acta Pharm.* ; 57 ; 123-129

• **Hashem-Dabaghian F, Shojaii A, Asgarpanah J & Entezari M. 2020.** Anti-Mutagenicity and Apoptotic Effects of *Teucrium polium* L. Essential Oil in HT29 Cell Line. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 15(3):e79559.doi: 10.5812/jjnpp.79559

• **Haslam, E., 1965,** Galloyl esters in the *Aceraceae*, *Phytochem*. 4: 495-498.

- **Hassan MM, Muhtadi FJ, Al-Badr AA. 1979.** GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. *J Pharm Sci.* 68(6):800-801. doi:10.1002/jps.2600680639
- **Hassan S.M., Gutierrez O., Haq A.U., Byrd J.A., Bailey C.A., Cartwright A.L., 2007.** Saponin-rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities. *Poult. Sci.*, 86:121.
- **Heath, J.W., A. Stevens, and B. Young.2008.***Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather.* De Boeck ed.
- **Heleno S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R., Ferreira, I.C. 2015.** Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173: 501-513.
- **Herber D, Seeram NP., Wyatt H. 2007.** Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin enriched poly-phenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *J Agric Food Chem* 55:10050-10054
- **Hertog M. G. 1996.** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.* 55: 385-397.
- **Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyouss B., 2004.** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43–50.
- **Hodge H. C., Sterner J. H. 1949.**Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 10 (4): 93-96.
- **Hoensch HP, Oertel R. 2015.** The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental.* 3: 8-14. DOI:10.1016/j.clnex.2015.09.001.
- **Hoensch HP, Weigmann B. 2018.** Regulation of the intestinal immune system by flavonoids and its utility in chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol .* 24(8): 877-881.
- **Holgersen K, Kvist PH, Hansen AK, Holm TL. 2014.** Predictive validity and immune cell involvement in the pathogenesis of piroxicam-accelerated colitis in interleukin-10 knockout mice. *International Immunopharmacology.* 21:137–147.
- **Mohammadhosseini, M. 2015.** Chemical Composition of the Essential Oils and Volatile Fractions from Flowers, Stems and Roots of *Salvia multicaulis* Vahl by Using MAHD, SFME and HS-SPME Methods. *Journal of Essential Oil Bearing Plants,* 18(6), 1360–1371. doi:10.1080/0972060x.2015.1024447
- **Hulpiau, P., and van Roy, F. 2009.** Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 349-369.
- **Huseini HF, Abdolghaffari AH, Ahwazi M, Jasemi E, Yaghoobi M, and Ziaee M. 2019.** Topical Application of *Teucrium polium* Can Improve Wound Healing in Diabetic Rats. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 7, DOI: 10.1177/1534734619868629
- **Hu YJ, Wang YD, Tan FQ, Yang WX .2013.** Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol Biol Rep* 40(11): 6123-42
- **I. Bozov P, N. Penchev P. 2019.** Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* (rouy) D. Wood. *Phytochemistry Letters* 31 : 237–241.
- **Ignat I, Volf I, Popa V I. 2011.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- **Imahori Y., Takemura M., Bai J. 2008.**Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol Technol* 49:54–60.
- **Inouye S Takizawa T and Yamaguchi H. 2001.**Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 47, 565-573.
- **Iriadam, M., Davut, M., Haice, G., Baba F.S. 2005.** Effects of two Turkish medicinal plants *Artemisia herba-alba* and *Teucrium polium* on blood glucose levels and other biochemical parameters in rabbits. *J. Cell. Molecul. Biol.* 5:19-24.

- **Ismail T., Sestili P., Akhtar S. 2012.** Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology* 143 : 397–405.
- **Jacinto, A.M.T. 2018.** Review of the Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Properties of *Punica granatum* L., (Lythraceae) Plant. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2(3): 71-83. <http://dx.doi.org/10.26855/jsfa.2018.03.004>
- **Jagtap AG, Niphadkar PV, and Phadke AS. 2011.** Protective effects of aqueous extract of *Bombax malabaricum* DC on experimental models of inflammatory bowel disease in rats and mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 49: 343-351.
- **Jandari S, Hatami E, Ziaei R, Ghavami A, Yamchi AM. 2020.** The effect of pomegranate (*Punica granatum*) supplementation on metabolic status in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis, *Complementary Therapies in Medicine*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102478>
- **Jandhyala S.M. 2015.** Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* 21, 8787.
- **Janero D R.1990.** As Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 9: 515-540,
- **Jbir R, Hasnaoui N, Mars M, Marrakchi M, Trifi M.2008.** Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. *Scientia Horticulturae*; 115(3):231-7.
- **Kabouche A., Kabouche Z., Ghannadi A., Sajjadi S.E., 2007.** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *Aurasiacum* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19:44-46
- **Kachkoul R, Houssaini TS, Mohim M, El Habbani R, and Lahrichi A. 2020.** Chemical Compounds Identification and Antioxidant and Calcium Oxalate Anticrystallization Activities of *Punica granatum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 14, Article ID 9424510, <https://doi.org/10.1155/2020/9424510>
- **Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G. 2007.** Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J. Ethnopharmacol.* 113:510-516.
- **Kandylis P and Kokkinomagoulos E. 2020.** Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods*, 9, 122.
- **Kanko C, Sawaliho Be, Kone S, Koukoua G, N'guessan Yt. 2004.** Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie* 7 :1039–1042.
- **Kapsenberg M.L.2003.** Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *NatRev Immunol.* 3 (12): 984-93.
- **Kebede S., Afework M., Debella A., Ergete W. and Makonnen E.2016.** Toxicological study of the butanol fractionated root extract of *Asparagus africanus* Lam., on some blood parameter and histopathology of liver and kidney in mice. *BMC Res Notes*. 9:49.
- **Kerbouche L., Hazzit, M., Ferhat, M.A., Baaliouamer, A., Miguel, M.G., 2015.** Biological activities of essential oils and ethanol extracts of *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. *J. Essen. Oil-Bear. Plants* 18:1197– 1208.
- **Khader M., Eckl, P.M., Bresgen, N. 2007.** Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. *J.Ethnopharmacol.* 112 :199-202.
- **Khan M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., Khan, N.A. 2015.** Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 462.
- **Khani A., Heydarian M., 2014.** Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 956-961. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60169-3.
- **Khazaei M, Nematollahi-Mahani SN, Mokhtari T, Sheikhabaei F. 2018.** Review on *Teucrium*

polium biological activities and medical characteristics against different pathologic situations. *J Contemp Med Sci* . 4(1): 1–6

• **Khleifat K, Shakhanbeh J, Tarawneh K. 2002.** The chronic effects of *Teucrium polium* on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat. *Turk J Biol.*26: 65- 71.

• **Khoramian Tusi S, Jafari A , Marashi SMA, Niknam SF, Farid M and Ansari M. 2020.** The effect of antimicrobial activity of *Teucrium polium* on Oral Streptococcus Mutans: a randomized cross-over clinical trial study. *BMC Oral Health.* 20:130. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01116-4>

• **Kikuchi K, Matsuo M, Nabeta C, Akahoshi A and Minami H. 2019.** Element diet regulates intestinal permeability and antibody production in indomethacin-induced intestinal injury rats. *J Nutr Sc Vitaminol*, 65: 31-37.

• **Kim M, Chung K-S, Hwang S-J, Yoon YS, Jang YP, Lee JK and Lee K-T. 2020.** Protective Effect of *Cicer arietinum* L. (Chickpea) Ethanol Extract in the Dextran Sulfate Sodium-Induced Mouse Model of Ulcerative Colitis. *Nutrients.*12, 456. Doi: 10.3390/nu12020456.

• **Kim, J.S., Han, D., Moon, D.K., and Rhee, J.S. 1994.** Measurement of superoxide dismutase-like Activity of natural antioxidants. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 59(5): 882-826.

• **Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman PB, Warber S, Bolling S, Chang SC. 2003.** Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agric Food Chem*, 51:3973–3976.

• **Kirthikar K.R., Basu B.D., 2000.** *Punica granatum* In: Indian Medicinal Plants. *Sri Satguru Publications*, 5: 1508-1513

• **Kohen R, Nyska A. 2002.** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol.* 30: 620- 650.

• **Krache I, Boussoulaim N. , Ouhida S., Amraoui N., Baghiani A., Arrar L. 2017.** Acute and Chronic Effects of Methanolic Extract of *Teucrium polium* on Blood Parameters and Histopathology of Liver and Kidney in Female Rats. *AJRIMPS*, 2(3): 1-11.

• **Kruidenier L, Verspaget HW. 2002.** Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther*; 16:1997- 2015.

• **Ksouri R, Megdiche W, Jallali I, Debez D, Magné M, Hiroko I, Abdelly C H. 2012.** Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4): 289-326.

• **Kucharzik T. Luger N., Rautenberg K., Luger A. 2000.** Role of M Cells in Intestinal Barrier Function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 915: 171-183.

• **Kulkarni A.P., Aradhya S.M., 2005.** Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry* 93, 319–324

• **Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Schölmerich, J et Rüschhoff, J. 2001.** Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *International journal of colorectal disease*, 16(4), 238-246

• **Kumar M, Tomar M, Punia S, Amarowicz R & Kaur C. 2020.** Evaluation of Cellulolytic Enzyme-Assisted Microwave Extraction of *Punica granatum* Peel Phenolics and Antioxidant Activity. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00859-3>

• **Kumar S., & Pandey A.K. 2013.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J*, 162750. doi:10.1155/2013/162750.

• **Kume H, Okazaki K, Takahashi T, Yamaji T. 2014.** Protective effect of an immune- modulating diet comprising whey peptides and fermented milk products on indomethacin- induced small-bowel disorders in rats. *Clinical Nutrition.* 1-7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.12.014>. Article in press.

• **Kurtzberg, J., Prockop S., Teira P, Bittencourt H, Lewis V, et al. 2014.** Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory

acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 20(2): 229-235

• **Laganà P, Anastasi G, Marano F, Piccione S, Singla R K., Ashok K. , Coniglio MA, et al. 2019.** Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *Journal of AOAC International*. 102 (5), 1378-1387.

• **Lanas A, Scarpignato C.2006.** Microbial flora in NSAID-induced intestinal damage: a role for antibiotics? *Digestion*. 73 (Suppl 1):136-50.

• **Lanas, A., Goldstein, J., Chan, F., Wilcox, C., Peura, D., Li, C., et al. 2012.** Risk factors associated with a decrease ≥ 2 g/dLin haemoglobin and/or $\geq 10\%$ haematocrit in osteoarthritis patients taking celecoxib or a nonselective NSAID plus a PPI in a large randomised controlled trial (CONDOR). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 36: 485– 492.

• **Langella P, Bouix C.novembre 2016.** Le microbiote intestinal, un organe a part entiere. Le quotidien du pharmacien.

• **Lansky EP, Newman RA, 2007.** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 177-206.

• **Larrey, D., Vial, T., Pauwels, A., Castot, A., 1992.**Michel, H. Hepatitis after germander (*Teucrium chamaedrys*) administration: another instance of herbal medicine hepatotoxicity. *Ann. Intern. Med.* 117: 129-132.

• **Lattanzio V., Di Venere D., Linsalata V., Bertolini P., Ippolito A. et Salerno M., 2001.** Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 5817-5821.

• **Lee HC, Jenner AM, Low CS et al. 2006.** Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol* 157:876–884

• **Lee HJ, Rha MY, Cho YY, Kim ER, Chang DK. 2012.** A case of protein supplement effect in protein-losing enteropathy. *Clin Nutr Res.*1: 94-98.

• **Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O et al.2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* 30 : 1076 – 1081.

• **Lemos MF, Lemos MF, Pacheco HP, Endringer DC, Scherer R .2015.** Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Ind Crops Prod* 70:41–47. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.062>

• **Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.

• **Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene A., et al 2011.** Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141, 227–236. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>

• **Levayer R .2012.** Regulation of intercellular adhesion during epithelial morphogenesis. *Biol Aujourd'hui* 206(3): 219-36.

• **Levin, G. M. 1994.** Pomegranate (*Punica granatum*) plantgenetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter* 97: 31.

• **Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S.2006.**Evaluation ofantioxidant properties of pomegranate peel extract in comparisonwith pomegnate pulp extract. *Food Chem* 96:254- 260.

• **Liang, B., Huang, X.H., Zhang, G.S., Zhang, F., Zhou, Q., 2006.** Effect of lanthanumon plants under supplementary ultraviolet-B radiation: effect of lanthanum onflavonoid contents in soybean seedlings exposed to supplementary ultraviolet-Bradiation. *J. Rare Earths* 24, 613– 616.

• **Lianopoulou V., Bosabalidis AM. 2014.** Traits of seasonal dimorphism associated with adaptation to cold stress in *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21:17. <http://www.jbiolres.com/content/21/1/17>

• **Lianopoulou V., Bosabalidis AM., Patakas A., Lazari D., Panteris E. 2014.**Effects of chilling stress on leaf morphology, anatomy, ultrastructure, gas exchange, and essential oils in the seasonally dimorphic plant *Teucrium polium* (Lamiaceae). *Acta Physiol Plant.* 36: 2271-2281. DOI:

10.1007/s11738-014-1605-x.

- **Lin HV, Frassetto A, Kowalik Jr E J, Nawrocki AR, Lu M M, et al. 2012.** Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE* 7, e35240.
- **Ling K-H, Yim Wan ML, El-Nezami H, Wang M. 2016.** Protective capacity of resveratrol, a natural polyphenolic compound against deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation. *Chem. Res. Toxicol.*, Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00001
- **Lis-Balchin M. 2002.** « Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium* ». CRC Press, Taylor & Francis, London, pp: 116-217.
- **Loftus EV .2004.** Epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 6:1504-17.
- **Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Surís-Valls, R., Aldeguez, X., Sabat-Mir, M., et al, 2016.** Changes in the Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 22: 28-41. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000590>
- **Lu Y, Foo LY. 2001.** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 75(2):197-202. Doi: 10.1016/S0308- 8146(01)00198-4.
- **Lugasi A, Hovari J, Sagi K.V, Biro L. 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedensis.* 1(4): 119-125.
- **M. Yusefi, K. Shameli, R.R. Ali, S.-W. Pang, S.-Y. Teow. 2020.** Evaluating Anticancer Activity of Plant-Mediated Synthesized Iron Oxide Nanoparticles Using *Punica granatum* Fruit Peel Extract, *Journal of Molecular Structure*. Pre-proof. *Journal of Molecular Structure* doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127539>.
- **Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A .2013.** Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6(4): 666-77
- **Macheix J-J., Fleuriet A. & Sarni Manchado., 2005.** Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: les polyphénols en agroalimentaire, Ed : Cheynier V., Sarni Manchado P. *Lavoisier*, Paris: 510 P.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. 2000.** Fruit phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- **Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux- Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- **Maestri DM, Nepote V, Lamarque AL, Zygadlo JA. 2006.** Natural products as antioxidants. In: Imperato F, ed. *Phytochemistry: Advances in Research*; p. 105-135.
- **Mahboubi A, Asgarpanah J, Sadaghiyani PN, Faizi M. 2015.** Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:366. DOI 10.1186/s12906-015-0887-x
- **Mahmoud A., Nawwar M., Sahar A., Husein M., Merfort I. 1994.** NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 36: 793-798.
- **Mahmoudabady M, Haghshenas M, Niazmand S. 2018.** Extract from *Teucrium polium* L. protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury. *Adv Biomed Res.* 7:15. doi:10.4103/abr.abr_218_16.
- **Mahmoudi R, Nosratpour S. 2013.** *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *Int Food Res J.* 20(4):1697-1701.
- **Manach C., Scalbert A., Remesy C., Morand C. 2006.** Consommation et disponibilité des polyphénols. In: Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier (Ed). *Paris, Lavoisier.* 361–380.

- **Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. 2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 230S-242S.
- **Manach, C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004.** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.
- **Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, et al .2016.** The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65(2): 330-9
- **Marín M, Giner RM, Ríos J-L, Recio MC.2013.** Intestinal anti- inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models Of mice colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 150: 925–934.
- **Marklunds And Marklund G. 1974..** Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47,469-474
- **Marteau P, Lepage P, Mangin I, et al. . 2004.** Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 20:18–23.
- **Mattei A, Rucay P, Samuel D, Feray C, Reynes M, Bismuth H. 1995.** Liver transplantation for severe acute liver failure after herbal medicine (*Teucrium polium*) administration. *J Hepatol* 22: 597.
- **Mayer, L., W. M. Pandak, et al. 2013.** Safety and tolerability of human placenta-derived cells (PDA001) in treatment-resistant crohn's disease: a phase 1 study. *Inflamm Bowel Dis* 19(4): 754-760.
- **Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. & Kasper, D. L.2005.** An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122, 107–118.
- **Mazokopakis E, Lazaridou, S., Tzardi, M., Mixaki, J. Diamantis, I. Ganotakis, E. 2005.** Acute cholestatic hepatitis caused by *Teucrium polium* L. *Phytomed.* 11: 83-84
- **Mditshwa, A., Fawole, O.A., Al-Said, F., Al-Yahyai, R., Opara, U.L., 2013.** Phytochemical content, antioxidant capacity and physicochemical properties of pomegranate grown in different microclimates in South Africa. *S. Afr. J. Plant Soil.* 30, 81–90.
- **Medzhitov, R. 2007.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819-826.
- **Meerts, I. A., C. M. Verspeek-Rip, Buskens CA, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, et al. 2009.** Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol*, 47(6): 1085-1092.
- **Meguellati H., Ouafi S., Saad S., Djemouai N. 2019.** Evaluation of acute, subacute oral toxicity and wound healing activity of mother plant and callus of *Teucrium polium* L. subsp. geyrii Maire from Algeria *South African Journal of Botany.* 127:25–34.
- **Mehrabani D, Rezaee A, Azarpira N, Fattahi MR, Amini M, Tanideh N, et al.2009.** The healing effects of *Teucrium polium* in the repair of indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Saudi Med J.* 30:494–499.
- **Melgarejo Sanchez P, Nunez Gomez D , J. Martinez Nicolas J, Hernández F, Legua P and Melgarejo P. 2021.** Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. *Bioresour. Bioprocess*, 8:2. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00351-5>
- **Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. 2010.** Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 3, 247– 259.
- **Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F., 2009.** Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115: 679–686
- **Menozi A., Pozzoli C., Poli E., Passeri B., Gianelli P., Bertini S.2011.** Diazoxide attenuates indomethacin-induced small intestinal damage in the rat. *European Journal of Pharmacology* 650 ,378–383.
- **McCaskill D, Gershenzon J, Croteau R. 1992.** Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha*

piperita L.). *Planta*. 187(4):445-454. doi:10.1007/bf00199962.

• **Michelsen K.S., Arditi, M. 2007.** Toll-like receptors and innate immunity in guthomeostasis and pathology. *Curr Opin Hematol*, 14(1): 48-54.

• **Miguel MG. 2010.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*. 15(12):9252-9287. doi:10.3390/molecules15129252.

• **Miller H., Zhang J., Kuolee R., Patel G., Chen W. 2007.** Intestinal M cells: the fallible sentinels? *Word J. Gastroenterol*. 13, 1477-1486.

• **Mirdehghan S H, Rahemi M.2007.** Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae* 111: 120–127.

• **Moghaddam Dorafshani M, Jalali M, Reza Nikravesh M, Soukhtanloo M. 2018.** Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers in the Renal Tissue of Rats and Serum Biochemical Parameters After the Administration of Nitrate in Drinking Water and Vitamin C: an Experimental Study. *Iran Red Crescent Med J*. 20(8):e74218. doi: 10.5812/ircmj.74218.

• **Mohseni Salehi Monfared SS, Pournourmohammadi S. 2010.** *Teucrium polium* complex with molybdate enhance cultured islets secretary function. *Biol Trace Elem Res* 133: 236–241.

• **Möller K., 2008 :** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO. 152 P.

• **Monroy AF., Dhindsa RS .1995.** Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimatization-specific genes of alfalfa by calcium at 25_ C. *Plant Cell* 7:321–331

• **Mphahlele R. R., Stander M. A., Fawole O. A., Opara U. L.2014.a.** Effect of fruit maturity and growing location on the postharvestcontents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C and antioxidantactivity of pomegranate juice (cv. Wonderful) *Scientia Horticulturae* 179 .36–45

• **Mphahlele R. R., Fawole O. A., Stander M. A., Opara U. L. 2014.b.** Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Scientia Horticulturae* 178:114–123

• **Mukinda JT, Syce JA.2007.** Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 138–144.

• **Murthy SN, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim S A, Sedergran D J.1993.** Treatment of Dextran Sulfate Sodium Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclospo rin. *Digestive Diseases and Sciences*, 38(9): 1722-1734.

• **Nagarjum S, Dhadde SB, Veerapur VP, Thippeswamy BS, Chandakavathe BN. 2017.** Ameliorative effect of chromium-D-phenylalanine complex on indomethacin-induced inflammatory bowel disease in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.89: 1061-1066.

• **Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S., Ghorbani A. 2005.** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian J Pharmaceut Rs*, 2: 63-79.

• **Nahon S., Seksik P., Lahmek P. 2001.**Thérapeutiques de la maladie de Crohn. *Encycl. Méd. Chir* (Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS), Gastro-enterologie 9-057-G-11

• **Najafzadeh M, Reynolds PD, Baumgartner A, Anderson D. 2009.** Flavonoids inhibit the genotoxicity of hydrogen peroxide (H₂O₂) and of the food mutagen 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) in lymphocytes from patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Mutagenesis*. 24: 405-411. PMID: 19553277. DOI:10.1093/mutage/geb016.

• **Nakamura J, Takada S, Ohtsuka N, Heya T, Yamamoto A, Kimura T, Sezaki H:1983.** An assessment of indomethacin-induced gastrointestinal mucosal damage in-vivo: enhancement of urinary recovery after oral administration of phenolsulfonphthalein in rats. *J Pharm Pharmacol*, 35:369-372.

• **Nandi J, Saud B , Zinkievich JM , Palma DT, Levine TA.2008.** 5-Aminosalicylic Acid Improves Indomethacin-Induced Enteropathy by Inhibiting iNOS Transcription in Rats. *Dig Dis Sci* .53:123–132. DOI 10.1007/s10620-007-9832-2

• **Nandi J, Saud B, Zinkievich J. M, Yang Z-j, Levine R A. 2010.** TNF- α modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol Cell Biochem*.

336:17–24. DOI 10.1007/s11010-009-0259-2.

• **Naovi S.A.H., Khan M.S.Y., Vohora S.B., 1991.** Antibacterial, antifungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fititerapia*, 62: 22 1-228.

• **Naugler, W.E. and M. Karin .2008.** NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 18: 19-26.

• **Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. 2006** Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol*. 176:3070–9.

• **Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K & Ganz, T. 2004.** IL -6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal of Clinical Investigation*, 113(9):1271.

• **Niazmand S., Erfanian Ahmadpoor M., Moosavian M., Derakhshan M. 2008** The positive inotropic and chronotropic effects of Teucrium Polium L. Extract on Guinea Pig Isolated Heart. *Pharmacologyonline*, 2 : 588-594

• **Nieuwenhuijs, V.B., Nieuwenhuijs V B, Verheem A, et al.1998.**The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg*. 228(2):188-93.

• **Ning Y, Ling J, Wu CD. 2015.** Synergistic effects of tea catechin epigallocatechin gallate and antimycotics against oral *Candida* species. *Arch. Oral Biol.* 60, 1565-1570, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.001>.

• **Nishitani Y., Yamamoto K., Yoshida M., Azuma T, Kanazawa K, et al., 2013.** Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: role of the aglycone in NF-κB inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells, *BioFactors*, 39(5): 522–533

• **Nizama-Chapoñan A ., Rodriguez-Liñan O., Paucar-Menacho LM. 2020.** Pomegranate (*Punica granatum*): a functional superfruit with therapeutic properties. *Agroind. sci.* 10(3): 311 – 318

• **Noah TK, Donahue B, Shroyer NF .2011.** Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* 317(19): 2702-10

• **Nourimand, M., Mohsenzadeh, S., Teixeira da Silva, J.A. 2012.** Physiological responses of fennel seedling to four environmental stresses. *Iran. J. Sci. Technol. (Sciences)* 36 (1), 37–46.

• **Nozohour Y, RGolmohammadi, R Mirnejad1, M Fartashvand .2018.** Antibacterial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed and Peel Alcoholic Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Health Centers. *J Appl Biotechnol Rep*.5(1):32-36

• **Nusrat A, Turner JR, Madara JL .2000.** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279: G851-857.

• **O.C.D.E. Organisation de Coopération et Développement Economique n° 423. 2008.** Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques toxicité orale aigue. Méthode de l'ajustement des doses.

• **Oh, P.S., K.T. Lim .2006.** "Plant originated glycoprotein has anti-oxidative and anti- inflammatory effects on dextran sulfate sodium-induced colitis in mouse." *J Biomed Sci* 13: 549-560

• **Ohkawa H., Ohishi, N., Yagi K., 1979.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.

• **Okayama, M., Hayashi S., Aoi Y., Nishio H, Kato S, Takeuchi K. 2007.** Aggravation by selective COX-1 and COX- 2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. *Dig Di Sci* 52: 2095-2103

• **Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R .1990.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3): 694- 702.

• **Oliveira LG, Cunha AL, Duarte AC, Castañon MCMN, Chebli JMF and Aguiar JAK. 2014.**

Positive Correlation between Disease Activity Index and Matrix Metalloproteinases Activity In A Rat Model Of Colitis. *Arq Gastroenterol.* 51(2): 107-112

- **Olivier V., Dunyach-Remy C., Lavigne J-P, Moranne O. 2017.** Micro-inflammation et translocation bactérienne d'origine digestive dans la maladie rénale chronique. *Nephrolther* , <https://doi.org/10.1016/j.nephro>
- **Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. 2012.** Ulcerative colitis. *Lancet.* 380:1606–19.
- **Oussala M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*; (73); 236-244.
- **Oyaizu, M .1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* , 44:307-315.
- **Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F et al. 2016.** The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 8:78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- **Pacifico S, D'Abrosca B , Scognamiglio M , D'Angelo G , Gallicchio M , Galasso S , Monaco P , Antonio F. 2012.** NMR-based metabolic profiling and in vitro antioxidant and hepatotoxic assessment of partially purified fractions from Golden germander (*Teucrium polium* L.) methanolic extract. *Food Chem.* 135: 1957-1967.
- **Padda MS, Picha DH .2008.** Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweet potatoes. *Postharvest Biol Technol* 47:176–180
- **Pandurangan AK, Mohebbali N, Norhaizan ME, Looi CY.2015.** Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Design, Development and Therapy.* 9: 3923–3934.
- **Paradkar P.N., Blum P.S., Berhow M.A., Baumann H, Kuo SM. 2004.** Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine. *Cancer Lett.* **215 (1):** 21-28.
- **Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, et al.2000.**Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology.* **31(4):**858-63. doi: 10.1053/he.2000.5746.
- **Pariente B, Mary J-Y, Danese S, Chowers Y, De Cruz P et al. 2015.** Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* **148:** 52-63.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.015
- **Park, S.W., Kwon, M.J., Yoo, J.Y., Choi, H.J., Ahn, Y.J. 2014.** Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in *Lagerstroemia speciosa* leaves toward human rhinoviruses. *BMC Complementary Altern. Med.* 14, 171. doi:10.1186/1472-6882-14- 171
- **Parsaee H. and Shafiee-Nick R., 2006.** Anti-spasmodic and anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iranian Biomedical Journal*, 10 (3): 145-149.
- **Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM. 2007.** Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol* 110: 323–333.
- **Patel C., Dadhaniya P. , Hingorani L., Son M.G.2008.** Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology* 46 :2728– 2735
- **Perazella M.A. 2009.** Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4:**1275- 1283.
- **Peterson, L. W., & Artis, D. 2014.** Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141.
- **Petruzzelli M, Vacca M, Moschetta A, Cinzia SR, Palasciano G, van Erpecum KJ, et al. 2007.** Intestinal mucosal damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Role of bile salts. *Clin Biochem.* 40:503–10.
- **Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, et al. 2011.**

Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*; 61:78e85. Doi: 10.1136/gutjnl-2011-300370.

• **Pfohl M , A.DaSilva N, Marques E , Agudelo J , Liu C, Goedken M, L. Slitt A, P. Seeram N& Hang Ma .2020.**Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a standardized pomegranate (*Punica granatum*) fruit extract in high fat diet-induced obese C57BL/6 mice, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, DOI: 10.1080/09637486.2020.1849041

• **Pharmacopée Européenne. 2007.** Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France.

• **Piccolella S, Crescente G, Pacifico F, Pacifico S. 2018.** Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly) phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. *Phytochem Rev* <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9558-0>

• **Pickard K, Bremmer AR, Gordon JN, MacDonald TT. 2004.** «Microbiobial-gut interactions in health and diseases». Immune response. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*,vol. 18, p. 271-285.

• **Pillarisetty V. G., Shah A. B., Miller G., Bleier J. I., De Matteo R. P. 2004.** Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition, *The Journal of Immunology*. 172 (2):1009–1017.

• **Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A. 2005.** Advances on the chemistry of furanoditerpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles*, 65:1221-1234

• **Pocock, G. and C.D. Richards .2004.**"Intestin et nutrition." *Physiologie humaine, les fondements de la médecine*. Paris: p 399-444.

• **Poon W. T., Chau T., Lai C. K. , Tse K. Y., Chan Y. C., Leung K. S., Chan Y.W.2008.** Hepatitis induced by *Teucrium viscidum*. *Clinical Toxicology*. **46(9)**: 819–822. DOI: 10.1080/15563650701739590

• **Porath D., Riegger C., Drewe J., Schwager J. 2005.** Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 1172-1180

• **Porras M, Martin MT, Soler M, Vergara P.2004.** Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G58–G64.

• **Porras M, Martin MT, Teran E, Mourelle M, and Vergara P. 2007.** The Nitric Oxide Donor LA-419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydrofuro[3,2-b]furan-3- 1-il)thioacetate] Prevents Intestinal Dysmotility, Bacterial Translocation, and Inflammation in a Rat Model of Enteritis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 324(2) :129189/3291970

• **Potten, C. S., Booth, C., & Hargreaves, D. 2003.** The small intestine as a model for evaluating adult tissue stem cell drug targets. *Cell Proliferation*, 36(3): 115–129

• **Power SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB. 2010.** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 20: 2–14.

• **Pozzoli C, Menozzi A, Grandi D, Solenghi E, Ossiprandi MC., Zullian C, Bertini S., Cavestro GM., Coruzzi G. 2006.** Protective effects of proton pump inhibitors against indomethacin-induced lesions in the rat small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 374:283–291. DOI 10.1007/s00210-006-0121-y.

• **Prinsloo G., Nogemane N. 2018.** The effects of season and water availability on chemicalcomposition, secondary metabolites and biological activityin plants. *Phytochem Rev*. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9567-z>

• **Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95: 664–671.

• **Proestos C., Sereli D., Komaitis M.2004.** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 2004, 95: 44-52.

- **Pulendran, B. 2005** .Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogenrecognition receptors. *J Immunol.* **174**(5): p. 2457-65
- **Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B. 2016.** Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis.* **22**: 487–504. pmid: 26588090
- **Quantanilha AT, Packer L, Szyszlo DJA, Racnelly TL, Davies KJA. 1982.** Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* **393**: 32-47.
- **Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., et al., 2016.** Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415–425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>
- **Quezel P., Santa S. ; 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N. R. S. Paris; 781-799.
- **Quintans-Júnior, L. J., Oliveira, M. G., Santana, M. F., Santana, M. T., Guimarães, A. G., et al. 2011.**α-Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharmaceutical biology*, **49**(6): 583-586.
- **Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B. et al. 2004.** Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* **126**: 520-528.
- **Rahmouni F, Badraoui R, Amri N, Elleuch A, El-feki A, Rebai T, Saoudi M. 2019.** Hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats induced by carbon tetrachloride and the protective effects of *Teucrium polium* and vitamin C. *Journal Toxicology Mechanisms and Methods.* **29**(5):313-321. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1519864>.
- **Rainsford, K., Stetsko, P., Sirko, S., Debski, S. 2003.** Gastrointestinal mucosal injury following repeated daily oral administration of conventional formulations of indometacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs to pigs: a model for human gastrointestinal disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **55**, 661–668.
- **Rajabalian S., 2008.** Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Exp Oncol.*, **30**(2):133-8.
- **Ramnik, G. A. 2014.** Microbial Ecology in States of Health and Disease. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK184832/>.
- **Rasekh H.R, Khoshnood-Mansourkhani M.J., Kamalinejad M. 2001.** Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia.* **72**:937-939.
- **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.
- **Rasekh HR, Yazdanpanah H, Hosseinzadeh L, Bazmohammadi N, Kamalinejad M. 2005.** Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* **4**: 245-249.
- **Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K. 2009.** Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation Allergy: Drug Targets* **8**, 229–235. doi:10.2174/187152809788681029
- **Raza M., Al-Shabanah O.A., El-Hadiyah T.M., Al-Majed A.A., 2002.** Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* **70**, 135–145.
- **Records, T.D. 2019.** Top ten Largest pomegranate producing. Retrieved from <http://www.thedailyrecords.com/2018-2019-2020-2021/world-famous-top-10-list/world-largest-pomegranate-producing-countries-world-statistics/6874/>
- **Reed K. K., Wickam R. 2009.** "Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro."

Seminars in oncology nursing 25(1): 3-14.

• **Reese GE, Constantinides VA, Simillis C et al. 2006.** Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterology*. 2006; 101(10):2410-22

• **Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. 2003.** Flavonoids : Promising anticancer agents. *Medicinal research reviews.*, 23 (4) : 519-539

• **Rington-Zimmer K., Mullié C., Tir-Touil-Meddah A., Buisson P., Léké L., Canarelli J.P.. 2008.** Impact of Colostomy on Intestinal Microflora and Bacterial Translocation in Young Rats Fed with Heat Killed *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Folia Microbiol.* 53 (1), 89–93

• **Rodriguez-Pinto, D. 2005,** B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol*, 238(2):

• **Roitt, I., Brostoff J., Male D. 2002.** Immunologie. d. B. Université Bruxelles : De Boeck Université, p 480.

• **Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. 2009.** Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev*; 67:363-78.

• **Romier, B., J. Van De Walle, A. During, Larondelle Y, Schneider YJ. . 2008.** "Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells." *Br J Nutr* 100: 542-551.

• **Roth I., Lindorf H., 2013.** South American medicinal plants: botany, remedial properties and general use. Springer-Verlag, Berlin, 492p,

• **Ruberto G, Baratta MT. 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69(2):167-174. Doi: 10.1016/S0308-8146(99)00247-2.

• **Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., Hurry, V., 2009.** Cold signalling and cold acclimation in plants, Chapter 2, Elsevier, 49: 35–150

• **Sabzeghabaie A, Asgarpanah J. 2016.** Essential oil composition of *Teucrium polium* L. fruits. *J Essent Oil Res.* 28(1):77-80. doi: 10.1080/10412905.2015.1082947

• **Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadi M.H., 2014.** Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54: 130-134

• **Saema, S., Rahman, L.U., Singh, R., Niranjana, A., Ahmad, I.Z., Misra, P. 2016.** Ectopic overexpression of WsSGTL1, a sterol glucosyltransferase gene in *Withania somnifera*, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic stresses. *Plant Cell Rep.* 35 (1): 195–211.

• **Sainvitu, P., Nott, K., Richard, G., Blecker, C., Jérôme, C., Wathélet, J.-P., Paquot, M., Deleu, M. 2012.** Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(1),

• **Salas-Salvado J., Fernandez-Ballart J., Ros E., Martínez-González M-A, Fitó M et al. 2008.** Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Archives of Internal Medicine.* 168 (22): 2449-2458.

• **Saleh H, Golian A, Kermanshahi H, Mirakzahi MT. 2017.** Effects of dietary α -tocopherol acetate, pomegranate peel, and pomegranate peel extract on phenolic content, fatty acid composition, and meat quality of broiler chickens. *J Appl Anim Res*; 45(1): 629-36

• **Salim, S.Y., J.D. Soderholm, 2011.** Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*.

• **Sallé J-L., 2004 :** Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie. Editions Frison-Roche, 2ème édition. 220 p.

• **Salwe KJ, Sachdev DO, Bahurupi Y, Kumarappan M. 2015.** Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *J Nat Sc Biol Med.* 6:56-62.

• **Sanchez-Munoz, F., A. Dominguez-Lopez and J.K. Yamamoto-Furusho 2008.** "Role of cytokines in inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol* 14: 4280-4288.

- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34 : 3–21.
- Šaponjac V T, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Djilas S. 2016. Chapter 6: Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. *Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland*
- Sarzi-Puttini P, Ardizzone S, Manzionna G, Atzeni F, Colombo E, Antivalle M et al. 2003. Infliximab-induced lupus in Crohn's disease: a case report. *Dig Liver Dis* 2003;35:814–
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55 (6):749–753. doi: 10.1136/gut.2005.082909.
- Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. 2017. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol*. Doi 10.1016/j.tim.2016.12.006. .
- Sauget M, van der Mee-Marquet N, Bertrand X, Hocquet D. 2016. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *J Microbiol Methods*. 127: 20-23.
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. 2008. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità*. 41(2):143-164.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*; 130: 2073S-85S.
- Scalbert, A., Monties, B., Janin, G., 1989, Tannins in wood: comparison of different estimation methods, *J. Agric. Food Chem*. 37: 1324-1329.
- Scarpa M, Stylianou E. 2012. Epigenetics: Concepts and relevance to IBD pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*; 18: 1982-96.
- Schmidt DD, Voelckel C, Hartl M, Schmidt S, Baldwin IT. 2005. Specificity in ecological interactions. Attack from the Same Lepidopteran Herbivore Results in Species- Specific Transcriptional Responses in Two Solanaceous Host Plants 1 [w]. *Plant Phys* 138:1763–1773. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061192.1>
- Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell C J, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. 1994. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology*. 107:643-9. doi: 10.1016/0016-5085(94)90110-4.
- Segain, J.P., Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, et al., 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 47(3): p. 397-403..
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. 2003. Iterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 52: 237-42.
- Seksik P. 2010. Microbiote intestinale et MICI *Gut microbiota and IBD* *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34 : 4-55.
- Sergeant T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. 2010. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact*. 188: 659-67.
- Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A & Deby-Dupont, G. 2003. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét*, 147, 79-93.
- Setiadihi, R., Sufiawati, I., Zakiawati, D., Nur'aeny, N., Hidayat, W., Firman, D.R. 2017. Evaluation of antibacterial activity and acute toxicity of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed ethanolic extracts in swiss webster mice. *Journal of Dentomaxillofacial Science* 2(2): 39- 43. DOI: 10.15562/jdmfs.v2i2.536.
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F., Flores, F.B. 2009. Physiological, hormonal

and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *J. Sci. Food. Agric.* 89 (4), 555–573.

• **Sha T, Igaki K, Yamasaki M, Watanabe T, Tsuchimori N. 2013.** Establishment and validation of a new semi-chronic dextran sulfate sodium-induced model of colitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 15:23–9.

• **Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015.** Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods*, 18, 820–897.

• **Shahraki, M.R., Arab, M.R., Mirimokaddam, E., Palan, M.J. 2007.** The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iranian Biomedical Journal.* 11(1): 65-68.

• **Shakhanbeh J., Atrouche O. 2001.** *Teucrium polium* inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in the rat skin. *Turk J Med Sci*, 2001, 3:15-21.

• **Shapiro, L., Weis, W. I. 2009.** Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003053.

• **Sharafi S M, Balouti A, Hadipour M, Yazdani H, Yousefi M, Darni HY. 2017.** Phenolphthalein Method as a Simple and Low Cost Test for Detection of Fecal Occult Blood. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 22(2): 1-6.

• **Shaygannia E , Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. 2016.** A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine.* 21(3):221-227.

• **Shivnath N, Rawat V, Siddiqui S, Verma S, Gupta P, Rais J , Khan MS, Arshad Md. 2020.** Antiosteoarthritic effect of *Punica granatum* L. peel extract on collagenase induced osteoarthritis rat by modulation of COL-2, MMP-3, and COX-2 expression. *Environmental Toxicology*.1–11. <https://doi.org/10.1002/tox.23005>

• **Side Larbi K, Meddah B, Tir Touil Meddah A , Sonnet P. 2016.** The antibacterial effect of two medicinal plants *inula viscosa*, *anacyclus valentinus* (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 8(2), 244-255.

• **Silburn S, McIvor E, McEntegart A, Wilson H. Guillain-Barre. 2008.** Syndrome in a patient receiving anti-tumour necrosis factor alpha for rheumatoid arthritis: a case report and discussion of literature. *Ann Rheum Dis* .67:575-6.

• **Silva LM, Farias JAM, Boeing T, Somensi LB, Beber AP, Cury BJ, Santin JR, Andrade SF. 2016.** Hydroalcoholic Extract from Inflorescences of *Achyrocline satureioides* (Compositae) Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis in Mice by Attenuation in the Production of Inflammatory Cytokines and Oxidative Mediators. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 15p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3475356>.

• **Silva MA., Jury J, Porras M, , Vergara P, Perdue M H. 2008.** Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction and Dendritic Cell Redistribution during Early Stages of Inflammation in the Rat: Role for TLR-2 and -4 Blockages. *Inflamm Bowel Dis.* 14(5). DOI 10.1002/ibd.20379.

• **Silva MA, Porras M, Jury J, Vergara P, Perdue MH. 2006.** Characterization of Ileal Dendritic Cell Distribution in a Rat Model of Acute and Chronic Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* ;12 (6):457-70. doi: 10.1097/00054725-200606000-00004.

• **Simonnet X., Gaudin M., Jacquemetaz P., Plantini U., Rey C. 2006.** Stade phénologique et qualité des hampes florales du genépi blanc. *Revue Suisse Vitic. Arboric* ; 38 (3) : 189-193.

• **Singer II, Kawka D.W, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson W F. 1998.** Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115(2): 297-306. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70196-9.

• **Singh D.P, Borse S.P, Nivsarkar M. 2016.** A novel model for NSAID induced gastroenteropathy in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.78: 66–75.

• **Singh G, Marimuthu P, de Heluani CS, Catalan CA. 2006.** Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *J Agric Food Chem.*

54(1):174-181. doi:10.1021/jf0518610.

- **Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong GE, Maxwell L, Macdonald JK et al. 2011.** Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst Rev*; CD008794.
- **Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. 2014.** Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, 84, 206-239.
- **Singleton V. L., Rossi J. R. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144–158.
- **Skouti E., Kattah A., Alachkar A., Ben Hedda J., Vincieri F. 2012.** Biochemical, Antinociceptive And Hepatotoxic Effects Of The Chronic Administration Of *Teucrium Polium* Essential Oil In Rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3): 193-197.
- **Smallfield B. 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*
- **Sobczak, M.; Zakrzewski, P.K.; Cygankiewicz, A.I.; Mokrowiecka, A.; Chen, C.; et al. 2014.** Anti- inflammatory action of a novel orally available peptide 317 in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol. Rep.* 66: 741–750, doi:10.1016/j.pharep.2014.03.007.
- **Sokol H, Seksik P. 2010.** The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol*; 26 (4):327–31.
- **Soni U, Brar S, Gauttam VK. 2015.** Effect Of Seasonal Variation On Secondary Metabolites Of Medicinal Plants. *IJPSR*, 6(9): 3654-3662
- **Souli A, Sebai H, Rtibi K, Chehimi L, Sakly M, Amri M, El-Benna J, Marzouki L. 2015.** Inhibitory Effects of Two Varieties of Tunisian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extracts on Gastrointestinal Transit in Rat. *J Med Food*. 18 (9): 1007–1012. DOI: 10.1089/jmf.2014.0110.
- **South AP. 2004.** Plakophilin 1: an important stabilizer of desmosomes. *Clin Exp Dermatol*. 29(2): 161-7.
- **Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. 1999.** Expression of lymphocyte endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 45: 856–863
- **Spahn TW, Kucharzik T. 2004.** Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. Recent advances in basic science». *Gut*. 53: 456-465.
- **Stanković M. S., Stefanović O., Čomić L., Topuzović M., Radojević I., Solujić S. 2012.** Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Cent. Eur. J. Biol.* • 7(4):664-671. DOI: 10.2478/s11535-012-0048-x
- **Starakis I., Siagris D., Leonidou L., Mazokopakis E., Tsamandas A., Karatza C. 2006.** Hepatitis caused by the herbal remedy *Teucrium polium* L. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* .18 (6):681-683.
- **Stasi C, Orlandelli E. 2008.** Role of the brain-gut axis in the pathophysiology of Crohn's disease. *Dig Dis*; 26:156-66.
- **Stecher B, Berry D, Loy A .2013.** Colonization resistance and microbial ecophysiology: using gnotobiotic mouse models and single-cell technology to explore the intestinal jungle. *FEMS Microbiol Rev* 37(5): 793-829
- **Stefkov G., Karapandzova M., Stefova M., Kulevanova S., 2009.** Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 55: 33 – 40.
- **Stewart, A.S., Pratt-Phillips, S., Gonzalez, L.M. 2017.** Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the Leaky Gut in Health and Disease. *Journal of Equine Veterinary Science*, 52:10–22.
- **Stickel, F., Patsenker, E., Schuppan, D. 2005.** Herbal hepatotoxicity. *J. Hepatol.* 43:901- 910.
- **Sudheesh S., Vijayalakshmi N.R., 2005.** Flavonoids of *Punica granatum*-potential antiperoxidative agents. *Fit iterapia*, 76: 181-186.
- **Suzuki T, Hara H. 2009.** Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of

zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J Nutr* . 139:965–74. doi:10.3945/jn.108.100867

• **Suzuki T, Hara H.2010.** Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & Metabolism* 7:19.

• **Suzuki, T., 2013.** Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 631-659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>

• **Sweet MJ, Hume DA.1996.** Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol.*60:8-26.

• **Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening- Baucke V, Ortner M, et al.2002.** Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 122:44-54.

• **Syed D.N., Afaq F., Mukhtar H., 2007.** Pomegranate derived products for cancer - chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 377-385.

• **Talukder J .2019.** Nutraceuticals in Gastrointestinal Conditions, Springer Nature Switzerland AG in R. C. Gupta et al. (eds.), *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_31

• **Tanaka A., Hase S., Miyazawa T., Ohno R., Takeuchi K. 2002.** Role of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 Inhibition in Non steroidal Anti-Inflammatory Drug- Induced Intestinal Damage in Rats: Relation to Various Pathogenic Events. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 303(3):1248- 1254.

• **Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. 2008.** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research*, 7 (3): 1089-1099.

• **Tariq M., Ageel A.M., Al-Yahya M.A., Mossa J.S., Al-Said M.S., 1989.** Antiinflammatory activity of *Teucrium polium*. *Int. J. Tissue React.*, 11: 185-188

• **Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. 2007.** Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 28; 13(20):2826-32. doi: 10.3748/wjg.v13.i20.2826.

• **Teo S., Stirling D., Thomas S., Hoberman A., Kiorpes A., Khetani V., 2002.** A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology* 179: 183–196.

• **Terán-Ventura E., Aguilera M., Vergara P., Martínez V. 2014.** Specific changes of gut commensal microbiota and TLRs during indomethacin-induced acute intestinal inflammation in rats, *J Crohns Colitis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.001>

• **Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus Jr EV. 2010.** Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population- based cohort. *Gastroenterology.* 139:1147–55.

• **Thiéfin G. & Beaugerie L. 2005.** Toxic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Revue du Rhumatisme.* 72: 601–611.

• **Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czejek, M., Michel, G. 2011.** Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Frontiers in Microbiology* 2.

• **Tir Touil Meddah A., Leke L., Romond M. B., Grenier E., Cordnner C ., Risbourg B ., Canarelli J. P . 2001.** The effects of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity, and bacterial translocation in newborn piglets. *Pediatr Surg Int.* 17 :515-520

• **Tsikas D.2017.** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 524; 13e30.

• **Tubaro E, Luisella Belogi, Carla Maria Mezzadri, Enzo Bettelli.2003.** Impact on the bowel of amtolmetin guacyl, a new gastroprotective non-steroidal anti-inflammatory drug. *European Journal of Pharmacology* 467:173– 183.

• **Tulsawani, R., 2010.** Ninety day repeated gavage administration of *Hippophae rhamnoides*

extract in rats. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2483–2489.

• **Turner JR 2009.** Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(11): 799-809.

• **Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. 2015.** Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* ID 938475, 19 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/938475>.

• **Udut, E.V., Zhdanov, V.V., Gur'iantseva, L.A., Minakova, M.I., Dygai, A.M., 2005.** Mechanisms of the erythropoiesis-stimulating effect of skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya* 68: 43–45.

• **Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. 2011.** Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* 141(5): 769-776

• **Van der Flier LG, Clevers H. 2009.** Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71: 241-60

• **Velasco-Negueruela A., Perez-Alonso M. J., 1990.** The Volatiles of six *Teucrium* species from the Iberian Peninsula and the Balearic islands. *Phytochemistry*, 29 (4):1165 -1169.

• **Vemu B, Selvasubramanian S, Pandiyan V. 2015.** Anti-inflammatory activity of emu oil in indomethacin induced inflammatory bowel disease in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 85(3):831–837. DOI 10.1007/s40011-015-0564-3.

• **Vemu B., Selvasubramanian S., Pandiyan V. 2016.** Emu oil offers protection in Crohn's disease model in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.p2-9.Doi 10.1186/s12906-016-1035-y.

• **Verma M, Maruvada P, Srivastava S. 2004.** Epigenetics and cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 41: 585-607.

• **Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J., 2005.** Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24: 44–50.

• **Viuda-Martos M, López-Marcos MC, Fernández-López J, Sendra E, López-Vargas JH, Pérez-Álvarez JA. 2010.** Role of fiber in cardiovascular diseases: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 9(2):240- 258. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00102.x.

• **Vrakas S, Mountzouris K C., Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C , Gazouli M .2017.** Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE* .11p. DOI:10.1371/journal.pone.0170034

• **Vreugdenhil ACE, Rousseau CH, Hartung T, Greve JWM, Van't Veer C, Buurman WA. 2003.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol.* 170:1399–405.

• **W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., et al. 2007.** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.* 137 (3 supp1): 718 s-737 s.

• **Wan, L., Ling, K., Wang, M., El-Nezami, H. 2016.** Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate improves epithelial barrier function by inducing the production of antimicrobial peptide pBD-1 and pBD-2 in monolayers of porcine intestinal epithelial IPEC-J2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* In press.

• **Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang AM, Chen P, Schnabl B. 2015.** Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *Immunol Methods*; 421: 44–53. doi:10.1016/j.jim.2014.12.015.

• **Wang S.Y., Lin H.S., 2000.** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage, *J. Agric. Food Chem.* 48: 140– 146.

• **Wang XD, Parsson H, Andersson R, Soltesz V, Johansson K, Bengmark D. 1994.** Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver

resection in the rat. *Br J Surg*.81 : 579-84.

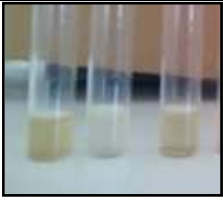
- **Weerakkody, P., Jobling, J., Infante, M.M.V., Rogers, G., 2010.** The effect of maturity, sunburn and the application of sunscreens on the internal and external qualities of pomegranate fruit grown in Australian. *Sci. Hortic.* 124, 57–61.
- **Wei A, Shibamoto T. 2007.** Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *J Agric Food Chem.* 55(5):1737- 1742. doi:10.1021/jf062959x
- **Weiss, G & Goodnough, L. T. 2005.** Anemia of chronic disease. *New England Journal of Medicine*, 352(10):1011-1023.
- **Wera, O., P. Lancellotti, C. Oury. 2016.** *The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases.* *J Clin Med.* 5(12).
- **WHO.2000.** General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. WHO/EDM/TRM/.1.
- **Wink, M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- **Xavier, R.J., and Podolsky, D.K.2007.** Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.
- **Xu L, Yang ZL, Li P, Zhou YQ. 2009.** Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Phytomedicine*.16:989–995.
- **Yamada T, Edwin Deitch, Robert D. Specian, Michael A. Perry, R. Balfour Sartor, Matthew B. Grisham .1993.** Mechanisms of Acute and Chronic Intestinal Inflammation Induced By Indomethacin. *Inflammation*, 17(6).
- **Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW.2001.** The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*; 60: 528-33.
- **Yoon JH, BaekSJ. 2005.** Molecular targets of dietary polyphenols with anti inflammatory properties. *Yonsei Med J*; 46:585-96
- **Yoshida H., Soh H., Sando K., Wasa M., Takagi Y., Okada A. 2003.** Beneficial Effects of *n*-9 Eicosatrienoic Acid on Experimental Bowel Lesions. *Surg Today*, 33:600–605. DOI 10.1007/s00595-003-2572-9.
- **Yuan G, Sinclair AJ, Xu C, Li D.2009.** Incorporation and metabolism of punicic acid in healthy young humans. *Mol Nutr Food Res.* 53(10):1336-42. Doi: 10.1002/mnfr.200800520. PMID: 19753607.
- **Yuniarti WM, Primarizky H, Lukiswanto BS. 2018.** The activity of pomegranate extract standardized 40% ellagic acid during the healing process of incision wounds in albino rats (*Rattus norvegicus*), *Veterinary World*, 11(3): 321-326.
- **Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., Perdu, E. 2011.** Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82: 424–430.
- **Zaouali Y, Chograni H, Trimech R, Boussaid M. 2013.** Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Ind Crops Prod.* 43(1):412-419. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.044.
- **Zarei M., Azizi M., Bashir-Sadr Z., 2011.** Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening. *Fruits* 66: 121–129.
- **Zengin H, Baysal AH. 2014.** Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules.* 19(11):17773-17798. doi:10.3390/ molecules191117773.
- **Zhang H., Wu H., Liu L., Li H., Shih D. Q., Zhang X., 2015.** 1, 25- dihydroxyvitamin D3 regulates the development of chronic colitis by modulating both T helper (Th) 1 and Th17 activation. *APMIS*, 123(6): 490–501.

Annexes

Annexe 1 : Stratégie thérapeutique

Traitement	Mode d'action	Effets indésirables
Les 5-ASA mésalazine : Pentasa [®] Fivasa [®] (Curkovic <i>et al.</i> , 2013). sulfasalazine: Salazopyrine [®]	- propriétés anti-inflammatoires : l'inhibition des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires « prostaglandines et leucotriènes », du chimiotactisme des neutrophiles et de l'activation du facteur de transcription NFκB - une activité anti-oxydante (Iacucci <i>et al.</i>, 2010)	la fièvre, les nausées, la céphalée, les réactions allergiques, la thrombopénie, la leucopénie, la toxicité hépatique, asthénie et vertiges, néphropathies, péricardite, myocardite, pancréatite et pneumopathie
Corticoides <i>Action locale</i> budénoside « Entocort [®] » <i>Action systémique</i> prednisone « Cortancyl [®] », prednisolone « Solupred [®] » (PO) Solumédrol (IV) methylprednisolone hémisuccinate	agit sur la synthèse des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, histamine et prostaglandines) par l'intermédiaire d'une inhibition de la production de l'acide arachidonique	syndromes de Cushing, l'hypokaliémie, nervosité, insomnie ou saute d'humeur, des réactions cutanées, des crampes musculaires ou encore des troubles menstruels Hydroélectrolytiques, effets endocriniens et métaboliques (syndrome de Cushing, diabète, freination de l'axe hypothalamohypophysaire), musculo-squelettiques (ostéoporose, amyotrophie, ostéonécrose de la tête fémorale), neuropsychiques et oculaires (cataracte, glaucome).
Immunosupresseurs l'azathioprine « Imurel [®] », 6-mercaptopurine « Purinéthol [®] », le méthotrexate	réduit la prolifération lymphocytaire par l'interférence avec la synthèse des acides nucléiques purinergiques (Pithadia and Jain 2011).	Hématotoxicité, risque accru de mélanome, intolérance digestive Leucopénie, pancréatite aiguë, fièvre, éruption cutanée, alopecie, risque accru de lymphome Térogène, thrombopénie, anémie, perturbation bilan hépatique
Biothérapies ciblées Anticorps monoclonaux anti-TNFα : l'infliximab (Rémicade [®]), l'adalimumab (Humira [®]) et le golimumab (Simponi [®]). Anticorps anti-α4β7 : vedolizumab (Entyvio [®]). Anticorps Ustekinumab (Stelara [®])	Inhibe directement la cytokine TNF-α Agit en bloquant l'intégrine α4β7, Bloque les cytokines IL-12/IL-23,	risques de développement d'allergie, de tuberculose, de pneumonie, d'insuffisance cardiaque, d'hépatite, de maladies neurologiques démyélinisantes ou encore de lymphome.

Annexe 2 : Screening phytochimique

	Méthode	Résultats
Flavonoïdes	10 g de plante, mise en poudre, est pesé puis mélangé à 100 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration on ajoute NH_4OH au filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes (Majaw and Moirangthem, 2009).	
Tannins	10g de plante, mise en poudre, on extrait par l'alcool éthylique 50%, puis on filtre. À 1 ml de l'extrait est ajouté 200 μl de FeCl_3 1 %. Leur présence est indiquée par une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu-noir (tanins gallique) (Karumi <i>et al</i> , 2004).	
Anthocyanes	On ajoute quelques gouttes d'HCl, puis quelques gouttes d'ammoniac (NH_4OH) à l'infusé à 10 %. Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.	
Coumarines	5 ml de l'extrait Ether di éthylique est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans l'eau chaude 2 ml. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml NH_4OH 25 %, ensuite, une goutte de chaque tubes est prélevée puis déposée sur un papier filtre et observation sous U.V. à 366 nm (Bruneton, 1999). Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH_4OH .	
Terpènes et Stérols	5 g de la poudre sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée. Le résidu est dissout dans 0.5 ml d'acide acétique (CH_3COOH) en ajoutant 1 ml d'Acide Sulfurique (H_2SO_4) concentré, dans la zone de contact entre les deux liquides. S'il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, ceci indique la présence des terpènes et stérols.	
Saponines	2 g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides (Majaw and Moirangthem, 2009).	
Alcaloïdes	Après macération de 5g de plante séchée et broyée dans 50 ml d'HCl à 1 %, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer qui provoque un précipité blanc indiquant la présence des alcaloïdes (Bouquet, 1972 ; Majob <i>et al</i> , 2003).	

Annexe 3 : Réactifs & milieux utilisés

A. Réactifs

- ✓ **Kastle-Meyer** : 2g phénolphtaléine, 25g hydroxyde de potassium, 100 ml eau distillée 0.2 g zinc ;

La phénolphtaléine réduite par le zinc est incolore en solution alcaline, en présence de peroxyde d'hydrogène et la peroxydase du globule rouge oxyde la phénolphtaléine (une couleur rose).



- ✓ **Réactif de Mayer** (alcaloïdes) : 25 g Iodure de potassium (KI), 6.8 g chlorure mercurique (HgCl_2), 1000 ml l'eau distillée.

B. Solutions

PBS : 8g chlorure de sodium, 0.2 g chlorure de potassium, 1.15g phosphate disodique, 0.2g phosphate mono potassique, pH 7.3.

Ranger : 2.25g chlorure de sodium, 0.105g chlorure de potassium, 0.12g chlorure de calcium $6\text{H}_2\text{O}$, 0.05g bicarbonate de sodium, 500 ml eau distillée, pH 7.0.

C. Milieux de culture

Mac Conkey : 20.0 g peptone, 1.0 g sels biliaires, 0.00.1 g cristal violet, 10.0g lactose, 0.05g rouge neutre, 5.0g chlorure de sodium, 15.0g agar, pH 7.1.

MRS : 10 g peptone, 10 g extrait de viande, 5 g extrait de levure, 20 g glucose, 1 ml Tween 80(polysorbate 80), 2 g phosphate dépotassique, 5 g acétate de sodium, 2 g citrate triammonique, 200 mg sulfate de magnésium, 50 mg sulfate de manganèse, 15 g agar, pH 6.5.

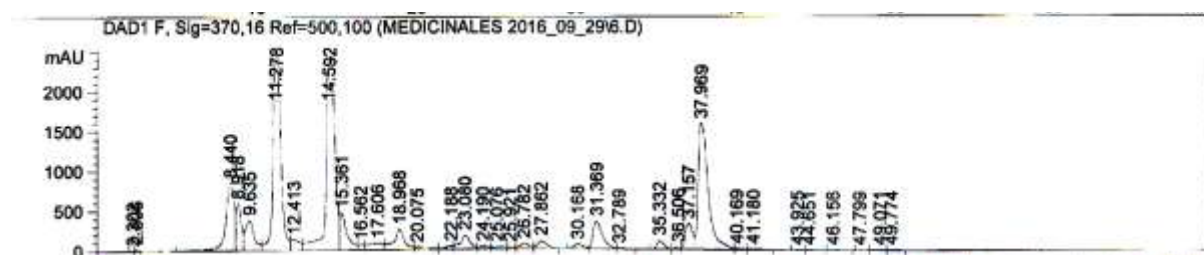
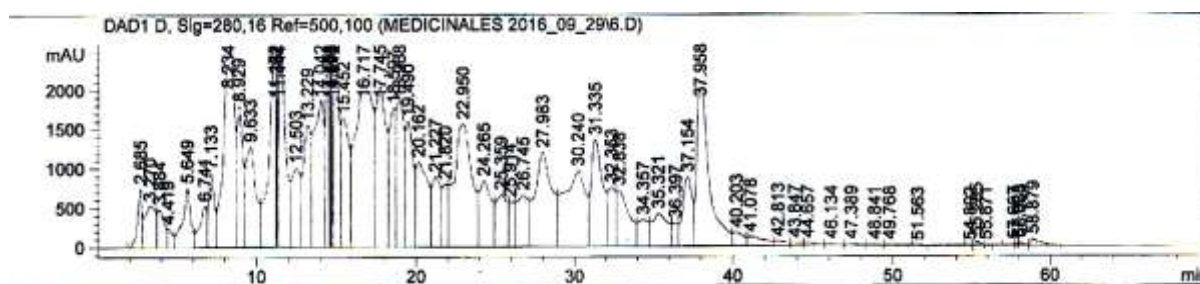
Columbia : 23 g peptones, 1.0 g amidon, 5g chlorure de sodium, 10g agar, pH 7.3 ± 0.2 .

Schaudler : 10g tryptone soja, 5g peptone, 5g extrait de levure, 5g glucose, 0.4g chlorhydrate de cystéine, 0.01g hémine, 0.75g tampon Tris, 13.5 g agar, pH 7.6 ± 0.2 .

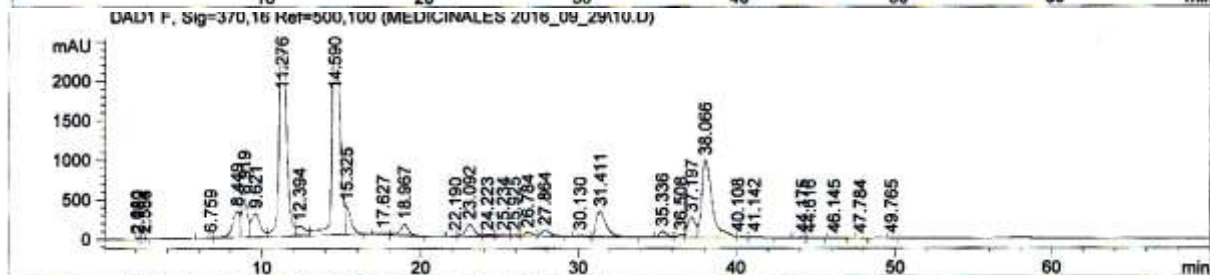
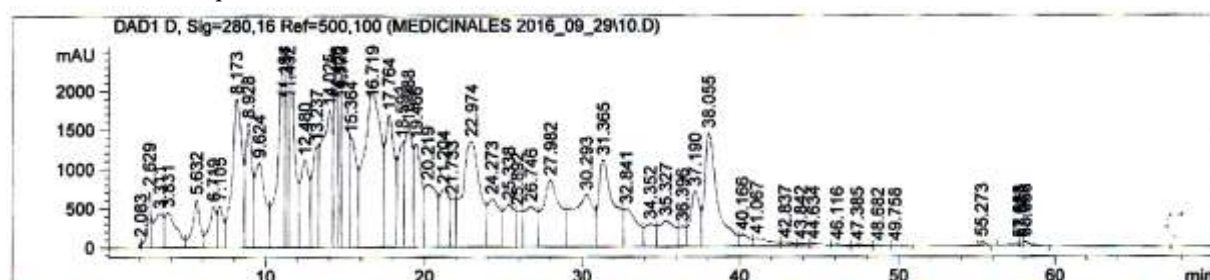
OGA : 5g extrait de levure, 20g glucose, 12 g agar, 0.10 g Oxytétracycline, pH 7 ± 0.2 .

Annexe 4 : Profil chromatographique des extraits phénoliques obtenu par HPLC-DAD

1) Extrait méthanolique F2E

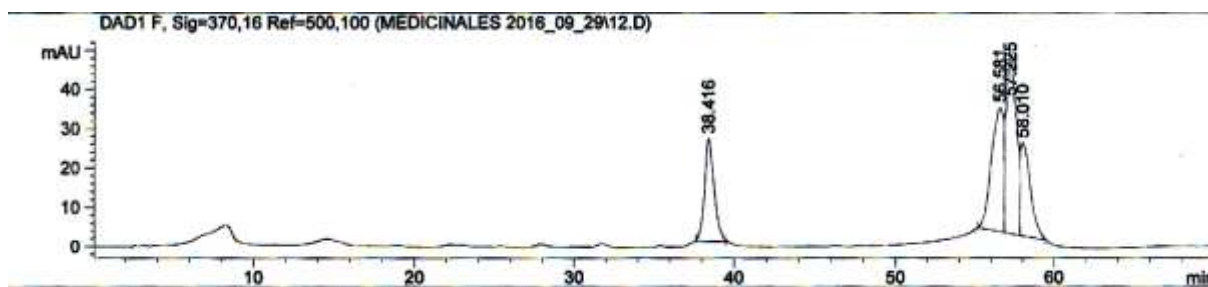


2) Extrait méthanolique B2E

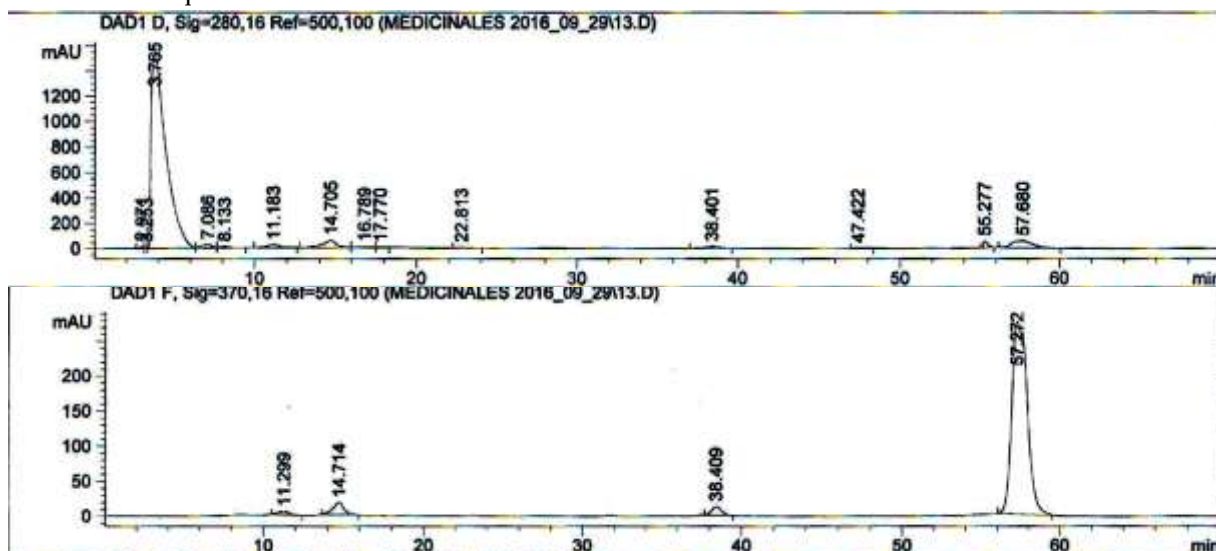


3) Extrait acétonique F2E

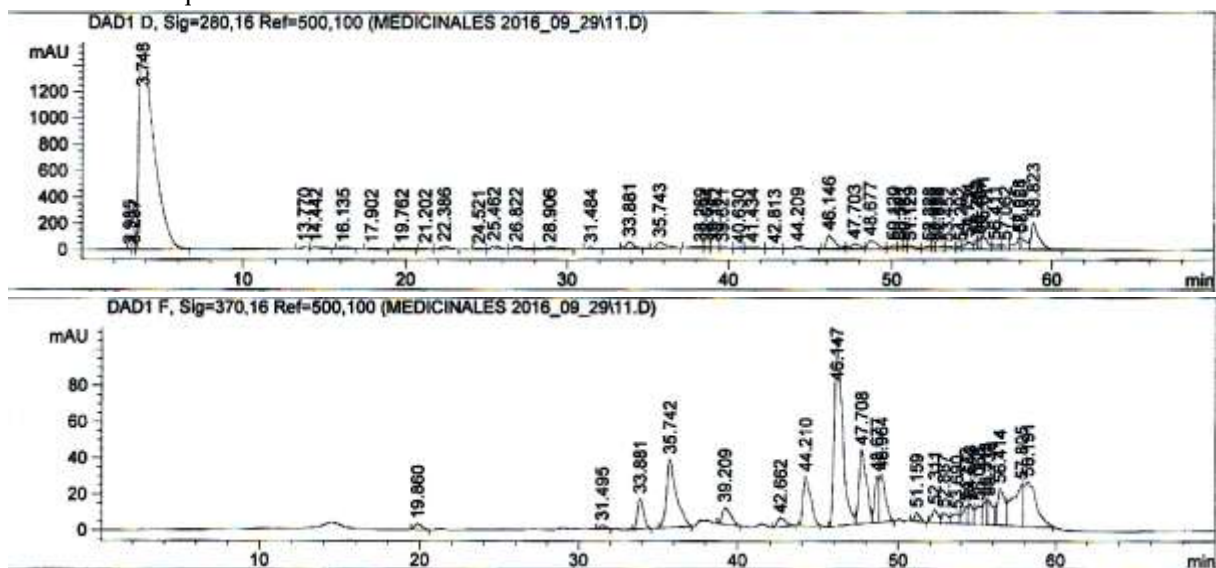




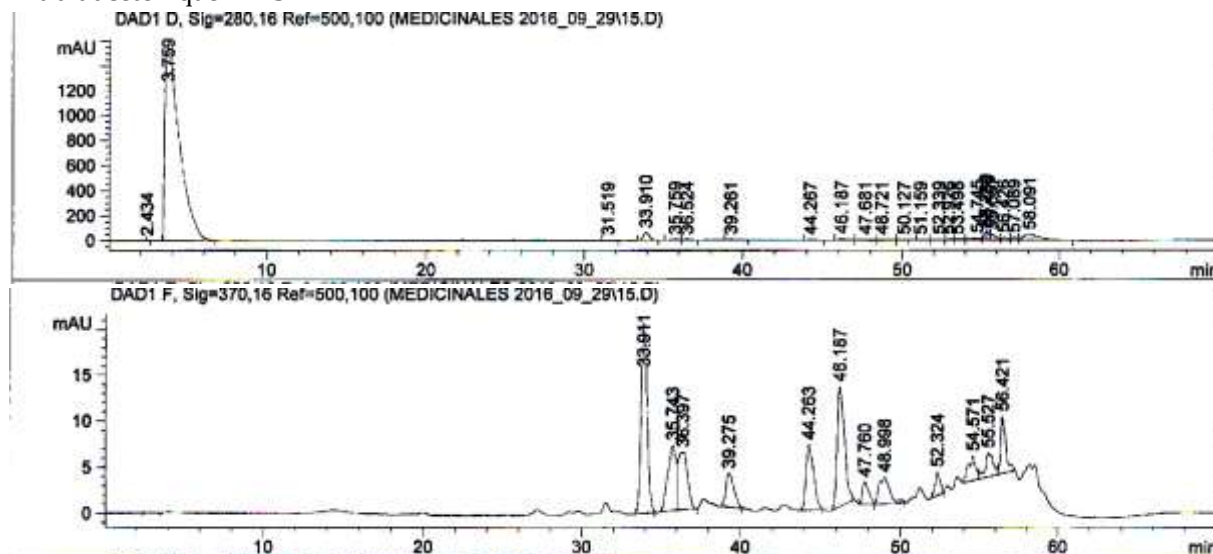
4) Extrait acétonique B2E



5) Extrait acétonique TP-S1

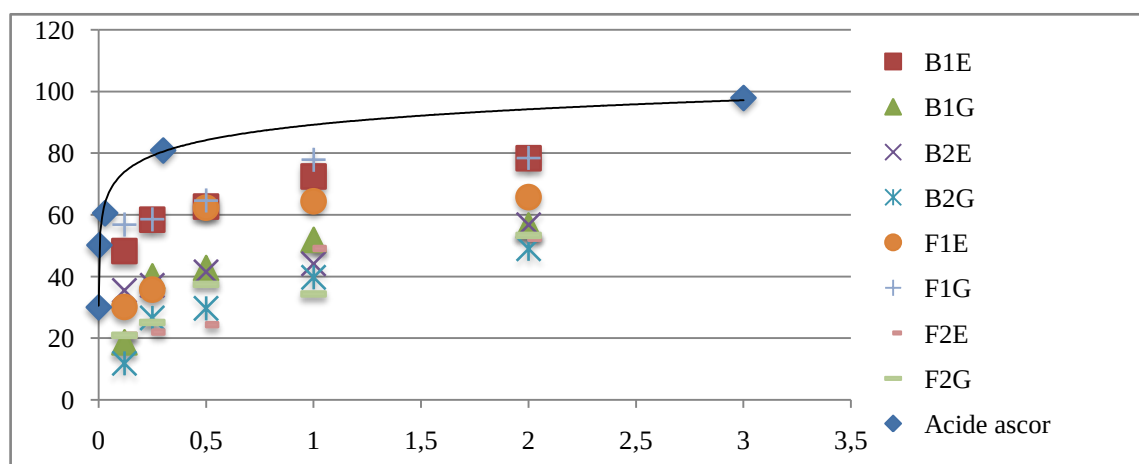


6) Extrait acétonique TP-S2

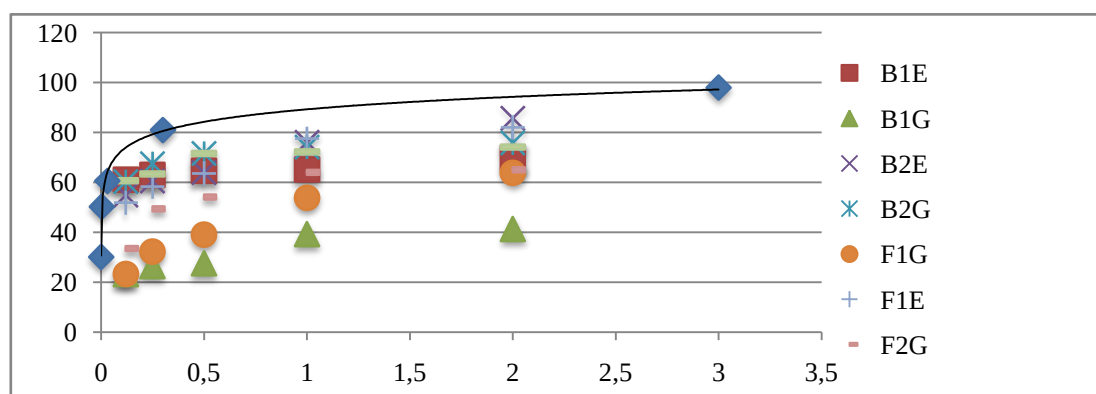


Annexe 5: Pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits de *P. granatum*

a) Méthanolique



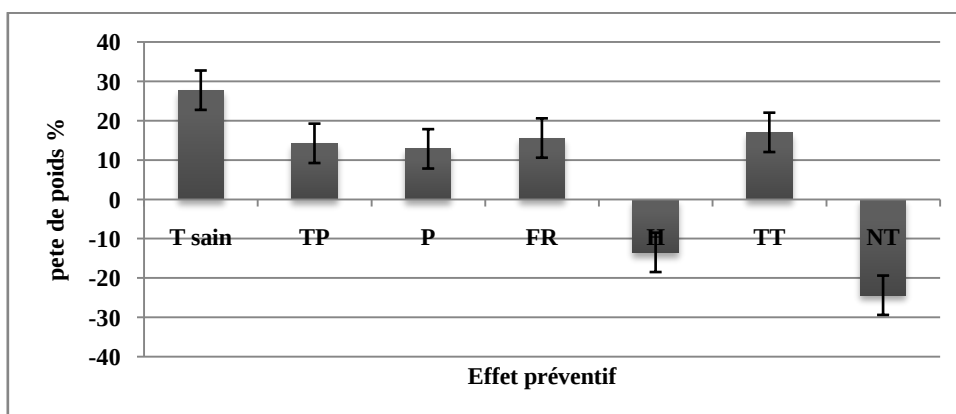
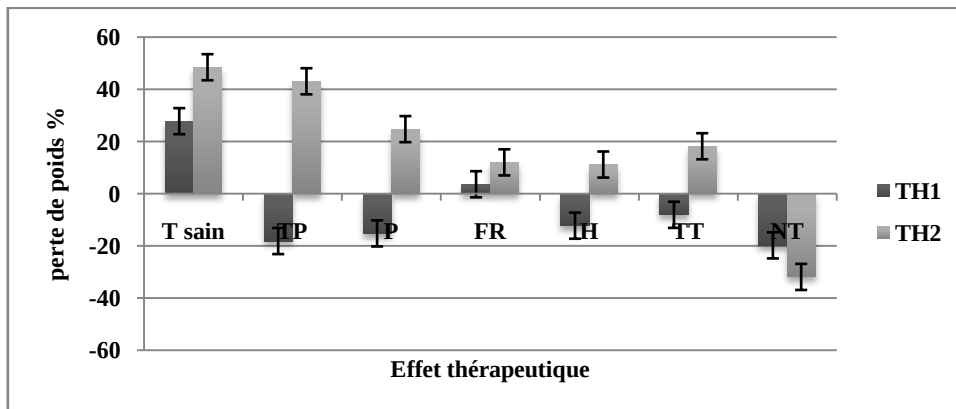
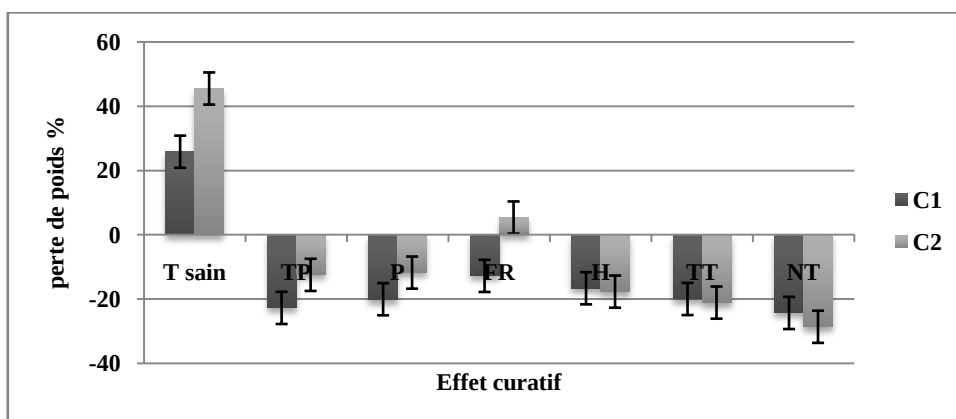
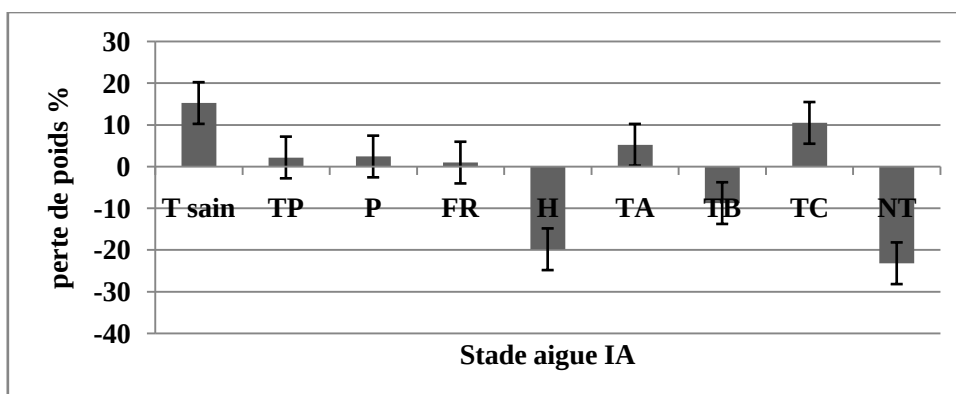
b) Acétonique



Annexe 6 : Elevage des rats



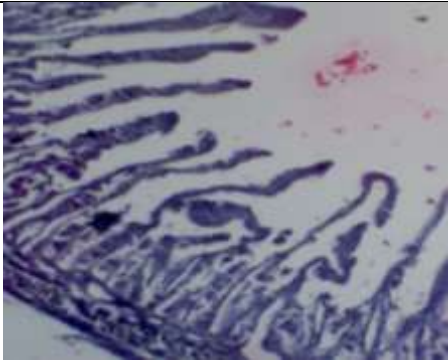
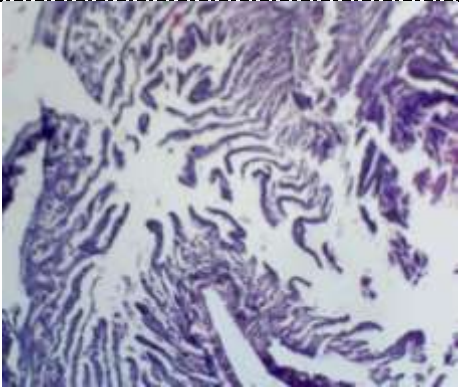
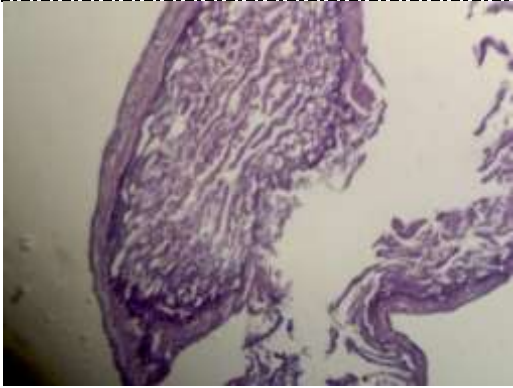
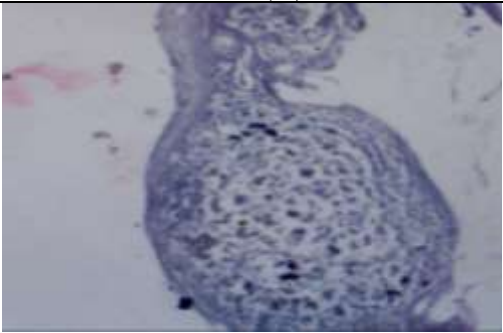
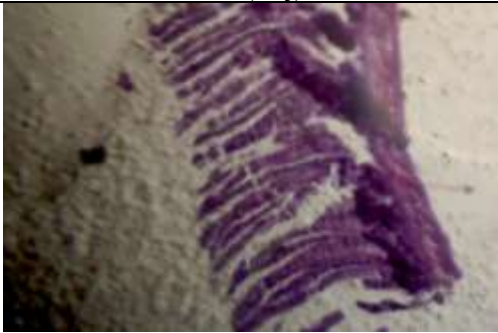
Annexe 7: Perte ou gain de poids des rats durant l'expérimentale

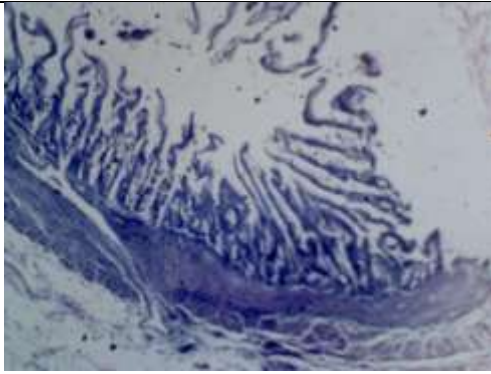


Annexe 8 : Identification bactérienne : Api 20E

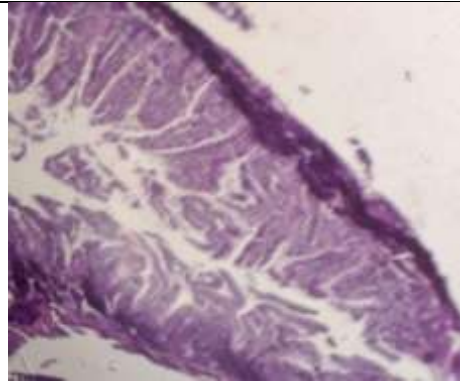


Annexe 9 : Coupes histologies de différents lots durant l'inflammation intestinale

 PRV(H)	 IA (TB)
 TH1 (H)	 NT (28j)
 C1 (TP)	 TH1 (TT)



C2(P)



TH2(FR)



Seasonal Variation in Essential Oil Content, Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Teucrium polium* L. Growing in Mascara (North West of Algeria)

Yamina Maizi^{1*}, Boumediene Meddah¹, Aicha Tir Touil Meddah¹, Jose Antonio Gabaldon Hernandez²

¹Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS), Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Mascara, Algeria

²Laboratory of Recognition and Molecular Encapsulation (REM), Faculty of Health Sciences, Catholic University San Antonio of Murcia, Murcia, Spain

Corresponding Author: Yamina Maizi, PhD, Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS), Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Mascara, Algeria. Tel: +213-791259924, Email: yamina.maizi@univ-mascara.dz

Received June 15, 2019; Accepted September 19, 2019; Online Published December 5, 2019

Abstract

Introduction: Phytochemicals are one wide class of nutraceuticals found in plants which act as antioxidants. In this research, the essential oil (EO) of *Teucrium polium* L., Lamiaceae, collected from Mascara province, situated in the Algerian northwestern, where their chemical composition varies according to geographical origin, season variation, and climatic conditions were studied.

Materials and Methods: The extraction of EO was performed by hydrodistillation. Then, the chemical compounds were identified by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). In parallel, the antioxidant activity was evaluated using the DPPH test.

Results: The yield of the EO of *T. polium* L. varied during different seasons with the highest in winter season, at vegetative stage (S1), while the same EO (S1) was significantly more efficient as an antioxidant than the EO harvested at the flowering stage (S2) with IC₅₀ values 3.90±0.05, 16.14±0.15 mg/mL, respectively ($P < 0.001$). These extracts are predominantly constituted by limonene (29.87%-26.39%), spathulenol (17.24%-13.29%), camphor (0.0%-8.20%), pinocarvone (7.76%-5.60%), tau-cadinol (5.41%-3.67%), pinene oxide (0.0%-4.78%), α -terpineol (0.0%-4.6%), 1-adamantanemethylamine (0.0%-9.80%) and β -myrcene (0.0%-4.02%).

Conclusions: The results show that both EOs can be considered as potential sources of natural antioxidants. However, the vegetative stage was the best stage for harvesting the EO of *T. polium* L. which can be used as an alternative source of synthetic compounds.

Keywords: *Teucrium polium* L., Mascara, Essential Oil, Vegetative Stage, Flowering Stage, Antioxidant

Citation: Maizi Y, Meddah B, Tir Touil Meddah A, Gabaldon Hernandez JA. Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. growing in Mascara (North West of Algeria). J Appl Biotechnol Rep. 2019;6(4):151-157. doi:10.29252/JABR.06.04.04.

Introduction

Oxidative stress is involved in many human diseases ranging from inflammation to cancer.¹ Thus, the development of new therapeutic agents proves to be indispensable in the fight against this phenomenon.

Many researchers have indicated that essential oils (EOs) are considered as really active antioxidants.^{2,3} Recently, many antioxidant metabolites have been isolated from Mediterranean plants like *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L., of which several belong to the Lamiaceae family.⁴ The *Teucrium* genus (from the Lamiaceae family) includes 340 species distributed in the arid and rocky areas of the Mediterranean basin,⁵ of which 20 of them were reported in Algeria.⁶

Teucrium polium L. (germander) which is locally called Jâada (or Gattaba, khayatat lajrah) and is widely found in Mascara (North West of Algeria) has a small cluster of

pink to white flowers. This plant has been used for over 2000 years in traditional medicine due to its hypoglycemic, antispasmodic, diuretic,⁷ anti-inflammatory, anti-rheumatoid,⁸ hypolipidemic,⁹ antioxidant,^{10,11} analgesic, antipyretic, wound healing, anti-microbial¹² and cardioprotective properties.¹³

Thus, the biological activities of the genus *Teucrium* EOs depend on their chemical compounds which can be affected by geographic origin, environmental conditions (precipitation, temperature, etc) and stage of development.^{14,15} It has been seen that studies on the effect of abiotic and biotic factors on oil chemical compositions and biological activities of some medicinal and aromatic plants are available.¹⁶⁻¹⁹

However, no reports have been found concerning the EO of *T. polium* L. growing in Mascara. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the variation of the chemical composition, oil yield and antioxidant activity of *T. polium* EO collected in North West of Algeria (Mascara province),

at different phenological stages (vegetative and flowering). This was done to select the best stage of harvest which would obtain the best quality and quantity of natural substances in EOs.

Material and Methods

Plant Material Collection

Teucrium polium L. samples were collected at two phenological stages of 2015: vegetative in January-February and the flowering in May-June, from El Mamounia (Altitude: 658 m; Latitude: 35° 25' 29" N; Longitude: 0° 8' 26" E), situated in the North West of Algeria (Mascara province). About 800 g–1000 g of aerial parts of *T. polium* L. were isolated in laboratory. The authentication of plant species was carried out using the African flowering plants database and also by the intervention of different botanists of Biology department of the University of Mascara.

Essential Oil Extraction

Samples of 60 g of the aerial part of the plant (stem and leaves) were extracted by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia.²⁰ Then, the obtained EO was dehydrated with anhydrous sodium sulphate and kept at +4°C in the dark until used. EO extractions were done in three replications and the extraction yield was expressed as the weight of EO volume on the weight of plant used (W/W).

Physicochemical Characteristics of Essential Oil

The physicochemical properties of the extracted EO were the organoleptic characteristics (appearance, color, smell), the chemical indexes such as pH value, acid and ester values and the physical indices for example refractive index and relative density.²¹

GC–MS Analyses

The identification of different chemical compounds of EOs was carried by a gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) type Shimadzu QP2010 using a SUPELCO column (30 m × 0.25 mm fused silica capillary column) and 0.25 µm film thickness, the oven temperature was held at 60°C then programmed to 250°C at rate of 2°C min⁻¹ during 110 minutes under the following conditions: helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.13 mL/min; injector and detector temperatures: 250°C; injected volume: 1.0 µL by split less method, ionization energy 70 eV.

The oil chemical compounds were identified by comparison of their mass spectra, retention times and retention indices with those cited in the literature and given by the spectral library banks (NIST).

Antioxidant Activity

DPPH Assay

The antioxidant activity of the EOs (S1, S2) and the standard antioxidant ascorbic acid were determined on the basis of the radical scavenging effect of the stable 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical activity according to the method described by Brand-William et al.²² Fifty microliter of

different concentrations of each sample were added to 1950 mL of methanol solution of DPPH (0.025 g/L). After incubation at room temperature for 30 minutes, the absorbance of these solutions was read at 517 nm against a control (containing only the DPPH solution) by UV-Visible Spectrophotometer (SHIMADZU, UVmini-1240) and the percentage inhibition (I%) was calculated using the following formula:

$$I\% = [(Abs_{517\text{ control}} - Abs_{517\text{ sample}}) / Abs_{517\text{ control}}] \times 100$$

The concentration of sample necessary to scavenge 50% of the DPPH radical (IC₅₀) was calculated from the regression equations derived by the least-square method and prepared from the different concentrations of EOs.²³ A higher DPPH radical-scavenging activity is associated with a lower IC₅₀ values. All tests were carried out in triplicate.

The antioxidant activity was also expressed as ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) according to the equation:

$$AEAC = [IC_{50}(\text{ascorbic acid}) / IC_{50}(\text{sample})] \cdot 10^5.$$

Data Analysis

The results are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and *P* ≤ 0.05 were considered as significant.

Results

Yield and Physicochemical Analysis of Essential Oil

Essential Oils extracted from aerial parts including stems, leaves of *T. polium* harvested during the vegetative (S1) and the flowering (S2) stages of growth showed a variable physicochemical characteristic (Table 1) accompanied by an oily liquid aspect, a light yellowish color with a strong odor. The yields of EO extracted from two stages (S1, S2) are variable (Table 1). This difference has been explained mainly by the influence of climatic conditions.

The meteorological data during 2006 to 2015 showed that the vegetative stage coincided with the winter period while the flowering stage coincided with the summer period (Figure 1). The values are obtained from the National Office of Meteorology.

In addition, the average rainfall (2006 to 2015) was 408.1 mm fairly well distributed; the maximum rainfall received in autumn and winter were 58.2 mm and 565 mm respectively, 171.7 mm received in spring and 62.7 mm in summer.

Table 1. Physicochemical Analysis and yield of Essential oil of *Teucrium polium* L.

	S1	S2
R%	0.82±0.027	0.56±0.032
Chemical indexes		
pH	7.5	7.9
Acid value	1.56	4.83
Ester value	17.98	19.43
Physical indexes		
The relative density at 20°C	0.28	0.37
Refractive index	1.427	1.427

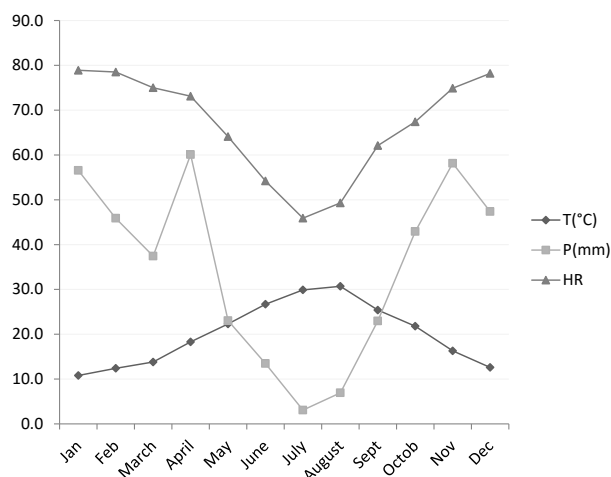


Figure 1. Climatic Conditions in Mascara During Period 2006-2015. T: Average of temperatures in °C, P: Average of precipitations in mm, RH: Average of relative humidity in %.

The maximum temperature recorded in August was 30.7°C. The coldest month was January with 10.8°C while August was the hottest. The average relative humidity varied from 78.9% in January to 45.9% in July. It was quite high in winter and spring with values greater than 60%. According to the Köppen-Geiger classification, Mascara has a warm Mediterranean climate with dry summer (Csa) (<http://koeppen-geiger.vu-wien.ac.at/>).

Chemical Composition

Qualitative and quantitative analysis of the EOs from the vegetative period (winter leaves) and the flowering (summer leaves) of *T. polium* (Table 2) revealed that both types of oils contain limonene (29.87%-26.39% respectively) as major components. To the best of the researcher's knowledge, EOs from *T. polium* L. growing in Mascara (North West of Algeria) has been never reported in literature.

Monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes and oxygenated sesquiterpene were the most represented in the flowering period (summer leaves), while the vegetative period (winter leaves) was characterized by a higher percentage of oxygenated monoterpenes, oxygenated sesquiterpene and low amount of monoterpene hydrocarbons.

The major compounds in regards to the vegetative period included limonene (29.87%), spathulenol (17.24%), camphor (8.20%), pinocarvone (7.76%), tau-cadinol (two compounds: 5.41% and 7.88%), pinene oxide (4.78%) and α -terpineol (4.6%). While, limonene (26.39%), spathulenol (13.29%), 1-adamantanemethylamine (9.80%), pinocarvone (5.60%), β -myrcene (4.02%), tau-cadinol (3.67%) and α -phellandrene (3.45%) were the major compounds for the flowering period (Figure 2).

Antioxidant Activity

The results of the present study showed that the two tested EOs exhibited moderate antioxidant activity. However, the EO extracted from vegetative aerial parts (winter period) had the best activity with IC_{50} values from 3.90 ± 0.05 mg/

Table 2. Effect of Harvesting Times on Chemical Composition of Essential Oil of *Teucrium polium*

Components	Retention time (min)	S1	S2
α -Phellandrene	6.23	-	3.45
β -Myrcene	7.74	-	4.02
Pinene oxide	7.74	4.78	-
Limonene	9.81	29.87	26.39
Unknown 1	10.94	-	2.23
Unknown 2	11.46	-	2.14
Unknown 3	14.46	2.56	-
Unknown 4	15.45	-	2.86
Unknown 5	15.52	7.47	-
1-Adamantanemethylamine	15.53	-	9.85
Camphor	15.87	8.20	-
Pinocarvone	16.76	7.76	5.60
Unknown 6	18.54	-	2.09
α -Terpineol	18.72	4.60	-
Unknown 7	18.73	-	6.69
Spathulenol	41.68	17.24	13.29
Tau-cadinol	45.43	4.22	-
Tau-cadinol	46.18	5.41	3.67
Unknown 8	61.62	7.88	-
Unknown 9	61.66	-	13.27
Unknown 10	61.73	-	2.46
Unknown 11	92.57	-	2.00
Total identified (%)		87.45%	100%

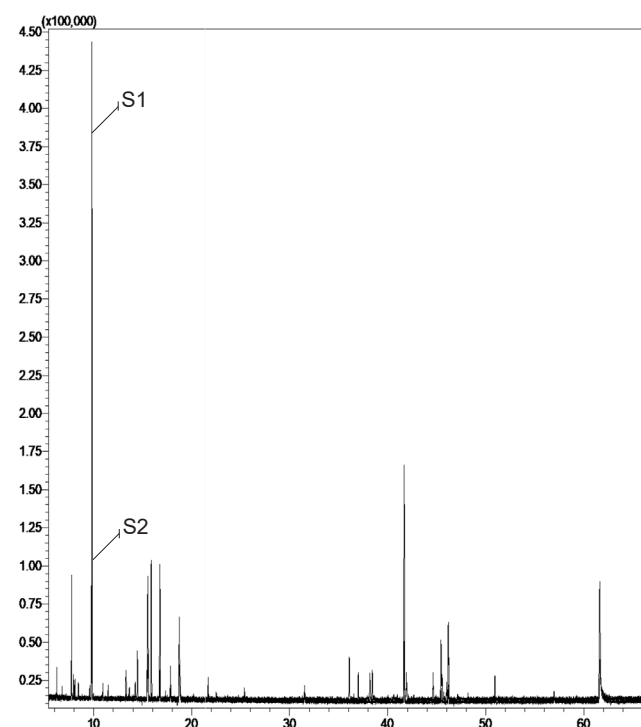


Figure 2. Comparison of Chemical Compounds Between Essential Oils at Vegetative Stage (S1) and Flowering Stage (S2) by GC-MS Analysis..

mL compared to the EO from the flowering stage $IC_{50} = 16.14 \pm 0.15$ mg/mL, although they were less potent than the reference antioxidants (ascorbic acid) $IC_{50} = 0.0044 \pm 0.0002$ mg/mL with 112.82, 27.26 mg ascorbic acid equivalents

(AEAC) per g extracts scavenging DPPH[•] radicals for EOs S1, S2, respectively ($P < 0.001$). Results are shown in Figure 3.

Discussion

The yield of EO of the aerial part of *T. polium* L. depends on the stages of the plant growth, where the vegetative stage (S1) was dominated significantly (0.82%) following with the flowering (S2) stage (0.56%). The EO yields obtained in the present study were comparable to what has been reported by Lianopoulou et al²⁶ who found that winter leaves have a higher EO yield (0.68%) compared to summer leaves (0.37%) of *T. polium* collected in Northern Greece. They have also reported that winter leaves of *T. polium* exhibit a series of morphological and anatomical traits (absent in summer leaves) which may explain the higher production of EOs in winter as one of the defensive strategies against the chilling stress. Thus, McCaskill et al²⁷ reported the high EO yield in the winter leaves which correspond to the higher number of peltate glandular hairs in winter leaves, since they are responsible for the biosynthesis of natural products such as EO, sucrose esters and phenolic compounds. However, winter chilling stress activates oxidative stress in cells,²⁸ and induces the production of antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants such as phenolic compounds, etc.²⁹

The winter leaves of *T. polium* have a higher photosynthetic rate compared to summer leaves. Furthermore, their mesophyll cells are dense and their chloroplasts are larger and more numerous with a higher number of grana which reflect to a larger CO₂ absorption area, and induce an increase in the rate of photosynthesis. In this fact, cells produce larger amounts of photosynthetic carbon which are invested in the biosynthesis of secondary metabolites necessary for the protection against the stress of low temperature such as phenolic compounds, EO etc.²⁶ The decrease of the yield of EO in the phenological stages (vegetative to flowering stages) was explicated by the adaptation of *T. polium* to climatic variation. Thus, the metabolites of the terpenoid pathway (monoterpenes, sesquiterpenes, and homoterpenes) were involved in many plant physiology and ecology.³⁰

According to the physico-chemical properties, good quality EOs have higher density, higher ester value and lower value of refractive index. The acid value must be less than 2 (low amount of free acids).³¹

Hassan et al³² found that oil extracted from *T. polium* growing in Saudi Arabia is light yellow, fragrant and pungent characteristic odor with refractive value 1.4850.

The EOs of *T. polium* exhibit a very important chemical polymorphism. Several studies have shown a variation in the chemical compositions of oils (several chemotypes) according to geographical origin, plant organ and vegetative cycle stage:

From the Western region of Algeria (Tlemcen province), the main compounds of the EOs of *T. polium* (subsp. *polium*) were germacrene D (25.81%), bicyclogermacrene (13%), β -pinene (11.69%) and carvacrol (8.93%).³³ However, Djabou et al³⁴ found that β -pinene (16.6%), germacrene D (14.8%), α -pinene (7.2%), spathulenol (6.4%), limonene (5.6%), bicyclogermacrene (5.5%) and myrcene (2.9%) were the major components. In Eastern Algeria, EOs from Setif have a

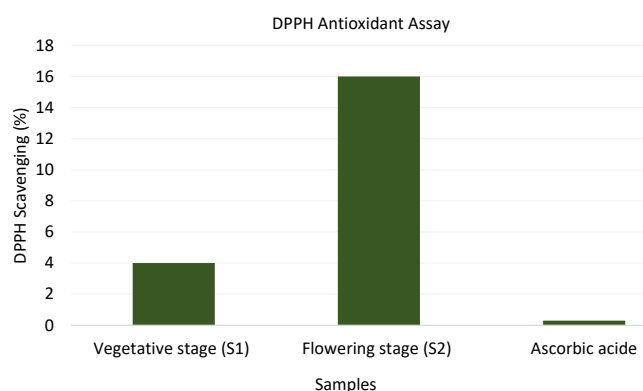


Figure 3. Antioxidant Activity of Essential Oils of *Teucrium polium* Using DPPH Antioxidant Assay. IC₅₀ values showed significant differences between the samples and ascorbic acid at $P < 0.001$.

chemotype characterized by α -pinene (14.1-18.0%), β -pinene (15.3-18.1%), germacrene-D (3.8-19%), myrcene (8.2-10.4%), limonene (5.3-8.7%)³⁵ and from Ain Melilla-Aures, the chemotype: α -cadinol (46.8%), 3- β -hydroxy- α -muurolene (22.5%), α -pinene (9.5%) and β -pinene (8.3%) have been identified.³⁶ In South Algeria, EOs from Tamanrasset (central Hoggar) contained dl-Limonene (11.18%), δ -cadinene (10.02%) and trans β -caryophyllene (9.15%) as the main components.³⁷

Essential oils of the aerial parts of *T. polium* (collected during the flowering stage in June) growing in Tunisia contained α -pinene (17.04%), β -pinene (12.68%), and limonene (6.65%), β -myrcene (6.07%) and germacrene D (5.89%).³⁸

The EOs extracted from the *T. polium* growing in Aydın/Turkey contained (8.10%) germacrene D, (5.41%) carvacrol, (4.63%) β -pinene, (3.40%) α -copaene, (3.32%) spathulenol as the major constituents.³⁹

Teucrium polium from Iran characterized by the presence of α -pinene (18.2%), elemol (14.5%), β -pinene (10.1%), cubenol (10.0%), and limonene (5.0%) are the major constituents of fruit oil.⁴⁰

Cozzani et al⁴¹ mentioned that α -pinene (28.8%), β -pinene (7.2%) and *p*-cymene (7.0%) were major components of EO of the aerial parts of *T. polium* subsp. *capitatum*, collected in October from Corsica, France.

In general, it appears that the qualitative and quantitative changes of the EO composition of *T. polium* are significantly related with its development (the presence/absence of some typical components and the amount of the main constituents). Therefore, the variability of the chemical composition of EOs affects their antioxidant activity. As a result, the EOs extracted from the vegetative aerial parts had the best activity (IC₅₀ = 3.90 $\pm$ 0.05 mg/mL) ($P < 0.001$). This is while, Mahmoudi and Nosratpour⁴² found that the EO of *T. polium* L. (collected during flowering stage) from the West of Iran (Kerman province) was able to reduce the stable free radical DPPH with an IC₅₀ = 9200 μ g/mL, where the main constituents were Spathulenol (15.06%), β -pinene (11.02%), β -myrcene (10.05%), germacrene B (10.11%), germacrene D (8.15%), bicyclogermacrene (8.25%) and linalool (4.02%).

Hammoudi et al³⁷ found that the main compounds in the EO of *T. polium* (collected in November) were dl-limonene (11.18%), δ -cadinene (10.02%) and trans β -caryophyllene (9.15%) with a potential activity from 79.02 ± 0.00 mg AEAC per g extracts scavenging DPPH[•] radicals. However, *T. polium* subsp. *capitatum* oil (collected in July) with t-cadinol (18.3%), germacrene D (15.3%) and β -pinene (10.5%) as the major components represented less efficiency than that of positive control (BHA) reaching a maximum of 12.7% for a concentration of 1000 mg/L.⁴³

Lemos et al⁴⁴ also showed that the EOs of *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae family, 125 samples from Brazil harvested in each season) had moderate antioxidant activities evaluated by the DPPH method, and justified by the presence of the monoterpenes.

Thus, in the present study, the antioxidant activities of *T. polium* EOs can be attributed to the high concentration of major components, the variation in chemical composition, the presence/absence the oxygenated monoterpenes, monoterpene hydrocarbons and sesquiterpene. Furthermore, defining the component (s) responsible for this activity is very difficult.

Generally, EOs contain phenolic and non-phenolic compounds while phenolic compounds such as carvacrol and thymol have strong antioxidant potentials.^{45,46} Whereas, the phenolic compound is a source of n H atoms that are transferred to DPPH[•] free radical then DPPH[•] converted into a stable molecule DPPH. Therefore, the addition of an antioxidant results on a decrease of absorbance proportional to the concentration and antioxidant activity of the compound.⁴⁷ However, some researchers have revealed that some EOs rich in non-phenolic compounds also had antioxidant potentials.⁴⁸⁻⁵⁰ Wei and Shibamoto⁵¹ revealed that EOs contain high percentages of hydrocarbon monoterpenes such as limonene and α -pinene, which demonstrate a significant antioxidant potential. Miguel⁵² reported a good antioxidant activity for the EOs of *Citrus sinensis*, where limonene was the major constituents. According to Bayala et al,⁵³ the major constituents were α -terpineol (59.78%) and β -caryophyllene (10.54%) for *Ocimum basilicum* (Lamiaceae family) with the best ability to scavenge DPPH radical created in vitro with a percentage of inhibition of 55.67% for a concentration of 8 mg/mL.

Zengin and Baysal⁵⁴ tested some compounds individually and they showed that the overall antioxidant activity of α -terpineol was stronger than linalool and eucalyptol. Although Bicas et al⁵⁵ evaluated the antioxidant and antiproliferative activities of α -terpineol, they reported that this component exhibited potent free radical-scavenging activity and also had a cytostatic effect against six human cancerous cell lines (breast, lung, prostate, ovarian, and leukemia).

Antioxidant activity of the oil extracted from the leaves of *Ocimum canum* Sims. (Lamiaceae family) showed dose dependent free radical scavenging activity against DPPH (IC_{50} 523.55 ± 0.001 μ g/mL), where the major compound was camphor (39.77%).⁵⁶ De Lima et al⁵⁷ found that 45 components with a predominance of monoterpenes, such as camphor

(51.81%), 1,8-cineole (20.13%) and limonene (11.23%) in the EO of *Ocimum kilimandscharicum* (Lamiaceae family) which has demonstrated antioxidant capacity against DPPH with an IC_{50} of 8.31 μ g/mL compared to pure camphor (IC_{50} = 12.56 μ g/mL) and mixture of the limonene: 1,8-cineole (IC_{50} = 23.25 μ g/mL) displayed a potent activity.

It has been reported that the overall antioxidant activity of oxygenated monoterpenes (linalool, carvacrol, α -terpineol etc) was the strongest,^{52,55,58,59} followed in a descending order by monoterpene hydrocarbons and sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives which have very low antioxidant activities.⁶⁰

According to Viuda-Martos et al,⁶¹ the good antioxidant activity of EOs compared to individual components can be attributed to the synergistic interaction of the EO constituents, the high percentages of the main components or to the micro components acting as pro-oxidants.

Although, some researchers have revealed that most natural antioxidative compounds (such as EO constituents, phenolic compounds, etc) often work synergistically with each other to create an effective defense system against free radical attack.^{62,63}

Conclusions

Teucrium polium L. is a seasonally dimorphic plant showing its ability to adaptation to the drought stress and the chilling stress (the climatic variation). However, this variation effects the chemical composition of EOs (vegetative stage/flowering stage) and therefore their antioxidant activity. This fact is actually of great interest because the ability of *T. polium* EOs collected from the Mascara province may play an important role in the prevention of some diseases such as cancer and inflammatory diseases.

According to the results of the present study, the vegetative stage is selected as the best stage for harvesting the EO of *Teucrium polium* L. with the best antioxidant activity compared to the flowering stage EO.

Authors' Contributions

YM, BM and ATTM designed the study. JAGH performed the experiments (GC-MS analysis). YM prepared the samples, carried out the experiments and wrote the manuscript with input from all authors.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the University Mustapha Stambouli of Mascara and the Algeria Ministry of Higher Education and Scientific Research for their guidance during this research.

References

1. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
2. Lagouri V, Boskou D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. In: Charalambous G, ed. *Developments in Food Science.* Vol 37: Elsevier; 1995. p. 869-879. doi:10.1016/S0167-4501(06)80203-7.
3. Chems A, Zellagui A, Öztürk M, et al. Chemical composition, antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial and antibiofilm activities of essential oil and methanolic extract of *Anthemis*

- stiparum* subsp. *sabulicola* (Pomel) Oberpr. Microb Pathog. 2018;119:233-240. doi:[10.1016/j.micpath.2018.04.033](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.033).
4. De Marino S, Festa C, Zollo F, et al. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. Food Chem. 2012;133(1):21-28. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.12.054](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.054).
 5. Cunningham CJ, Weathington BL, Pittenger DJ. Understanding and Conducting Research in the Health Sciences. John Wiley & Sons; 2013. p. 544.
 6. Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Paris: CNRS; 1962. p. 1170.
 7. Gharaibeh MN, Elayan HH, Salhab AS. Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. J Ethnopharmacol. 1988;24(1):93-99. doi:[10.1016/0378-8741\(88\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90139-0).
 8. Tariq M, Ageel AM, Al-Yahya MA, Mossa JS, Al-Said MS. Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. Int J Tissue React. 1989;11(4):185-188.
 9. Rasekh HR, Khoshnood-Mansourkhani MJ, Kamalinejad M. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. Fitoterapia. 2001;72(8):937-939. doi:[10.1016/S0367-326X\(01\)00348-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00348-3).
 10. Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, Harvala C. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. Phytother Res. 2003;17(2):194-195. doi:[10.1002/ptr.1261](https://doi.org/10.1002/ptr.1261).
 11. Sayyad R, Farahmandfar R. Influence of *Teucrium polium* L. essential oil on the oxidative stability of canola oil during storage. J Food Sci Technol. 2017;54(10):3073-3081. doi:[10.1007/s13197-017-2743-0](https://doi.org/10.1007/s13197-017-2743-0).
 12. Allahtavakoli M, Moradi R, Shamsi S, Afsharmanesh K. Effect of hydro-alcoholic extract of *Teucrium polium* on castor oil-induced diarrhea in male rat. Zahedan J Res Med Sci. 2013;15(6):54-57.
 13. Mahmoudabady M, Haghshenas M, Niazmand S. Extract from *Teucrium polium* L. protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury. Adv Biomed Res. 2018;7:15. doi:[10.4103/abr.abr_218_16](https://doi.org/10.4103/abr.abr_218_16).
 14. Šamec D, Durgo K, Grúz J, et al. Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. Food Chem. 2015;186:298-305. doi:[10.1016/j.foodchem.2014.07.135](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.135).
 15. Daghbouche S, Daghbouche AE, Boulessnam B, Snoussi SA, Djazouli ZE. Influence of phenological stages on chemical composition and antimicrobial activities of *Teucrium polium* essential oils from North East of Algeria. J Fundam Appl Sci. 2018;10(5S):32-65. doi:[10.4314/jfas.v10i5s.3](https://doi.org/10.4314/jfas.v10i5s.3).
 16. Boussoussa H, Khacheba I, Djeridane A, Mellah N, Yousfi M. Antibacterial activity from *Rhanterium adpressum* flowers extracts, depending on seasonal variations. Ind Crops Prod. 2016;83:44-47. doi:[10.1016/j.indcrop.2015.12.020](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.020).
 17. Verma RS, Verma RK, Chauhan A, Yadav AK. Seasonal variation in essential oil content and composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. cultivated in Uttarakhand Hills. Indian J Pharm Sci. 2011;73(2):233-235. doi:[10.4103/0250-474x.91570](https://doi.org/10.4103/0250-474x.91570).
 18. Ghasemi Pirbalouti A, Firoznejhad M, Craker L, Akbarzadeh M. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Rev Bras Farmacogn. 2013;23(6):861-869. doi:[10.1590/S0102-695X2013000600002](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600002).
 19. Zaouali Y, Chograni H, Trimech R, Boussaid M. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. Ind Crops Prod. 2013;43(1):412-419. doi:[10.1016/j.indcrop.2012.07.044](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044).
 20. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2004. p. 217-218.
 21. AFNOR. Essential oils. Ed. PARA Graphic. Part 1 - Sampling and method of analysis 471 p. Part 2 - Volume 1 Monograph relating to essential oils. Part 2 - Volume 2 Monograph relating to essential oils. 2000; p. 663.
 22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci Technol. 1995;28(1):25-30. doi:[10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
 23. Ndoeye Foe FM, Tchintang TFK, Nyegue AM, et al. Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. BMC Complement Altern Med. 2016;16:117. doi:[10.1186/s12906-016-1096-y](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1096-y).
 24. Leong LP, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chem. 2002;76(1):69-75. doi:[10.1016/S0308-8146\(01\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00251-5).
 25. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. Food Chem. 2007;103(3):1003-1008. doi:[10.1016/j.foodchem.2006.08.038](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.038).
 26. Lianopoulou V, Bosabalidis AM, Patakas A, Lazari D, Panteris E. Effects of chilling stress on leaf morphology, anatomy, ultrastructure, gas exchange, and essential oils in the seasonally dimorphic plant *Teucrium polium* (Lamiaceae). Acta Physiol Plant. 2014;36(8):2271-2281. doi:[10.1007/s11738-014-1605-x](https://doi.org/10.1007/s11738-014-1605-x).
 27. McCaskill D, Gershenzon J, Croteau R. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). Planta. 1992;187(4):445-454. doi:[10.1007/bf00199962](https://doi.org/10.1007/bf00199962).
 28. Imahori Y, Takemura M, Bai J. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. Postharvest Biol Technol. 2008;49(1):54-60. doi:[10.1016/j.postharvbio.2007.10.017](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.10.017).
 29. Bafeel SO, Ibrahim MM. Antioxidants and accumulation of α -tocopherol induce chilling tolerance in *Medicago sativa*. Int J Agric Biol. 2008;10(6):593-598.
 30. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Crit Rev Plant Sci. 2006;25(5):417-440. doi:[10.1080/07352680600899973](https://doi.org/10.1080/07352680600899973).
 31. AFNOR. French standard NF ISO 3063: essential oil of ylang-ylang [*Cananga odorata* (Lamarck) J.D. Hooker & Thomson forma genuina]. Paris: AFNOR; 2005.
 32. Hassan MM, Muhtadi FJ, Al-Badr AA. GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. J Pharm Sci. 1979;68(6):800-801. doi:[10.1002/jps.2600680639](https://doi.org/10.1002/jps.2600680639).
 33. Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. J Med Plant Res. 2013;7(14):897-902.
 34. Djabou N, Muselli A, Allali H, et al. Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. Phytochemistry. 2012;83:51-62. doi:[10.1016/j.phytochem.2012.05.019](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.019).
 35. Lograda T, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G, Deghar A. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from eastern Algeria. Am J Adv Drug Deliv. 2014;2(6):697-710.
 36. Kabouche A, Kabouche Z, Ghannadi A, Sajjadi SE. Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from Algeria. J Essent Oil Res. 2007;19(1):44-46. doi:[10.1080/10412905.2007.9699227](https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699227).
 37. Hammoudi R, Hadj-Mahammed M, Ould El-Hadj MD. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Teucrium polium geyrii* (Labiatae). J Med Plant Res. 2013;7(20):1506-1510. doi:[10.5897/jmpr13.5082](https://doi.org/10.5897/jmpr13.5082).
 38. Bakari S, Ncir M, Felhi S, et al. Chemical composition and in vitro evaluation of total phenolic, flavonoid, and antioxidant properties of essential oil and solvent extract from the aerial parts of *Teucrium polium* grown in Tunisia. Food Sci Biotechnol. 2015;24(6):1943-1949. doi:[10.1007/s10068-015-0256-z](https://doi.org/10.1007/s10068-015-0256-z).
 39. Kurtoglu C, Tin B. Essential oil composition of *Teucrium polium* L. Grown in Aydın/Turkey. Turk J Life Sci. 2017;2(1):142-144.
 40. Sabzeghabaie A, Asgarpanah J. Essential oil composition of *Teucrium polium* L. fruits. J Essent Oil Res. 2016;28(1):77-80. doi:[10.1080/10412905.2015.1082947](https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1082947).
 41. Cozzani S, Muselli A, Desjobert JM, Bernardini AF, Tomi F,

- Casanova J. Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour Fragr J.* 2005;20(4):436-441. doi:[10.1002/ffj.1463](https://doi.org/10.1002/ffj.1463).
42. Mahmoudi R, Nosrati S. *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *Int Food Res J.* 2013;20(4):1697-1701.
 43. Kerbouche L, Hazzit M, Ferhat M-A, Baaliouamer A, Miguel MG. Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. *J Essent Oil Bear Plants.* 2015;18(5):1197-1208. doi:[10.1080/0972060X.2014.935065](https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935065).
 44. Lemos MF, Lemos MF, Pacheco HP, et al. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind Crops Prod.* 2017;95:543-548. doi:[10.1016/j.indcrop.2016.11.008](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.008).
 45. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(12):1725-1729. doi:[10.1248/bpb.26.1725](https://doi.org/10.1248/bpb.26.1725).
 46. Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1362-1370. doi:[10.1016/j.fct.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002).
 47. Villano D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.* 2007;71(1):230-235. doi:[10.1016/j.talanta.2006.03.050](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050).
 48. El-Massry KF, El-Ghorab AH, Farouk A. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chem.* 2002;79(3):331-336. doi:[10.1016/S0308-8146\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00164-4).
 49. Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia.* 2002;73(6):532-535. doi:[10.1016/s0367-326x\(02\)00175-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00175-2).
 50. Yildirim A, Cakir A, Mavi A, Yalcin M, Fauler G, Taskesenligil Y. The variation of antioxidant activities and chemical composition of essential oils of *Teucrium orientale* L. var. *orientale* during harvesting stages. *Flavour Fragr J.* 2004;19(5):367-372. doi:[10.1002/ffj.1343](https://doi.org/10.1002/ffj.1343).
 51. Wei A, Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *J Agric Food Chem.* 2007;55(5):1737-1742. doi:[10.1021/jf062959x](https://doi.org/10.1021/jf062959x).
 52. Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules.* 2010;15(12):9252-9287. doi:[10.3390/molecules15129252](https://doi.org/10.3390/molecules15129252).
 53. Bayala B, Bassole IH, Gnoula C, et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PLoS One.* 2014;9(3):e92122. doi:[10.1371/journal.pone.0092122](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092122).
 54. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules.* 2014;19(11):17773-17798. doi:[10.3390/molecules191117773](https://doi.org/10.3390/molecules191117773).
 55. Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz AL, De Carvalho JE, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(7):1610-1615. doi:[10.1016/j.fct.2011.04.012](https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.012).
 56. Tamil Selvi M, Thirugnanasampandan R, Sundarammal S. Antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of *Ocimum canum* Sims. from India. *J Saudi Chem Soc.* 2015;19(1):97-100. doi:[10.1016/j.jscs.2011.12.026](https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.12.026).
 57. de Lima VT, Vieira MC, Kassuya CA, et al. Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*. *Phytomedicine.* 2014;21(11):1298-1302. doi:[10.1016/j.phymed.2014.07.004](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.004).
 58. Maestri DM, Nepote V, Lamarque AL, Zygodlo JA. Natural products as antioxidants. In: Imperato F, ed. *Phytochemistry: Advances in Research*; 2006. p. 105-135.
 59. Barbieri N, Costamagna M, Gilibert M, et al. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharm Biol.* 2016;54(1):168-173. doi:[10.3109/13880209.2015.1028077](https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028077).
 60. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69(2):167-174. doi:[10.1016/S0308-8146\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00247-2).
 61. Viuda-Martos M, López-Marcos MC, Fernández-López J, Sendra E, López-Vargas JH, Pérez-Álvarez JA. Role of fiber in cardiovascular diseases: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(2):240-258. doi:[10.1111/j.1541-4337.2009.00102.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00102.x).
 62. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 2001;75(2):197-202. doi:[10.1016/S0308-8146\(01\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00198-4).
 63. Singh G, Marimuthu P, de Heluani CS, Catalan CA. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *J Agric Food Chem.* 2006;54(1):174-181. doi:[10.1021/jf0518610](https://doi.org/10.1021/jf0518610).

« Il y'a un chemin secret de la difficulté au succès »

Jalâl al-Dîn Rûmî