

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Badji Mokhtar / Annaba



Faculté de Biologie

Département de sciences de la nature et de la vie (SNV)

Mémoire de Fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de

Doctorat Domaine : Sciences biologiques

Spécialité : Ecologie de santé

Laboratoire : Ecologie des écosystèmes terrestres et aquatiques

Thème

**Etude phytochimique et biotechnologique de  
*Traganum nudatum* Delile plante médicinale de la  
Saoura. Recherche de quelques activités  
biologiques**

Présenté par :

M<sup>me</sup> BENHASSINE Ikram

<b>Président</b>	M <sup>r</sup> TAHAR Ali	Professeur	Université Badji Mokhtar, Annaba
<b>Examineur</b>	M <sup>r</sup> SLIMANI Rachid	MCA	Université Badji Mokhtar, Annaba
<b>Examinatrice</b>	M <sup>me</sup> DJELLOUL Radia	Professeur	Université Chadli Bendjedid, El-Taref
<b>Promotrice</b>	M <sup>me</sup> OUAFI Saida	Professeur	USTHB, Alger
<b>Co-promotrice</b>	M <sup>me</sup> BOUSLAMA Zihad	Professeur	Centre de Recherche Environnement, Annaba

Année : 2023/2024

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, il m'est agréable de réserver cette page comme témoin à toutes les personnes qui m'ont soutenu et encadré pour réaliser ce travail ou qui ont contribué de quelque manière que ce soit à son aboutissement*

*Tout d'abord, nos louanges vont à ALLAH le tout puissant pour m'avoir donné le courage et la force de mener à bien cette thèse.*

*J'exprime ma gratitude et reconnaissance à ma promotrice Pr OUAFI Saida qui m'a mis à disposition son savoir et expériences par des conseils prodigués et des remarques constructives qui ont permis d'améliorer les différentes versions du travail tout au long de mon stage.*

*Je tiens à remercier ma Co-promotrice Pr BOUSLAMA Zihad pour l'orientation, sa gentillesse et ses conseils judicieux, la confiance et la patience qui ont constitué un apport considérable.*

*Sans oublier de remercier, le personnel de laboratoire d'Eco-Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie pour leur aide et leur coopération en particulier Dr HARRAT Zoubir responsable et ex-Directeur Général, ainsi que ma collègue M<sup>me</sup> KHERACHI Ihen, je remercie également mon collègue Dr TATI Tahar de l'université Badji Mokhtar, Annaba, pour tous les efforts fournis pour l'organisation de ma soutenance de doctorat.*

*Un grand merci au Pr DERRAR Fawzi, Directeur Général de l'Institut Pasteur d'Algérie pour tous ces efforts fournis pour l'aboutissement de la soutenance.*

*J'adresse mes vifs remerciements au Pr TAHAR Ali président de jury qui m'a honoré de sa participation et attentions portées à mon manuscrit de thèse de doctorat ainsi que Dr SLIMANI Rachid et Pr DJELLOUL Radia d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Mes remerciements les plus sincères vont également à toutes les personnes qui ont marqué mon parcours universitaire.*

*Et enfin un grand merci à mes parents, pour leur soutien et les encouragements qu'ils ont su m'apporter pour arriver à terme de ce travail.*

## *Dédicaces*

*A ma très chère maman, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait exprimer les mérites pour tous les sacrifices consentis depuis ma naissance, durant toute ma vie. A mon cher papa, rien au monde ne vaut les efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Allah, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon mari et mon fidèle compagnon dans les moments les plus difficiles et qui m'a toujours soutenu. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et admiration. Puisse Allah, le tout puissant, te préserver et t'accorde santé, longue vie et bonheur.*

*A mes très chères frères et sœurs Loubna, Sana et Yazid en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

*A la mémoire de ma très chère grand-mère « La Touta », tu as toujours été présente pour les bons conseils. Ton affection et ton soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie, tu resteras toujours vivante dans mon cœur.*

*Veillez trouver ici dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands.*

***Ikram***

# *Sommaire*

## Sommaire

1. Les plantes médicinales.....	3
2. Les métabolites primaires.....	3
2.1. Les protéines .....	3
2.2. Les glucides .....	4
2.3. Les lipides .....	4
2.3.1. Acides gras saturés (AGS).....	4
2.3.2. Acides gras insaturés (AGIS) .....	4
3. Les métabolites secondaires .....	6
3.1. Les composés terpéniques.....	6
3.1.1. Les monoterpènes .....	7
3.1.2. Les sesquiterpènes .....	7
3.1.3. Les diterpènes .....	7
3.1.4. Les triterpènes.....	7
3.1.5. Les stéroïdes .....	7
3.1.6. Les stérols .....	7
3.1.7. Les saponines.....	7
3.2. Les composés azotés (Alcaloïdes).....	8
3.2.1. Les alcaloïdes vrais.....	8
3.2.2. Les pseudo-alcaloïdes .....	8
3.2.3. Les proto-alcaloïdes.....	9
3.3. Les composés phénoliques .....	9
3.3.1. Biosynthèse des composés phénoliques .....	9
3.3.2. Classification des composés phénoliques .....	11
3.3.3. Intérêts thérapeutiques des composés phénoliques .....	19
4. Propriétés thérapeutiques des plantes médicinales .....	22
4.1. Propriétés anti-inflammatoires .....	22
4.2. Propriétés antalgiques .....	23
4.3. Propriétés anti-microbiennes.....	24
4.4. Propriétés anti-parasitaires .....	25
5. Culture <i>in vitro</i> des plantes.....	26
5.1. Historique de la culture <i>in vitro</i> .....	26
5.2. Principe .....	27
5.3. Les régulateurs de croissance.....	28
5.3.1. Les cytokinines .....	29
5.3.2. Les auxines .....	29

5.3.3.	Les gibbérellines .....	30
5.4.	Le milieu de culture .....	30
5.5.	Facteurs de régénéralité <i>in vitro</i> .....	30
5.5.1.	L'âge physiologique et ontogénique de l'explant.....	30
5.5.2.	La saison de prélèvement .....	31
5.5.3.	La taille de l'explant .....	31
5.5.4.	Influence du milieu de culture .....	31
5.5.5.	Les régulateurs de croissance .....	31
5.5.6.	La lumière.....	31
5.5.7.	La température.....	32
5.6.	Les différentes applications de la culture <i>in vitro</i> des plantes .....	32
5.6.1.	La culture des méristèmes .....	32
5.6.2.	La culture des tissus.....	32
5.7.	Intérêt de la culture <i>in vitro</i> des plantes .....	35
5.8.	Inconvénients de la culture <i>in vitro</i> des plantes .....	35
6.	Famille des Chénopodiacées .....	36
6.1.	Caractéristiques botaniques.....	36
6.2.	Répartition géographique .....	37
6.3.	Intérêt de la famille des Chénopodiacées.....	37
6.4.	Le genre <i>Traganum</i> .....	38
6.4.1.	Caractéristiques botaniques du genre <i>Traganum</i> .....	38
6.4.2.	Répartition géographique.....	38
6.5.	Présentation de la plante médicinale <i>T. nudatum</i> Delile.....	38
6.5.1.	Etymologie et nomenclature.....	38
6.5.2.	Position systématique .....	38
6.5.3.	Caractéristiques de l'espèce .....	39
6.5.4.	Répartition géographique .....	40
6.5.5.	Usages médicinaux.....	40
6.5.6.	Travaux antérieurs sur <i>T.nudatum</i> Del.....	41
1.	Présentation de la région de récolte (Wilaya de Béchar).....	43
2.	Matériel expérimental.....	44
2.1.	Matériel végétal .....	44
2.2.	Matériel Animal.....	45
2.3.	Matériel microbiologique.....	45
3.	Méthodes .....	47
3.1.	Culture <i>in vitro</i> de <i>T.nudatum</i> Del .....	47
3.1.1.	Préparation des explants .....	47

3.1.2.	Mise en culture .....	47
3.2.	Analyse phytochimique qualitative et quantitative des métabolites de <i>T.nudatum</i> Del	49
3.2.1.	Analyses chromatographiques .....	50
3.2.2.	Analyse des composés phénoliques par UPLC-MS-PDA.....	51
3.2.3.	Analyse des composés volatiles par GC-MS-FID.....	52
3.3.	Extractions phénoliques pour l'étude biologique de <i>T.nudatum</i> Del .....	53
3.3.1.	Extraction des aglycones flavoniques (Composés phénoliques liés).....	54
3.3.2.	Extraction des aglycones libres (Composés phénoliques libres) .....	57
3.3.3.	Extraction des hétérosides flavoniques (Les flavonoïdes liés) .....	58
3.3.4.	Extraction de la phase aqueuse (Infusé) .....	59
3.4.	Etude des activités biologiques de <i>T.nudatum</i> Del .....	60
3.4.1.	Test de toxicité aigüe de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris .....	60
3.4.2.	Test de cytotoxicité <i>in vitro</i> de <i>T.nudatum</i> Del sur les monocytes humains .....	61
3.4.3.	Test anti-inflammatoire de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris .....	62
3.4.4.	Test antalgique de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris.....	64
3.4.5.	Activité antimicrobienne de <i>T.nudatum</i> Del.....	65
3.4.6.	Activité leishmanicide de <i>T.nudatum</i> Del sur la forme promastigote.....	67
3.5.	Analyse statistique des résultats.....	68
1.	Etude de la culture <i>in vitro</i> des explants de <i>T. nudatum</i> Del .....	69
1.1.	Effet de la nature de l'explant sur l'induction des cals .....	69
1.2.	Effet des régulateurs de croissance sur l'induction de cals.....	72
2.	Analyse phytochimique qualitative et quantitative des métabolites de <i>T.nudatum</i> .....	75
2.1.	Analyse des composés phénoliques par UPLC-MS.....	75
2.1.1.	Extraction des composés phénoliques libres.....	75
2.1.2.	Extraction des composés phénoliques liés.....	78
2.1.3.	Extraction des pro-anthocyanes liés .....	82
2.2.	Analyse des composés volatils par GC-MS-FID .....	84
2.3.	Quantification des acides gras.....	88
3.	Activités biologiques de <i>Traganum nudatum</i> Del .....	90
3.1.	Test de toxicité aigüe de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris .....	90
3.1.1.	Effets de l'administration de l'infusé sur les signes généraux des souris .....	90
3.1.2.	Effets de l'administration de l'infusé sur l'évolution du poids corporel des souris	91
3.1.3.	Effets de l'administration de l'infusé sur le poids moyen des organes internes des souris.....	92
3.2.	Test de cytotoxicité <i>in vitro</i> de <i>Traganum nudatum</i> Del sur les monocytes humains (THP1) .....	92

3.3.	Test anti-inflammatoire de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris.....	94
3.4.	Test antalgique (test de Writhing) de <i>T.nudatum</i> Del chez les souris.....	98
3.5.	Activité antimicrobienne de <i>T.nudatum</i> Del.....	101
3.6.	Activité leishmanicide de <i>T.nudatum</i> Del sur les formes promastigotes .....	105
3.6.1.	Criblage primaire des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del.....	105
3.6.2.	Criblage secondaire des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del.....	106
	Conclusion et perspectives... ..	109
	Rérérences bibliographiques... ..	111
	Annexes... ..	130

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Structure des acides gras saturés, insaturés cis et trans.....	5
<b>Figure 2.</b> Structure de base des terpénoïdes.....	6
<b>Figure 3.</b> Structure de base des alcaloïdes.....	8
<b>Figure 4.</b> Les grandes voies de biosynthèse des principaux groupes des composés phénoliques (voie mixte).....	11
<b>Figure 5.</b> Squelette de base des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 6.</b> Grandes lignes de biosynthèse des classes de flavonoïdes.....	16
<b>Figure 7.</b> Schéma de dédifférenciation d'une cellule végétale.....	28
<b>Figure 8.</b> La balance hormonale.....	29
<b>Figure 9.</b> Culture <i>in vitro</i> (Organogénèse) des plantes.....	34
<b>Figure 10.</b> Répartition géographique mondiale de la famille des Chenopodiacees.....	37
<b>Figure 11.</b> Caractéristiques morphologiques de <i>T. nudatum</i> Delile.....	39
<b>Figure 12.</b> Distribution géographique mondiale de <i>T.nudatum</i> Del.....	40
<b>Figure 13.</b> Point de récolte du spécimen végétal <i>T.nudatum</i> Del.....	43
<b>Figure 14.</b> Vue externe de la station de récolte Oued-Djdida à Béchar.....	44
<b>Figure 15.</b> Le spécimen végétal <i>T.nudatum</i> Del dans la station de récolte Ain-Djdida à Béchar.....	45
<b>Figure 16.</b> Mise en culture des fragments de <i>T.nudatum</i> Del (Tiges, feuilles, fruits et bourgeons axillaires).....	49
<b>Figure 17.</b> Les tests biologiques effectués avec les différents types d'extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del.....	54
<b>Figure 18.</b> Schéma de conversion des pro-anthocyanidines en anthocyanidines.....	55
<b>Figure 19.</b> Protocole expérimental d'extraction des aglycones flavoniques de <i>T.nudatum</i> .....	56
<b>Figure 20.</b> Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres de <i>T.nudatum</i> .....	57
<b>Figure 21.</b> Extraction des hétérosides flavoniques <i>T.nudatum</i> Del.....	59
<b>Figure 22.</b> Injection de la carragénine (1%) et mesure de l'œdème de la patte injectée à l'aide un pied à coulisse.....	63
<b>Figure 23.</b> Injection des souris par l'acide acétique (0.6%) et observation des crampes abdominales.....	65
<b>Figure 24.</b> Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) et de la CMB (concentration minimale bactéricide) des extraits phénoliques de la plante.....	67
<b>Figure 25.</b> Cals primaires induits sur l'explant de feuille de <i>T.nudatum</i> Del en milieu MS.....	70
<b>Figure 26.</b> Induction de cals primaires (friables, blanchâtres) sur différents types d'explants obtenus de <i>T.nudatum</i> Del.....	71
<b>Figure 27.</b> Multiplication des cals primaires friables, blanchâtres (A, B, C) en cals secondaires compacts, brunâtres (D) sur le milieu M1 de l'explant de feuille.....	72
<b>Figure 28.</b> Taux de cals formés sur les différents explants de <i>T.nudatum</i> Del en fonction des milieux de culture employés.....	74
<b>Figure 29.</b> Variations du poids corporel (%) des souris durant 14 jours de traitement à différentes doses de l'infusé de <i>T.nudatum</i> Del administré par voie orale.....	91
<b>Figure 30.</b> Pourcentage de viabilité des macrophages en présence des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del.....	93
<b>Figure 31.</b> Evolution heure par heure du pourcentage d'œdème chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA.....	96
<b>Figure 32.</b> Evolution heure par heure du pourcentage de protection chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA.....	97
<b>Figure 33.</b> Effet analgésique de l'infusé et des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del sur les contractions abdominales chez les souris.....	100
<b>Figure 34.</b> Effet antimicrobien des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del sur les souches bactériennes et fongiques.....	102
<b>Figure 35.</b> Zones d'inhibition de l'ExButOH vis-à-vis des souches microbiennes.....	103
<b>Figure 36.</b> Evaluation de la CMB/CMI de l'ExButOH vis-à-vis des souches bactériennes.....	104
<b>Figure 37.</b> Criblage primaire de l'effet leishmanicide des quatre extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del.....	106
<b>Figure 38.</b> Courbe d'inhibition et IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'ExAgL vis-à-vis de <i>L.infantum</i> .....	107

<b>Figure 39.</b> Courbe d'inhibition et IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'ExHét vis-à-vis de <i>L.major</i> .....	107
<b>Figure 40.</b> Courbe d'inhibition et IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'infusé de vis-à-vis de <i>L.killicki</i> .....	107
<b>Figure 41.</b> Teneur en composés phénoliques libres chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ.....	77
<b>Figure 42.</b> Teneur en composés phénoliques liés chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ.....	80
<b>Figure 43.</b> Chromatogrammes d'UPLC-PDA d'extraits phénoliques avec MeOH / H2O et Acétone / H2O .....	83
<b>Figure 44.</b> Chromatogrammes GC-MS des composés volatils de la plante naturelle et des cals. ....	85
<b>Figure 45.</b> Quantification des acides gras chez la plante naturelle et les cals déterminée par GC-FID	89

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification des composés phénoliques (Goodwin et Mercer, 1990). .....	12
<b>Tableau 2.</b> Les classes d'acides hydroxybenzoïques (Manach et al, 2004; Tsao, 2010). .....	13
<b>Tableau 3.</b> Les classes d'acides hydroxycinnamiques (Goodwin et Mercer, 1990; Macheix et al, 2005). .....	13
<b>Tableau 4.</b> Principaux types de coumarines (Richter, 1993; Hopkins, 2003). .....	14
<b>Tableau 5.</b> Les sources végétales les plus riches en composés phénoliques et leurs effets thérapeutiques (Macheix et al, 2005). .....	21
<b>Tableau 6.</b> Quelques plantes médicinales à effets anti-inflammatoires (Barnes, 1998). .....	23
<b>Tableau 7.</b> Quelques plantes médicinales à effets antalgiques. ....	24
<b>Tableau 8.</b> Quelques plantes médicinales à effets antimicrobiens (Ahmad et al, 1998). .....	25
<b>Tableau 9.</b> Quelques plantes médicinales à effet leishmanicide (Brito et al, 2013) .....	26
<b>Tableau 10.</b> Techniques de culture <i>in vitro</i> et leur principales applications (Lachachi, 2010). .....	33
<b>Tableau 11.</b> Description et références des souches microbiennes testées. ....	46
<b>Tableau 12.</b> Description et références des souches parasitaires testées. ....	46
<b>Tableau 13.</b> Les différentes combinaisons hormonales testées pour induire la callogénèse. ....	48
<b>Tableau 14.</b> Pourcentage d'induction de cals des différents types d'explants. ....	73
<b>Tableau 15.</b> Teneur en composés phénoliques libres chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ. ....	76
<b>Tableau 16.</b> Teneur en composés phénoliques liés chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ. ....	79
<b>Tableau 17.</b> Les composés volatils identifiés <sup>1</sup> chez la plante naturelle et les cals par GC-MS. ....	86
<b>Tableau 18.</b> Quantification des acides gras chez la plante naturelle et les cals déterminée par GC-FID <sup>1</sup> .....	88
<b>Tableau 19.</b> Classification de la toxicité des substances pharmacodynamiques. ....	90
<b>Tableau 20.</b> Poids moyen des organes internes chez les souris ayant reçu des doses croissantes de l'infusé de <i>T.nudatum</i> Del. ....	92
<b>Tableau 21.</b> Pourcentage de viabilité des macrophages en présence des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del. ....	93
<b>Tableau 22.</b> Effets de l'infusé, des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del et d'ASA sur l'œdème induit par la carragénine à 1%. ....	95
<b>Tableau 23.</b> Evolution heure par heure du pourcentage d'œdème chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA. ....	96
<b>Tableau 24.</b> Evolution heure par heure du pourcentage de protection chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA. ....	97
<b>Tableau 25.</b> Effet analgésique de l'infusé et des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del sur les contractions abdominales chez les souris. ....	99
<b>Tableau 26.</b> Effet antimicrobien des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del sur les souches bactériennes et fongiques. ....	101
<b>Tableau 27.</b> Effet bactéricide/bactériostatique de l'ExButOH sur les souches bactériennes. ....	104
<b>Tableau 28.</b> Criblage primaire de l'effet leishmanicide des quatre extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del. ....	105
<b>Tableau 29.</b> IC 50 (µg/ml) des extraits phénoliques de <i>T.nudatum</i> Del. ....	108

## Liste des Abréviations

<b>%</b>	Pourcentage
<b>° C</b>	Degré Celsius
<b>µL</b>	Microlitre
<b>Mm</b>	Micromètre
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>G</b>	Gramme
<b>H</b>	Heure
<b>HCL</b>	Acide chlorhydrique
<b>J</b>	Jour
<b>Kg</b>	Kilogramme
<b>Km</b>	Kilomètre
<b>Km<sup>2</sup></b>	Kilomètre carré
<b>M</b>	Masse
<b>m</b>	Mètre
<b>mg</b>	Milligramme
<b>min</b>	Minute
<b>mL</b>	Millilitre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>cm</b>	Centimètre
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>S</b>	Seconde
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>V</b>	Volume
<b>W</b>	Poids
<b>UPLC-MS</b>	Ultra Performance Liquide Chromatographie à la Masse Spectrométrie
<b>UPLC-PDA</b>	Ultra-Performance Liquide Chromatographie couplée au Détecteur de Photodiode Array
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Masse Spectrométrie
<b>GC-FID</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Détecteur d'Ionisation de Flamme
<b>AAS</b>	Acide Acétyl-Salicylique
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>C</b>	Carbone
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>DL50</b>	Dose Létale 50
<b>ExAgL</b>	Extrait d'aglycones libres
<b>ExButOH</b>	Extrait butanolique
<b>ExEth</b>	Extrait étheré

<b>ExHét</b>	Extrait d'hétérosides flavoniques
<b>p.c.</b>	Poids corporel
<b>TR</b>	Temps de Rétention
<b>NNN</b>	Novy Nicolle Mc Neal
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SbIII</b>	Antimoine trivalent
<b>SVF</b>	Serum de Veau Foetal
<b>IPA</b>	Institut Pasteur d'Algérie
<b>LIPA</b>	Leishmania Institut Pasteur d'Algérie
<b>NAA</b>	Naphthalene-Acetic Acid.
<b>2,4-D</b>	2,4-Dichloro-phenoxy-acetic acid.
<b>BAP</b>	6-Benzyl-Amino-Purine.
<b>MeOH</b>	Methanol
<b><i>T.nudatum</i> Del</b>	<i>Traganum nudatum</i> Delile
<b>MS</b>	Murashig et Skoog

## Résumé

---

Considérée comme moins agressive que les médicaments habituels, la phytothérapie est abondamment utilisée avec succès dans le monde surtout où la médecine moderne reste inaccessible.

L'Algérie est connue pour la diversité de sa végétation grâce aux grandes variations climatiques, regorgeant ainsi d'une flore très riche.

*Traganum nudatum* Delile, plante médicinale de la famille des *Chenopodiaceae*, est une espèce du Sahara Algérien utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus phytochimiques peu valorisées et peu étudiées. La démarche entreprise dans cette thèse était d'apporter des éléments scientifiques permettant la validation de certaines propriétés thérapeutiques de cette plante, par l'étude biotechnologique de son pouvoir callogène, suivie d'une étude phytochimique comparative de son métabolome par l'analyse qualitative et quantitative et enfin par l'étude biologique qui englobant les effets antibactériens, antifongiques et antiparasitaires ainsi que les effets toxiques, cytotoxiques, antalgiques et anti inflammatoires.

Les résultats de ce travail inédit ont montré que sur le plan biotechnologique, les explants végétatifs de la partie aérienne se sont révélés idéales pour initier la multiplication *in vitro* par la différenciation des amas cellulaires en embryons somatiques et ce grâce à une composition du milieu contenant du 2.4-D, l'ANA, et de la kinetine.

Pharmacologiquement, l'évaluation de la toxicité aigüe *in vivo* de l'infusé de la plante a montré qu'il peut être classé comme extrait de très faible toxicité (DL50 > 6000 mg/kg), en plus du potentiel anti-inflammatoire et antalgique remarquable prouvé par les tests *in vivo*.

L'étude microbiologique a révélé un effet antifongique, bactéricide et bactériostatique de l'extrait n-butanolique sur certaines souches. Les résultats de l'effet anti parasitaire sur des espèces de *Leishmania* endémiques en Algérie ont révélé un potentiel inhibiteur de moindre effet mais pas moins intéressant vu l'innocuité des extraits de plante et leur IC50 relativement basse.

Enfin, sur le plan phytochimique, en plus de l'infusé obtenu par la méthode traditionnelle, l'extraction des composés phénoliques a permis l'obtention de quatre extraits phénoliques : l'extrait éther-diéthylique (ExEth), n-butanolique (ExButOH), hydro-alcoolique (ExHét), et enfin, les aglycones libre (ExAgL).

Les analyses UPLC-MS-PDA et GC-MS-FID, ont mis en évidence de nombreux composés phénoliques dont le narcissoside, l'acide vanillique, le kaempférol, la rutine... etc, ainsi que des composés appartenant à la classe des acides gras, tels que l'acide palmitique et l'acide béhénique.

A la lumière des résultats obtenus, il est clair que de par sa richesse en métabolites secondaires, *T.nudatum* Del possède des propriétés pharmacologiques dont certaines ont pu être scientifiquement prouvées pour la première fois confirmant ainsi son emploi dans la pharmacopée traditionnelle. Cela dit, la poursuite des études sur d'autres propriétés pharmacodynamiques devraient être entreprises en parallèle aux études chimiques afin d'isoler les molécules bioactives et d'éluder leur mécanisme d'action et *in fine* de pouvoir produire ces molécules *in vitro* grâce à la callogénèse.

**Mots clés :** *Traganum nudatum* Delile ; Polyphénols ; Callogénèse ; UPLC-MS ; GC-MS.

## Summary

---

Considered as less aggressive than usual drugs with fewer side effects, herbal medicine is widely used with success in the world, especially where modern medicine remains inaccessible.

Algeria is known for its vegetation due to great climatic variations, with a very rich diversity of flora.

*Traganum nudatum* Delile, a medicinal plant of Chenopodiaceae family, is a species from the Algerian Sahara used in traditional medicine for its undervalued and understudied phytochemical properties. The approach undertaken in this thesis was to provide scientific elements allowing the validation of certain therapeutic properties of this plant, by the biotechnological study of its callogenic properties, followed by a phytochemical study of its metabolome and finally, by the biological study which encompasses the antibacterial, antifungal and antiparasitic effects as well as the toxic, cytotoxic, analgesic, and anti-inflammatory effects.

The results of this original work have shown that, from a biotechnological point of view, the aerial part of vegetative explants have proven to be ideal for initiating the plant *in vitro* multiplication by cell differentiation into somatic embryos and this is due to the medium composition containing 2.4-D, ANA, and kinetin.

Pharmacologically, the evaluation of the acute toxicity of the infusion's plant on mice showed that it can be classified as a substance with a very low toxicity ( $LD_{50} > 6000$  mg/kg), in addition of its proven remarkable anti-inflammatory and analgesic potential.

The microbiological study revealed an antifungal, bactericidal and bacteriostatic effect of the n-butanol extract on certain bacterial strains. The results of the anti-parasitic effect on Algerian endemic *Leishmania* species revealed a lesser inhibitory effect but no less interesting regarding the safety of plant extracts and their relatively low  $IC_{50}$ .

Finally, on the phytochemical aspect, in addition to the plant's infusion obtained by the traditional method, the extraction of the phenolic compounds allowed to obtain four phenolic extracts: the diethyl ether extract (ExEth), the n-butanol (ExButOH), the hydro-alcoholic (ExHet), and finally, the free aglycones (ExAgL).

UPLC-MS-PDA and GC-MS-FID analysis revealed numerous phenolic compounds including narcissoside, vanillic acid, kaempferol, rutin etc... as well as compounds belonging to the class of fatty acids, such as palmitic acid and behenic acid.

In the light of the results obtained, it is clear that due to its richness in secondary metabolites, *T.nudatum* Del has pharmacological properties, some of which have been scientifically proven for the first time, confirming its use in the traditional pharmacopoeia. So, further studies on other pharmacodynamic properties should be undertaken in parallel with chemical studies to isolate the bioactive molecules and to elude their mechanism of action and ultimately to be able to produce these molecules *in vitro* through callogenesis.

**Key words:** *Traganum nudatum* Delile ; Polyphenols ; Callogenesis ; UPLC-MS ; GC-MS

باعتبار الأعشاب الطبية أقل عدوانية من الأدوية المعتادة، فإنها تستخدم على نطاق واسع وبنجاح في العالم، خاصة في المناطق حيث لا يزال الطب الحديث متعذر الوصول إليها.

فضلا عن موقعها الجغرافي وامتدادها بين البحر الأبيض المتوسط وصحراء إفريقيا، تشتهر الجزائر بتنوع نباتاتها بفضل الاختلافات المناخية الكبيرة، وبالتالي فهي تزخر بغطاء نباتي غني ومتنوع جدا.

طراغانوم نوداتوم دليل هو نوع من نباتات الصحراء الطبية الذي ينتمي إلى عائلة كينوبودياسي، يستخدم في الطب التقليدي لخصائصه الكيميائية التي لم يتم تقييمها ودراستها بالشكل الكافي.

لذلك فإن المنهج المتبع في هذه الأطروحة هو توفير العناصر العلمية التي تسمح بالتحقق من صحة بعض الخصائص العلاجية لهذا النبات، من خلال دراسة التكنولوجيا الحيوية لقوته الكالوجينية، متبوعة بدراسة كيميائية للأبيض عن طريق التحليل النوعي والكمي. وأخيرا دراسة بيولوجية تشمل التأثيرات المضادة للبكتيريا والفطريات والطفيليات وكذلك التأثيرات السامة والسمية للخلايا والمسكنات والمضادة للالتهابات.

أظهرت نتائج هذا العمل أنه من ناحية الدراسة التكنولوجية الحيوية، الجزء العلوي للنبات ط. نوداتوم هو الجزء المثالي لبدء التكاثر في المختبر عن طريق تمييز مجموعات الخلايا إلى أجنة وهذا بفضل تكوين الوسط الذي يحتوي على هرمونات معينة.

من الناحية الدوائية، أظهر اختبار السمية الحادة لمستخلصات النبات أنه يمكن تصنيف المستخلص الذي تم نفعه على أنه مستخلص منخفض السمية < 6000 مغ/كغ، بالإضافة إلى مضادات الإلتهاب والألم والتي تم إثباتها من خلال الاختبارات على فئران المختبر.

كما كشفت الدراسة الميكروبيولوجية عن وجود تأثير مضاد للفطريات والجراثيم لمستخلصات ط. نوداتوم على سلالات معينة، كما أظهرت نتائج التأثير المضاد للطفيليات على أنواع الليشمانيا المتوطنة في الجزائر وجود إمكانية مثبطة منخفضة نسبيا ولكن ليس أقل إثارة للاهتمام بالنظر إلى سلامة المستخلصات النباتية.

أخيرا على المستوى الكيميائي، وبالإضافة إلى المنقوع الذي تم الحصول عليه بالطريقة التقليدية، تمكنا من استخراج أربعة مركبات فينولية مختلفة.

كما كشفت التحليلات الكيميائية النوعية والكمية وجود عدة مركبات فينولية مثل النرجسوزيد، حمض الفانيليك، الكامفيرول والروتين وما إلى ذلك بالإضافة إلى المركبات التي تنتمي إلى فئة الأحماض الدهنية، مثل حمض البالمتيك وحمض البيهينيك.

في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها، يتضح أن ط. نوداتوم هو نبات غني بالمركبات الفينولية ذو خصائص دوائية، بعضها تم إثباتها علميا لأول مرة، مما يؤكد ويثبت استخدامه في الطب التقليدي من قبل السكان المحليين. ومع ذلك، ينبغي مواصلة الدراسات والأبحاث حول الخصائص الدوائية الديناميكية الأخرى بالتوازي مع الدراسات الكيميائية من أجل عزل الجزيئات النشطة بيولوجيا ودراسة آلية عملها وفي النهاية إنتاج هذه الجزيئات في المختبر من خلال تكوين الكالوجين.

**الكلمات الرئيسية** طراغانوم نوداتوم دليل ؛ المركبات الفينولية ؛ تكوين الكالس ؛ الكروماتوغرافيا السائلة ؛ الكروماتوغرافيا الغازية

# *Introduction*

## ***Introduction***

---

Depuis des milliers d'années, les hommes ont utilisé les plantes comme principale source de remèdes et médications traditionnelles contre de nombreuses maladies. En effet, la première preuve d'utilisation de plantes médicinales remonte à 60.000 ans selon des recherches archéologiques trouvées en Irak (Se Padua et *al* 1999). Le Botaniste et pharmacologue grec Dioscoride (50 ans avant J.C) a décrit en détail quelque 500 espèces médicinales et Claude Galien (environ 200 ans après J.C) a compilé quelque 304 remèdes à base de plantes connus populaires à son temps (Baumann, 1993). La botanique et la phytothérapie occupèrent donc une partie centrale non pas seulement dans les sciences médico-pharmaceutiques mais dans toutes les civilisations, y compris la civilisation arabo- islamique où des chimistes musulmans ont découvert une grande quantité de médicaments à base de plantes, comme Al-Dinawari qui a décrit au IX<sup>e</sup> siècle près de 634 plantes médicinales

et Ibn Al-Baitar au XIII<sup>e</sup> siècle qui a décrit pas moins de 1400 plantes (<https://dilap.com/civilisation-arabe/la-medecine-arabe-au-moyen-age/>).

Considérée comme moins agressive que les médicaments habituels avec moins d'effets secondaires, la phytothérapie est abondamment utilisée avec succès dans le monde surtout où la médecine moderne reste en grande partie inaccessible. Aujourd'hui, environ 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle à base de plantes; elle joue un rôle déterminant dans le traitement de certaines pathologies (El Rhaffari et Zaid, 2002).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 35.000 et 70.000 espèces ont été utilisées jusqu'à présent comme médicaments, un chiffre correspondant à 14-28% des 250.000 espèces végétales estimées dans le monde (Farnsworth et *al*, 1981) et équivalent à 35-70% de toutes les espèces utilisées dans le monde (Heywood V. 1991).

Les effets pharmacologiques vastes des plantes médicinales dépendent essentiellement de leurs constituants phytochimiques, généralement répartis en deux catégories en fonction de leur rôle dans les processus métaboliques de base, à savoir les métabolites primaires et secondaires (Al Hussein et *al* 2019). Les composés phénoliques représentent l'un des groupes de métabolites secondaires les plus répandus et les plus importants dans la nature du fait d'avoir une faible toxicité et de nombreuses propriétés biologiques notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (Balasundram et *al*, 2006).

Même si les plantes médicinales demeurent encore à ce jour une source considérable de soins médicaux, les règles de leur utilisation dans les pays en voie de développement manquent souvent de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences des

## ***Introduction***

---

techniques thérapeutiques modernes pour vérifier leurs suretés et leurs efficacités (Bellakhdar, 2006).

De par sa position géographique et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique Sub-saharienne, l'Algérie est connue pour la diversité de sa végétation due aux grandes variations climatiques, regorgeant ainsi d'une flore très importante et riche. La zone Saharienne présente une flore spécifique fréquemment utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, caractérisée par une importante diversité floristique renfermant de nombreuses espèces hautement adaptées au climat de cette zone. Ces espèces métabolisent un large éventail de composés et d'éléments phytochimiques d'intérêt thérapeutique (Ozenda, 1977; Duraffourd et al, 1997) dont certaines ont fait l'objet d'études phytochimiques telles que *Launaea resedifolia*; *Pergularia tomentosa* L et *Launaea arboescens*, et ont abouti à l'isolement et à l'identification de plusieurs principes actifs. (Moussaoui et al, 2010; Babaamer et al, 2012; Sekkoum et al, 2014).

C'est dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel algérien que s'inscrit la présente thèse qui s'intéresse à *Traganum nudatum* Delile, plante médicinale appartenant à la famille des *Chenopodiaceae*, une espèce du Sahara Algérien présentant plusieurs applications en médecine traditionnelle jusqu'aujourd'hui peu valorisées et peu étudiées. La démarche entreprise dans cette thèse est d'apporter des éléments scientifiques permettant la validation de certaines propriétés thérapeutiques de cette plante, et cela en réalisant une étude biotechnologique qui consiste à évaluer son pouvoir callogène, suivie d'une étude phytochimique du métabolome de la plante par l'analyse qualitative et quantitative de métabolites susceptibles de posséder une activité pharmacologique et enfin l'étude biologique qui englobe les effets antibactériens, antifongiques et antiparasitaires d'un côté et d'un autre côté les effets toxique, cytotoxiques, antalgiques et anti inflammatoires.

*Chapitre I*  
*Synthèse*  
*bibliographique*

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

## **1. Les plantes médicinales**

Les plantes médicinales représentent depuis des siècles un réservoir thérapeutique important. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 80% de la population mondiale utilise la phytothérapie pour traiter diverses affections (Farnsworth et Kass, 1981). Une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est médicinal, c'est-à-dire que les plantes sont utilisées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard de certaines maladies humaines ou animales ; ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (Chabrier, 2010).

Avec l'avènement de la chimie moderne et plus précisément la chimie végétale, l'étude des plantes médicinales a permis de déterminer les mécanismes d'action régissant les propriétés thérapeutiques concédées par l'usage traditionnel, et a également ouvert la voie à l'utilisation de produits d'extraction ou de synthèse, car une bonne connaissance de la composition chimique des plantes conduit à une meilleure compréhension de son éventuelle valeur médicinale et thérapeutique (Jorite, 2015).

L'activité d'une plante est communément rattachée à la présence de principes actifs qu'elle renferme, ces derniers sont des molécules présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. La plante synthétise une grande variété de composés chimiques, qui peuvent être divisés en métabolites primaires et secondaires selon la classe chimique, l'origine biosynthétique et les groupes fonctionnels (Chabrier, 2010).

## **2. Les métabolites primaires**

Ils constituent l'intégrité physique de la cellule végétale et sont impliqués dans le processus métabolique primaire de construction et de maintien des cellules vivantes. Ils comprennent les composants de processus tels que la glycolyse, le cycle de Krebs ou de l'acide citrique, la photosynthèse et les voies associées. Les métabolites primaires comprennent de petites molécules telles que les sucres, les acides aminés, les acides tricarboxyliques, les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et enfin les lipides dont les acides gras constituent l'unité principale de structure (Nabours, 2008).

### **2.1. Les protéines**

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés liés par une liaison peptidique. Ce sont des molécules biologiques de première importance impliquées entre autre

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

dans la communication intra et intercellulaire permettant la coordination du métabolisme cellulaire, ainsi que la défense immunitaire de l'organisme vivant (Moussared, 2006).

## **2.2. Les glucides**

Les glucides sont des sucres constitués de carbone, hydrogène et oxygène, ils constituent une importante source d'énergie pour l'organisme (l'amidon chez les végétaux). Ils jouent un rôle dans la protection de la structure cellulaire (sous forme de fibre comme la cellulose, la chitine...etc) et dans la reconnaissance cellulaire (glycoprotéines et glycolipides membranaires) (Moussared, 2006).

## **2.3. Les lipides**

Les lipides sont des substances organiques constituées principalement de carbone, hydrogène et oxygène ; sa composition en acides gras permet de former les phospholipides membranaires autour de la cellule. Ils jouent le rôle de précurseurs des hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine ...etc, ainsi que dans le transport de vitamines. (Louisot, 1983).

Les acides gras sont constitués d'une chaîne de carbone et d'un groupement carboxyle (-COOH) aux extrémités terminales (**Figure 1**) (Aderian et *al*, 2003). Ils présentent une excellente source d'énergie pour l'organisme vivant et constituent l'unité principale de structure lipidique, ils sont souvent stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux et contribuent également à la constitution de la bicouche lipidique des membranes cellulaires (Arterburn et *al*, 2006).

Selon la structure et le nombre de liaisons dans la chaîne carbonée, on distingue les acides gras saturés et insaturés (Savary et *al*, 2012) :

### **2.3.1. Acides gras saturés (AGS)**

Ils possèdent une liaison simple entre les atomes de carbone comme l'acide palmitique (Norris, 2005). Ce sont des molécules à intérêt biologique mais leur excès peut causer des dérèglements métaboliques (Legrand, 2009); on les retrouve dans les viandes, les produits laitiers et dans quelques huiles tropicales (Simopoulos et Robinson, 1998).

### **2.3.2. Acides gras insaturés (AGIS)**

Ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons sur la chaîne carbonée, on distingue :

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## A. Acides gras mono-insaturés (AGMI)

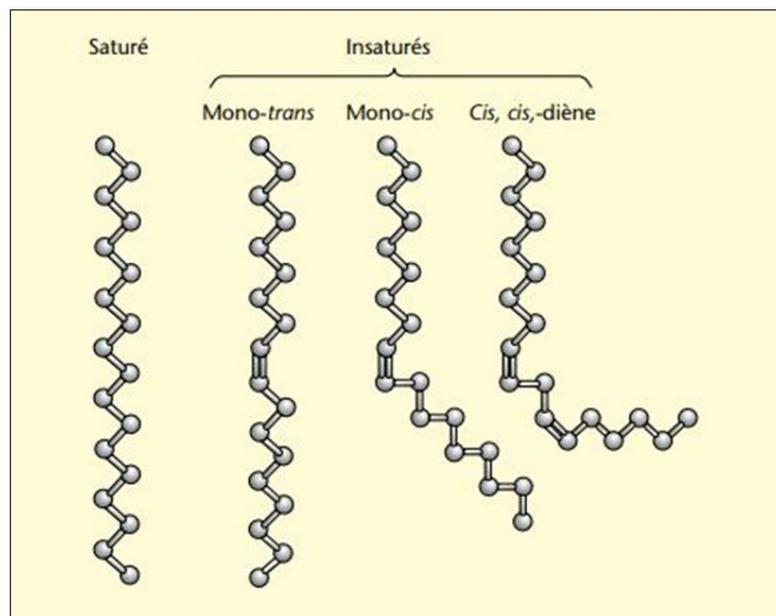
Ils possèdent une seule double liaison dans la chaîne carbonée (Ex : l'acide oléique dans l'huile d'olive) ; ils sont très bénéfiques et jouent un rôle de protection du système cardio-vasculaire, ils réduisent aussi le risque de certains troubles métaboliques tels que le diabète (Simopoulos et Robinson, 1998).

## B. Acides gras polyinsaturés (AGPI)

Ce sont les acides gras qui possèdent deux ou plusieurs doubles liaisons comme l'acide linoléique, l'huile de poisson par exemple est l'huile la plus riche en AGPI (Simopoulos et Robinson, 1998).

## C. Acides gras trans (AGT)

C'est un acide gras insaturé (mono-insaturé ou polyinsaturé) ayant au moins une double liaison en configuration trans, c'est-à-dire une addition de deux atomes d'hydrogène situés de part et d'autre de la chaîne carbonée. C'est une configuration assez rare dans la nature et souvent issue d'une manipulation humaine (Morin, 2005).



**Figure 1.** Structure des acides gras saturés, insaturés cis et trans (Morin, 2005).

Les acides gras et particulièrement les polyinsaturés sont impliqués dans la protection des maladies cardio-vasculaires (Durand et *al*, 2002), dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs et la synthèse de dérivés oxygénés biologiquement actifs (Alessandri et *al*, 2004). Ce sont des molécules largement impliquées dans la régulation des réactions inflammatoires (Bauer, 2007). Ils possèdent également des propriétés antifongiques et

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

antibactériennes que l'on retrouve dans certaines plante médicinales tels que *Chenopodium ambrosioides* Linn et *Cajanus cajan* Linn (Pandey et al, 2013, Elyasi et al, 2019).

## 3. Les métabolites secondaires

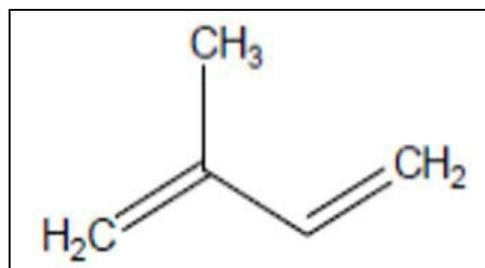
D'autres composés issus du métabolisme des végétaux appelés « métabolites secondaires » qui contrairement aux métabolites primaires ne jouent pas un rôle vital pour la cellule, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (Slade et al, 2005). Les métabolites secondaires sont des éléments essentiels de coévolution des plantes avec les organismes vivants qui les entourent (Judd et al, 2002) ; ils ont été décrits comme antibiotiques, antifongiques et antiviraux et sont donc capables de protéger les plantes contre les agents pathogènes et aussi les rendre résistantes aux diverses conditions environnementales, telles que le stress hydrique, la salinité...etc. (Meena et Patni, 2008).

De nos jours, un grand nombre de ces composés est utilisé en médecine moderne, dont plusieurs milliers ont été caractérisés chez les végétaux, ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier. Ils sont répartis en trois grandes familles chimiques : les composés terpéniques, les composés azotés (ou alcaloïdes) et les composés phénoliques (Meyer et al, 2008).

### 3.1. Les composés terpéniques

Ce sont des molécules hydrocarbonées issues de la voie métabolique de glycolyse, du cycle de Krebs et de la voie de Shikimate (Soualeh et Soulimani, 2016). Elles constituent un vaste groupe de métabolites secondaires synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons ainsi que les animaux (**Figure 2**). Les terpénoïdes ont des activités biologiques et pharmacologiques très variées : anti-inflammatoires, antivirales, analgésiques, antibactériennes et antifongiques (Bisoli et al, 2008 ; Bruneton, 2009).

L'unité de base des terpènes est l'isoprène.



**Figure 2.** Structure de base des terpénoïdes (Boumaza, 2011).

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

Selon le nombre d'unités d'isoprènes on distingue plusieurs classes de terpènes (Richter, 1993 ; Guignard, 1996) :

## **3.1.1. Les monoterpènes**

Ils comportent dix atomes de carbone, issus de couplage de deux unités isopréniques ; ils sont considérés comme l'un des constituants majeurs des huiles essentielles. Ils peuvent être acycliques (Ex: Mycènes), monocycliques (Ex: Terpinènes) ou bicycliques (Ex: Pinéne) (Bruneton, 1999).

## **3.1.2. Les sesquiterpènes**

Le squelette de base est constitué de 15 atomes de carbone, constitué de trois unités isopréniques. Ce type de terpène est très répandu chez les végétaux, il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes avec plus de 3000 molécules décrites, par exemple :  $\beta$ -caryophyllène et  $\beta$ -bisabolène (Wink, 2003).

## **3.1.3. Les diterpènes**

Ce sont des composés de 20 atomes de carbone, formés de quatre unités d'isoprène, très répandus chez les végétaux supérieurs.

## **3.1.4. Les triterpènes**

Ils sont composés de 30 atomes de carbone, issus de la liaison de six unités d'isoprène; cette classe de terpènes comprend des gibbérellines qui sont des phyto-hormones impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux, tels que la germination.

## **3.1.5. Les stéroïdes**

Ils possèdent une structure de 27 atomes de carbone, ce sont des composés dérivés des triterpènes. On les considère comme des terpènes tétracycliques qui ont perdu au minimum trois méthyles.

## **3.1.6. Les stérols**

D'un point de vue structural, les stérols sont caractérisés par la présence d'un hydroxyle libre étherifié (glucoside) ou stérifié en position 3 du noyau.

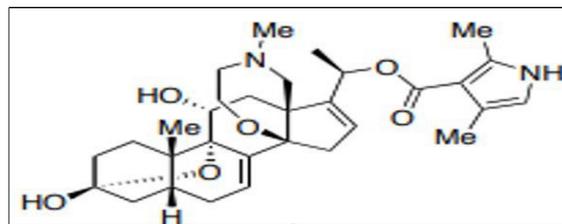
## **3.1.7. Les saponines**

Le mot saponine vient du latin « *sapo* » qui veut dire savon. Ce sont des glycosides au poids moléculaire élevé regroupant un ensemble complexe et très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes (Hartmann, 2007).

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## 3.2. Les composés azotés (Alcaloïdes)

Ce sont des substances organiques complexes caractérisées par la présence dans leur structure d'un atome d'azote leur conférant une propriété basique ou alcaline d'où leur nom « alcaloïdes » (**Figure 3**). Ils constituent l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec plus de 10.000 structures chimiques variées (Roberts et Wink, 1998 ; Stöckigt et *al*, 2002). Les alcaloïdes existent sous forme de sels (malates, méconates, isobutyrate...etc), et sous forme combinée avec les tanins (Bouhadjra, 2005). Ils se trouvent à des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles des plantes. Les alcaloïdes sont donc des produits aminés naturels aux effets physiologiques prononcés même à faible dose (Hurabielle et Paris, 1980; Facchini, 2001) dont beaucoup d'entre eux sont toxiques comme la strychnine ou l'aconitine, toutefois, certains sont très utilisés en médecine pour leurs propriétés analgésiques comme la morphine ou la codéine, dans le domaine de sédation (anesthésie) comme l'atropine, comme agents antiparasitaires antipaludéens comme la quinine et la chloroquine, ou comme agents anticancéreux comme le taxol, la vinblastine ou la vincristine.



**Figure 3.** Structure de base des alcaloïdes (Julien, 2015).

On distingue trois classes d'alcaloïdes :

### 3.2.1. Les alcaloïdes vrais

De structure souvent complexe présentant au moins un hétérocycle azoté. Ils existent à l'état de sels chez les plantes et sont synthétisés à partir des acides aminés. Ces composés présentent des activités pharmacologiques considérables.

### 3.2.2. Les pseudo-alcaloïdes

Ces substances présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, sauf leur origine de biosynthèse, en effet, elles ne sont pas dérivées des acides aminés, mais plutôt majoritairement des isoprènes et du métabolisme de l'acétate.

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

## **3.2.3. Les proto-alcaloïdes**

Ce sont des substances qui dérivent des acides aminés, où l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique (Bruneton, 1999).

## **3.3. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques ou « polyphénols » sont l'un des groupes de substances chimiques les plus variées, leur faible toxicité et leur propriétés thérapeutiques, pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques rendent cette classe de métabolites secondaires très importante (Havsteen, 2002). Ils constituent une grande famille de composés chimiques très diversifiés, allant de molécules simples comme les acides phénoliques aux composés hautement polymérisés tels que les tanins condensés (Lugasi et *al*, 2003). Ils sont présents principalement dans les fruits et les légumes (Aherne et O'Brien, 2002; Brat et *al*, 2006), et sont retrouvés également dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de la plupart des végétaux (Middleton et *al*, 2000), et surtout dans les plantes médicinales qui peuvent contenir une grande variété de ces composés comme les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins, les lignanes et les lignines (Cieslik et *al*, 2006; Djeridane et *al*, 2006). Près de 8000 composés phénoliques ont été isolés et identifiés (Hennebelle et *al*, 2004). Cela dit, malgré cette diversité, l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux benzéniques auxquels est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre qui peut être également estérifié, étherifié et lié à des sucres sous forme d'hétérosides (Raven et *al*, 2000; Bohorun, 1997; Marouf et Reynaud, 2007). Leur structure contient exclusivement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, et sont dépourvus d'azote (Richter, 1993; Nabors, 2008). Dans la nature, les principaux composés phénoliques ne se trouvent pas à l'état libre mais plutôt sous forme d'esters ou d'hétérosides (Ribereau-Gayon, 1968). La teneur en composés phénoliques est fortement liée à plusieurs facteurs tels que le stade de croissance, le degré de maturité, la saison et le climat de l'environnement (Lugasi et *al*, 2003; Manach et *al*, 2004; Naczki et Shahidi, 2006), leur répartition qualitative et quantitative diffère selon les espèces végétales (Macheix, 1996).

### **3.3.1. Biosynthèse des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies métaboliques: la voie du shikimate et la voie de polyacétate (Harborne, 1989) (**Figure 4**).

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

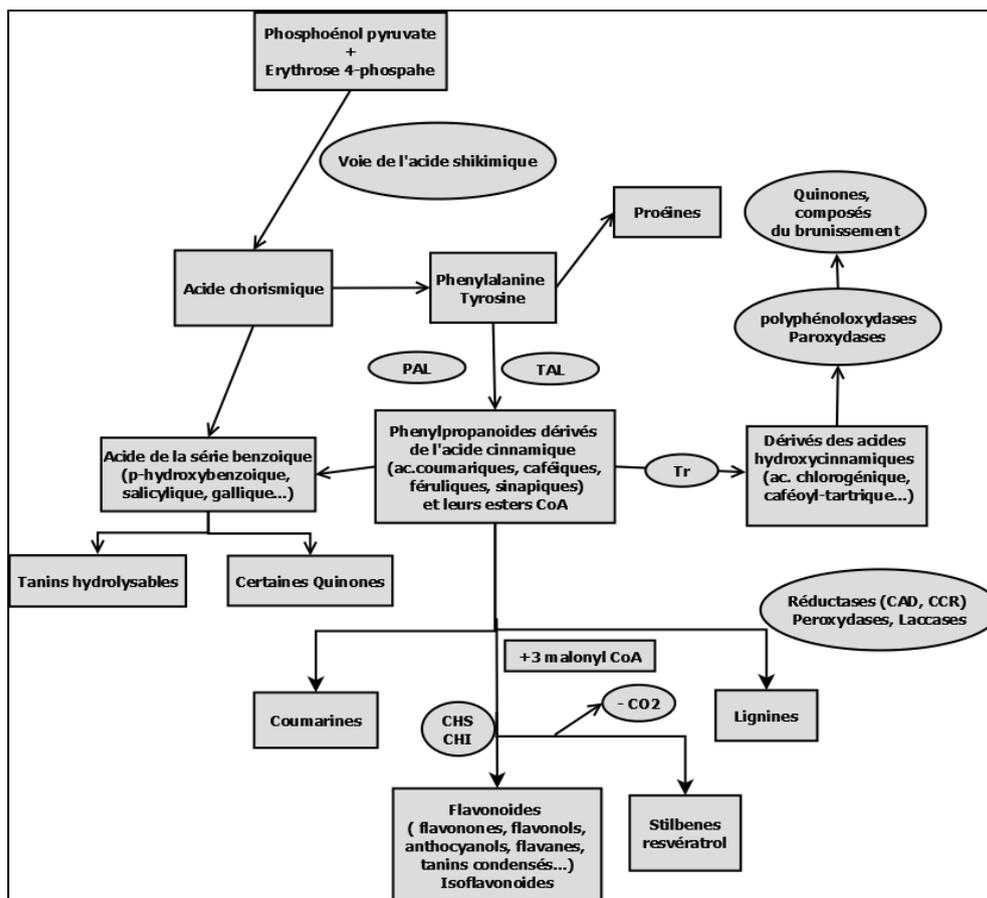
### **A. Voie du shikimate**

C'est la voie de biosynthèse la plus courante, elle débute par une désamination oxydative de deux acides aminés aromatiques : la phénylalanine et la tyrosine en acide cinnamique et en acide *p*-coumarique respectivement et cela grâce à des enzymes spécifiques : la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL) et la Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL) respectivement. Ensuite, un groupement OH en C-4 du noyau aromatique de l'acide cinnamique est ajouté par la Cinnamate 4-Hydroxylase permettant de former également l'acide *p*-coumarique. Enfin, l'enzyme 4-Coumarate-CoA Ligase catalyse l'acide *p*-coumarique pour former le *p*-coumaroyl-CoA (**Figure 4**), précurseur de tous les phénylpropanoïdes (C6-C3) ainsi que de nombreux acides phénoliques. (Richter, 1993; Hopkins, 2003).

### **B. Voie de polyacétate**

Cette voie consiste en la condensation et la polymérisation répétée d'unités d'acétates sous la forme de malonyl-CoA, suivie par des cyclisations et une étape spontanée d'aromatisation du noyau phénolique (**Figure 4**). Cette voie de biosynthèse concerne principalement certaines quinones et acétophénonnes (Richter, 1993).

La pluralité structurale des composés phénoliques et leur double origine de biosynthèse augmente la possibilité d'une participation simultanée des deux voies de biosynthèse (la voie de shikimate et la voie de polyacétate) et l'élaboration des composés d'origine mixte (Bruneton, 2009).



**Figure 4.** Les grandes voies de biosynthèse des principaux groupes des composés phénoliques (voie mixte) (Macheix et al, 1996). *PAL*: Phénylalanine Ammonia Lyase, *TAL*: Tyrosine Ammonia Lyase, *CCR*: Cinnamate CoA Réductase, *CAD*: Cinnamyl Alcool Déshydrogénase, *CHS*: Chalcone Synthase, *CHI*: Chalcone flavanone Isomérase, *TR*: Transférase.

### 3.3.2. Classification des composés phénoliques

La complexité du squelette de base est le principal critère de classification des composés phénoliques, la composition de ce squelette peut aller d'un simple C6 à des formes très polymérisées, par ailleurs la classification est basée sur le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...etc) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides et protéines) (Macheix et al, 2005). Les polyphénols sont classés en de nombreuses grandes classes regroupant des composés allant de formes simples (phénols simples, acides hydroxybenzoïques...etc) aux phénols condensés issus de la polymérisation des lignanes ou de certains flavonoïdes comme les tanins (Goodwin et Mercer, 1990 ; Bohorun, 1997; Meyer et al, 2008) (**Tableau 1**).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**Tableau 1.** Classification des composés phénoliques (Goodwin et Mercer, 1990).

Classe	Squelette carboné	Nombre de carbone
Phénols simples	C <sub>6</sub>	6
Acides phénoliques (Ex : Acides hydroxy benzoïques)	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	7
Acides phénylacétiques	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	8
Coumarines	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	9
Naphtoquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	10
Xanthones	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	13
Stilbènes	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	14
Flavonoïdes	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	15
Lignanes	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	18
Lignines	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	N
Tanins condensés	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	N

### A. Phénols simples

Les phénols simples sont des composés dont le squelette de base est constitué d'au moins un groupe hydroxyle attaché à un noyau aromatique comme le phénol, le cathécol et le résorcinol. Ce sont des composés que l'on retrouve rarement libres chez les végétaux, mais combinés à d'autres composés comme l'acide cinnamique (Kougan et *al*, 2013).

### B. Acides phénoliques simples

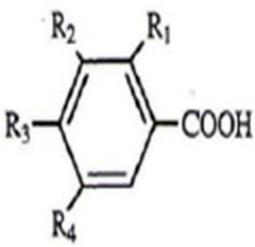
Ils représentent les formes les plus simples des composés phénoliques. Le terme d'acide phénolique peut être attribué à tout composé organique possédant au moins une fonction carboxylique (-COOH) et un hydroxyle phénolique ; cette classe comporte deux grands groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

### C. Acides hydroxybenzoïques

Présents généralement en faible quantité chez les végétaux (Manach et *al*, 2004), ils dérivent de l'acide benzoïque et se trouvent généralement sous forme d'esters ou de glucosides (Guignard, 2000; Macheix et *al*, 2005), on les retrouve aussi bien sous forme libre que combinée à des fonctions d'ester ou d'hétéroside (**Tableau 2**) et rentrent également dans la structure des tannins hydrosolubles et se trouvent.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

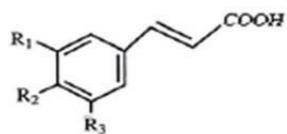
**Tableau 2.** Les classes d'acides hydroxybenzoïques (Manach *et al.*, 2004; Tsao, 2010).

Structure de base	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acides benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

### D. Acides hydroxycinnamiques

Ces acides dérivent de l'acide cinnamique et sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques (**Tableau 3**); ils sont rarement retrouvés sous forme libre mais plutôt combinés le plus souvent à une gamme très étendue de composés pour donner des formes estérifiées (Ribereau-Gayon, 1968; Goodwin et Mercer, 1990), amidifiés, ou combinés avec des sucres comme l'éther de glucose ou plus fréquemment l'ester de glucose (Bruneton, 2009). L'acide caféique est l'acide phénolique qui est retrouvé majoritairement dans les fruits et les légumes et représente 75 à 100% de toutes les teneurs en acides hydroxycinnamiques (Manach *et al.*, 2004).

**Tableau 3.** Les classes d'acides hydroxycinnamiques (Goodwin et Mercer, 1990; Macheix *et al.*, 2005).

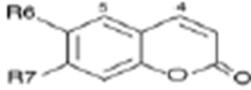
Structure de base	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Acides phénoliques
	H	H	H	Acides cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide férulique
	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide sinapique

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## E. Coumarines

Les coumarines appartiennent au groupe de lactones issues du cycle de formation des acides hydroxycinnamiques et ont un squelette en C6-C3 (**Tableau 4**), elles sont très répandues dans les écorces et les racines des dicotylédones ; elles sont retrouvées soit à l'état libre ou bien combinées à des sucres (hétérosides et glycosides) ; cette glycosylation serait une forme de stockage dans la cellule permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines (Guignard, 2000; Hopkins, 2003; Paume, 2009; Cheynier *et al*, 2013). Ces composés constituent un outil de défense, c'est pour cette raison qu'ils sont produits en grandes quantités par les plantes (Vivas, 2001).

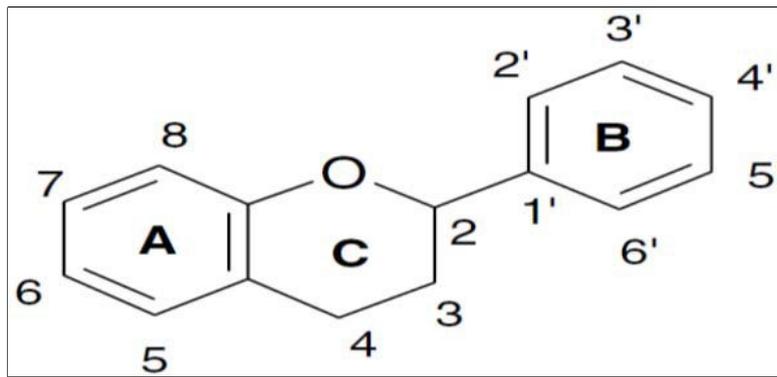
**Tableau 4.** Principaux types de coumarines (Richter, 1993; Hopkins, 2003).

Structure de base	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Coumarines
	H	OH	Ombelliférone
	OH	OH	Aesculétine
	OCH <sub>3</sub>	OH	Scopolétine ou Scopolétole

## F. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du latin *flavus* ou jaune, ce sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration jaune, orange ou rouge des fleurs et des fruits (Goodwin et Mercer, 1990; Hollman *et al*, 1996; Hollman et Katan, 1997; Janićijević *et al*, 2007). Les flavonoïdes sont très largement répandus dans le règne végétal (fruits, légumes, graines ou racines). La classe des flavonoïdes englobe à elle seule plusieurs milliers de molécules regroupées en une dizaine de sous-classes, dont elles peuvent exister sous forme libre ou glycosylée (Narayana *et al*, 2001; Proestos et Komaitis, 2013).

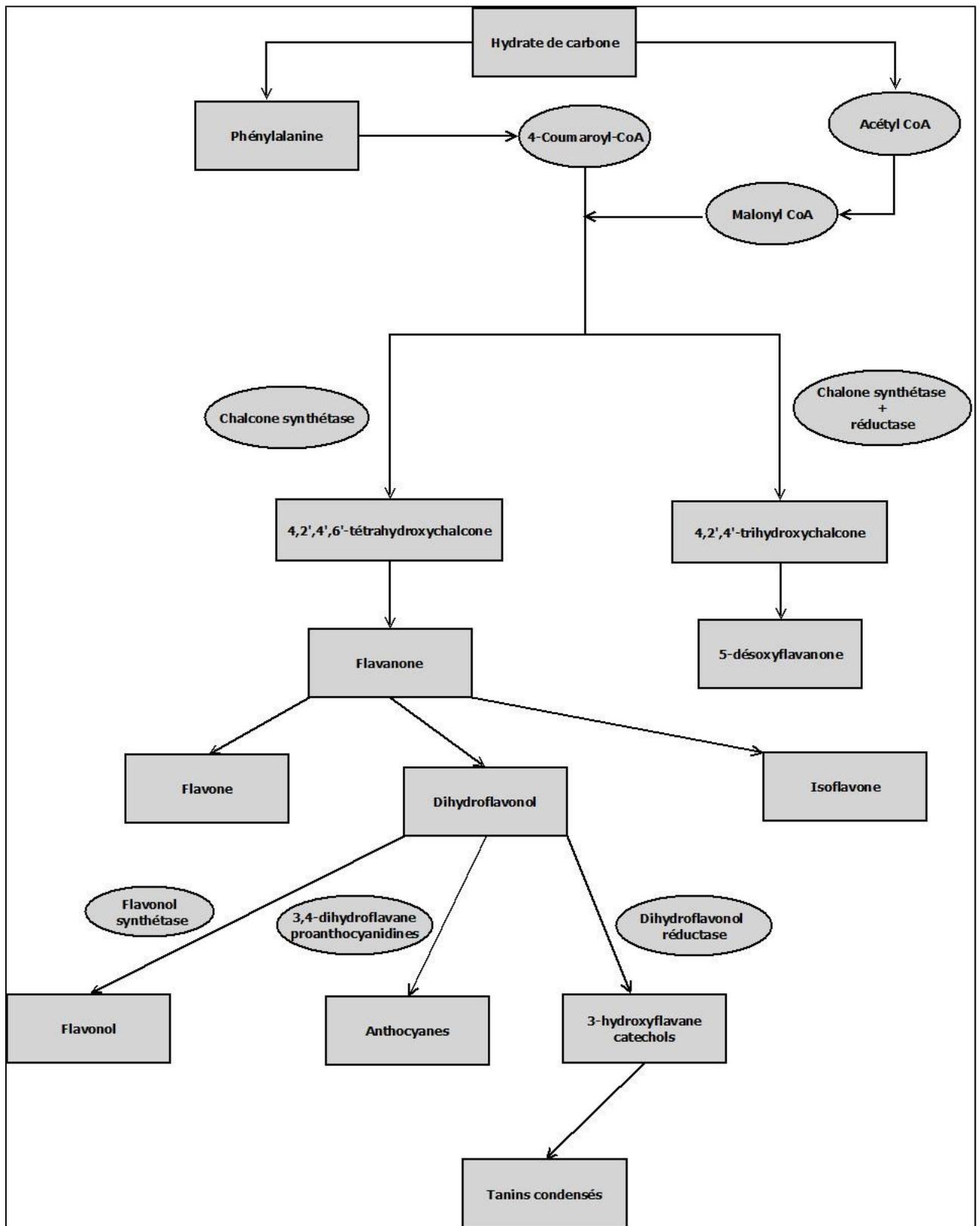
Tous les flavonoïdes présentent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux cycles benzéniques aromatiques à 6 carbones (A) et (B) reliés entre eux par un hétérocycle central appelé cycle (C) (Cowan, 1999; Middleton *et al*, 2000; Dai et Mumper, 2010). Les flavonoïdes sont solubles dans l'eau à chaud, dans les alcools et d'autres solvants apolaires (Bruneton, 1999) (**Figure 5**).



**Figure 5.** Squelette de base des flavonoïdes (Balasundram et *al*, 2006).

Dû à la complexité de leur biosynthèse, le rôle des flavonoïdes n'est pas encore clairement élucidé (Macheix et *al*, 2005). Au début de la biosynthèse, trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) forment le cycle A ; les cycles B et C proviennent du métabolisme du glucose par la voie du Shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate, puis en *p*-coumaroyl-CoA (Ribereau-Gayon, 1968; Judd et *al*, 2002). Ensuite, Le *p*-coumaroyl CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent pour former une chalcone : la 4,2',4',6'tétrahydroxychalcone (**Figure 6**) qui est métabolisée par la chalcone isomérase en flavanone : la naringénine sur laquelle agit la flavone synthase (la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase) pour former la flavone apigénine ou le dihydroflavonol: (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempférol respectivement. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase se métabolise en un flavonol: le kaempférol ou en flavan- 3,4-diol: leucoanthocyanidol respectivement. Enfin, sous l'action de la 3- Oglycosyltransférase, le pélargonidol se transforme en anthocyanoside pélargonidol-3- glucoside (Goodwin et Mercer, 1990; Hopkins, 2003; Macheix et *al*, 2005; Anderson et Markham, 2006).

# Chapitre I : Synthèse bibliographique



**Figure 6.** Grandes lignes de biosynthèse des classes de flavonoïdes. (Bruneton, 1999; Macheix et al, 2005).

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

Selon le degré d'oxydation du noyau central, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes sous-classes: (Goodwin et Mercer, 1990; Janićijević et *al*, 2007).

### **– Flavones et flavonols**

Cette sous-classe est la plus répandue, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et C-7 ; ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autre part, le cycle B est substitué par des groupes hydroxyles (-OH) ou méthoxyles (-OCH<sub>3</sub>). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement -OH en position C-3. (Anderson et Markham, 2006; Bruneton, 2009).

### **– Flavanones et dihydroflavonols**

Cette sous-classe est moins fréquente que celle des flavones et flavonols, elle se distingue des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces composés sont caractérisés également par l'absence de la double liaison en C-2 et C-3 (Slade et *al*, 2005; Bruneton, 2009).

### **– Flavan-3-ols et flavan-3,4-diols**

Cette sous-classe de flavonoïdes est toujours hydroxylée en C-3 et son groupe carbonyle en C-4 est toujours absent. Les flavan-3-ols (catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en C-2 et C-3 ; cette sous-classe peut alors exister sous forme de quatre stéréoisomères optiquement actifs: (+)- épicatechine, (-)- catéchine, (-)- épicatechine et (+)- catéchine, ces derniers n'existent pas sous forme glycosylée (Ribereau-Gayon, 1968). Les flavan-3,4-diols (leuco-anthocyanidines) sont différents des catéchines par la présence du -OH en C-4. Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine de la synthèse des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Bruneton, 1999).

### **– Anthocyanidines**

Les anthocyanidines dérivent du phényl-2 benzopyrylium (flavylium) (Ribereau-Gayon, 1968). Ce sont les aglycones des anthocyanes (glucosides) qui représentent les pigments vacuolaires rouges ou bleus de tous les végétaux (Marouf et Reynaud, 2007).

### **– Chalcones et aurones**

Le noyau pyranique central dans ce type de flavonoïde est ouvert, constitué par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée (Bruneton, 1999; Atmani et *al*, 2009).

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

### **– Isoflavones**

Ces composés sont moins répandus chez les végétaux, et dérivent des flavones. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisés par la présence d'un cycle B fixé en C-3 plutôt que la position C-2 (Wang et Murphy, 1994; Mazur et al, 1998).

### **G. Tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques polymériques très abondants chez les végétaux supérieurs, en particulier dans les écorces, bois, feuilles, racines ou fruits des plantes (Scalbert, 1991; Cowan, 1999; Raven et al, 2000). Ils sont très souvent utilisés dans le tannage des peaux d'animaux, en raison de leur capacité à se combiner et à précipiter la gélatine et d'autres protéines (Pereira et al, 2009; Cheynier et al, 2013). Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique; on les retrouve quelque fois combinés aux alcaloïdes (Cartier et Roux, 2007). Les tanins jouent un rôle de défense très important contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base d'autres propriétés (vulnérable, anti-diarrhéique...etc), elles permettent aussi la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, et favorisent également la vasoconstriction des petits vaisseaux (Paolini et al, 2003).

Selon leur structure chimique et leur origine biogénétique; on distingue les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Bruneton, 2009; Cheynier et al, 2013).

#### **– Tannins hydrolysables**

Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique en fragments simples (acides phénoliques et sucres) (Ribereau-Gayon, 1968; Macheix et al, 2005). Ils sont constitués de polyesters de sucre (généralement le glucose) et de molécules variables d'acides phénoliques (Goodwin et Mercer, 1990; Scalbert, 1991; Bruneton, 2009; Dai et Mumper, 2010).

#### **– Tannins condensés**

Appelés aussi « tanins catéchiques », ce sont des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons C-C. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse, à l'exception des traitements chimiques forts qui permettent de les dégrader (Cowan, 1999; Bruneton, 2009).

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

### **3.3.3. Intérêts thérapeutiques des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont une famille intéressante d'un point de vue économique et thérapeutique. Ils sont exploités en phytothérapie grâce à leur propriétés bénéfiques contre plusieurs maladies affectant l'organisme humain (Atmani et *al*, 2009; Khaki et *al*, 2009). Leur action pharmacologique est due à deux propriétés: d'une part, leurs capacités à se lier à certaines protéines leur permettant d'inhiber des activités enzymatiques impliquées dans certains troubles comme l'inflammation ; d'autre part, leur caractère antioxydant permettant la neutralisation des formes activées de l'oxygène et des radicaux libres toxiques (Macheix et *al*, 2005) (**Tableau 5**).

Certaines classes sont plus bénéfiques que d'autres, par exemple les flavonoïdes sont plus importants que les anthocyanes, tanins et autres coumarines (Hennebelle et *al*, 2004).

Les acides phénoliques ont la capacité d'influencer l'expression de certaines enzymes impliquées dans la production des médiateurs de l'inflammation ou des troubles digestifs, et même des affections comme le cancer du côlon (Russell et Duthie, 2011) et possèdent également des propriétés antipyrétiques (Hennebelle et *al*, 2004).

Certaines coumarines possèdent quant à elles des propriétés thérapeutiques intéressantes, notamment vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle et *al*, 2004), anti-inflammatoires, analgésiques (Kalkhambkar et *al*, 2008), anti-oedémateuses (Paume, 2009) et d'autres propriétés bénéfiques pour les affections cutanées (Iserin, 2001).

D'autre part, les tanins présentent un usage médicinal considérable grâce à leur propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antidiarrhéiques, vasculoprotectrices et cicatrisantes, (Hennebelle et *al*, 2004).

Quant aux flavonoïdes, on leur reconnaît des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques (Harborne et Williams, 2000; Taguri et *al*, 2004; Cushnie et Lamb, 2005), anti-inflammatoires (Kim et *al*, 2004), antiallergiques, antihépatotoxiques (Di Carlo et *al*, 1999), anticancéreuses (Depeint et *al*, 2002), ainsi que des propriétés antioxydantes et antidiabétiques (Djuric et *al*, 2012; Khaki et *al*, 2009; Akroum et *al*, 2009 ; Anderson et *al*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao et *al*, 2004).

Les recherches récentes sur les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes ont prouvé leurs diverses propriétés physiologiques notamment les propriétés antimicrobiennes (Middleton et *al*, 2000; Ksouri et *al*, 2007). Il a été démontré que les flavonoïdes agissent sur la synthèse des acides nucléiques, inhibant ainsi la synthèse d'ADN

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

et d'ARN des microorganismes, c'est le cas d'*Escherichia coli* dont l'ADN gyrase a pu être inhibée (Wu et *al*, 2013).

Il existe aussi certaines catéchines (flavan-3-ols) telles que la naringénine et la quercétine qui possèdent un effet antibactérien en altérant la perméabilité membranaire de la cellule bactérienne ; d'autres comme les licochalcones agissent sur le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome-C réductase de la cellule (Cushnie et *al*, 2005).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**Tableau 5.** Les sources végétales les plus riches en composés phénoliques et leurs effets thérapeutiques (Macheix et al, 2005).

Espèces végétales	Parties utilisées	Principaux composés	Activités biologiques
<i>Gingko biloba</i> L.	Feuilles	Flavonols: mono, di et triglycosides du kaempférol, de la quercétine et de l'isorhamnétine. Aglycones de flavonols et flavones.	Effet antioxydant Action neuroprotectrice Action positive sur la circulation cérébrale
Soja <i>Glycine max</i> L.	Jeunes pousses	Phytoestrogènes du groupe des isoflavonoïdes (génistéine, daidzéine et glycitéine et leurs dérivés glycosylés et acylés)	Action anticancéreuse Troubles de la ménopause Diminution du cholestérol sanguin Protection contre les accidents cardiovasculaires
Lin <i>Linum sp.</i>	Graines	Phytoestrogènes du groupe des lignanes	Action anticancéreuse Prévention des accidents coronariens
Houblon <i>Humulus lupulus</i> L.	Cônes floraux	Phytoestrogène : 8-prénylnaringénine Proanthocyanidines (dérivés de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'épigallocatechine)	Action oestrogénique Effet antioxydant
Pin maritime <i>Pinus maritima</i> L.	Ecorce	Proanthocyanidines à base de catéchine et d'épicatéchine Acides benzoïques et hydroxycinnamiques libres et glycosylés	Effet antioxydant Anti-inflammatoire Inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines
Raisin <i>Vitis vinifera</i> L.	Pépins et vin	Catéchine, épicatéchine Proanthocyanidines oligomères Tannins condensés	Effet antioxydant Protection contre les affections cardiovasculaires
Trèfle des prés <i>Trifolium pratense</i> L.	Jeunes pousses	Isoflavones (formononétine, biochanine A)	Action phytoestrogénique voisine de celle du soja
Luzerne <i>Medicago sativa</i> L.	Feuilles	Coumestrol	Propriétés oestrogéniques
Agrumes <i>Citrus sp.</i>	Fruits	O- et C-glycosides de flavones et flavonones (naringine, diosmine, hespéridine). Flavones polyméthoxylés	Action anti-inflammatoire Action anticancéreuse Augmentation du tonus Veineux

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

## **4. Propriétés thérapeutiques des plantes médicinales**

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis des siècles et le sont jusqu'à nos jours pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine et animale, cela grâce aux principes actifs retrouvés dans les feuilles, racines ou tiges et qui sont destinés à traiter les divers troubles de santé tels que les troubles digestifs, inflammatoires, antalgiques...etc.

Toutefois, l'absorption d'une substance par l'organisme risque de perturber le métabolisme de ce dernier, pouvant provoquer des troubles physiologiques conduisant parfois à la mort des individus exposés (Viala et Botta, 2007).

Pour qu'une substance végétale puisse être utilisée sans danger comme médicament, il est d'abord nécessaire que son activité se manifeste à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable (Rosidah et al, 2009). Les tests de toxicité d'une plante donnée permettent de déterminer la dose maximale pouvant être administrée sans produire d'effets toxiques (Ogbonnia et al, 2008) afin de soulever les précautions nécessaires au sujet de la toxicité et des effets indésirables voire néfastes de ces remèdes (Saad et al, 2006). Ces tests de toxicité sont réalisés sur des animaux de laboratoire avec différents extraits de plante (Kola et Landis, 2004).

### **4.1. Propriétés anti-inflammatoires**

Le phénomène de l'inflammation est défini comme un processus physiopathologique caractérisé par la présence de rougeurs, fièvre, œdèmes...etc générés par la libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine et les prostaglandines (Hunskar et Hole, 1987; Kim et al, 2004). Les causes de l'inflammation sont multiples : infectieuses (microbiennes, virales ou parasitaires), traumatiques ou chimiques (toxines, acides, venins) (Gbenou et al, 2011 ; Silbemagi et al, 2000).

Le traitement de l'inflammation fait appel à des médicaments anti-inflammatoires qui diminuent ou suppriment l'inflammation ; on distingue : les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS) (Li et al, 2003; Dugowson et Gnanashanmugam, 2006). Cependant, à long terme, ces médicaments peuvent engendrer des effets néfastes comme l'insuffisance rénale, l'ulcère gastro-intestinal...etc (Perini et al, 2004).

Aujourd'hui, il est indéniable que les substances anti-inflammatoires d'origine végétale présentent un intérêt grandissant, car elles offrent de nombreux avantages dont le plus important est l'absence des effets secondaires (Calixto et al, 2000; Raquibul et al, 2009). Les plantes médicinales constituent une importante composante de la médecine traditionnelle largement utilisées depuis des milliers d'années à travers le monde et plusieurs plantes sont

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

utilisées seules ou en association avec d'autres plantes pour le traitement des maladies inflammatoires. Les plantes à effets anti-inflammatoires regroupent des espèces de diverses familles, dont les principes actifs présumés responsables de l'activité anti-inflammatoire sont de nature chimique variée (**Tableau 6**).

**Tableau 6.** Quelques plantes médicinales à effets anti-inflammatoires (Barnes, 1998).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Arthroses, migraines, douleurs rhumatismales
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Juglans regia L</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Douleurs rhumatismales, fièvres, eczéma, Paludisme
<i>Laurocerasus officinalis R</i>	Rosaceae	Feuilles	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Graines	Douleurs rhumatismales
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	Tubercule	Arthroses, lombalgies, maux de tête, fièvres

### 4.2. Propriétés antalgiques

Selon l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur (International Association for the Study of Pain, IASP), la douleur est définie comme « une expérience sensorielle et émotive désagréable liée aux dommages de tissus» (Prabhu et al, 2011; Drabu et al, 2012). Cette sensation désagréable ou douleur nociceptive se déclenche par la stimulation des terminaisons nerveuses, causée par un agent agresseur (brûlure, piqûre...etc). La douleur nociceptive peut être superficielle (cutanée, somatique) ou profonde (viscérale) mettant en cause le système nerveux.

Le traitement des douleurs fait appel à deux types de médicaments analgésiques : les analgésiques morphiniques dont le plus connu est la morphine qui traite les douleurs viscérales et les douleurs aiguës et intenses et les analgésiques non morphiniques à l'action beaucoup moins forte comme l'aspirine utilisés pour le traitement de douleurs moins intenses comme les céphalées ou les rages de dents (Touitou, 1993).

Cependant, la découverte de nouveaux antalgiques naturels est devenue une priorité pour de nombreuses firmes pharmaceutiques (Meher et al, 2011), et la médecine traditionnelle

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

offre justement de nouvelles perspectives d'exploitation de plantes médicinales comme agents antalgiques, présentant moins d'effets secondaires que ceux causés par les antalgiques conventionnels (Tableau 7).

Tableau 7. Quelques plantes médicinales à effets antalgiques.

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Utilisation
<i>Zingiber officinalis</i> L	Zingiberaceae	Rhizome	Douleurs musculaires, douleurs dentaires (Lavergne, 1989)
<i>Papaver sumniferum</i> L	Papaveraceae	Graines	Effet narcotique (Boiteau, 1986)
<i>Lavandula officinalis</i>	Lamiaceae	Fleur et feuille	Rhumatisme (Nandhini et al, 2018)
<i>N. nucifera</i>	Nelumbonaceae	Fleur	Mal de tête dû au cycle menstruel de la femme (Nandhini et al, 2018)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabacées	Rhizome	Rhumatisme, arthrite et surrénale (Nandhini et al, 2018)
<i>Matricaria Recutita</i>	Astéracées	Fleur	Mal de crâne, migraine, arthrose et période menstruelle (Nandhini et al, 2018)

### 4.3. Propriétés anti-microbiennes

La découverte des antibiotiques a été l'un des plus grands succès de la médecine moderne, cela dit, l'émergence de la multi-résistance bactérienne chez les populations humaines est animales devient de plus en plus problématique en santé publique et vétérinaire (Lozniewski et Rabaud, 2010). La progression de la multi-résistance et le manque de réelles perspectives de découverte de nouvelles molécules antibiotiques dans les années à venir nous conduit à explorer les vertus anti-microbiennes des plantes médicinales afin d'en isoler les principes actifs (Tableau 8).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**Tableau 8.** Quelques plantes médicinales à effets antimicrobiens (Ahmad et al, 1998).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Souche bactérienne
<i>Wrightia tinctoria</i>	Apocynaceae	Ecorce	<i>E.coli</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sida cordifolia L</i>	Malvaceae	L'écorce des racines	<i>B.subtilis</i> , <i>S.typhimurium</i>
<i>Aloe barbadensis</i>	Liliaceae	Plante entière	<i>E.coli</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>S.typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Piper betle L</i>	<i>Piperaceae</i>	Feuilles	<i>S.typhimurium</i>
<i>Withania somnifera</i> Dunal	<i>Solanacea</i>	Racines	<i>S.typhimurium</i> , <i>E.coli</i>
<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Graines	<i>E.coli</i> , <i>B.subtilis</i>

### 4.4. Propriétés anti-parasitaires

Les maladies parasitaires constituent un problème majeur de santé publique affectant des centaines de millions de personnes en raison de la disponibilité limitée et les coûts élevés des médicaments. Habituellement, un parasite ne tue pas son hôte, cependant il affaiblit son système immunitaire. C'est le cas par exemple de la leishmaniose qui est une maladie parasitaire affectant plus de 12 millions de personnes dans le monde. En Algérie, la leishmaniose se présente sous deux formes: la forme cutanée et la forme viscérale, actuellement la leishmaniose cutanée (LC) constitue un sérieux problème de santé publique en Algérie qui place ce pays en deuxième position après l'Afghanistan en termes d'incidence de la maladie (Alvar et al, 2012 ; WHO, 2010).

*Leishmania* est un parasite intracellulaire obligatoire de nombreux mammifères dont l'homme, il est transmis par la piqûre d'un insecte vecteur « phlébotome » et se multiplie dans les cellules mononuclées phagocytaires des espèces mammifères. Le parasite *Leishmania* possède deux stades évolutifs au cours de son cycle :

- La forme amastigote : la forme intracellulaire du parasite où il réside dans les cellules réticulo-endothéliales de l'hôte vertèbre.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

- La forme promastigote: la forme extracellulaire où le parasite se multiplie dans le tube digestif du phlébotome (Bates, 2007).

En l'absence d'une vaccination contre la leishmaniose (ou les parasitoses en général) et les multiples effets secondaires des médicaments chimiques tels que les dérivés antimoinés, les plantes médicinales s'avèrent être une source très intéressante de métabolites secondaires contre cette maladie. Le **Tableau 9** résume les principaux résultats décrits dans la bibliographie concernant l'activité leishmanicide de certaines plantes médicinales. Les tests leishmanicides préliminaires consistent en le criblage des extraits végétaux sur les formes promastigotes et amastigotes du parasite ainsi que des tests plus poussés sur le mécanisme d'action de ces extraits sur les formes intra-macrophagiques (Chan et Peña, 2001).

**Tableau 9.** Quelques plantes médicinales à effet leishmanicide (Brito et al, 2013).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Souche leishmanienne
<i>Adenia lobata</i>	Passifloraceae	Feuille	<i>L. donovani</i>
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Chenopodiaceae	Feuille	<i>L. amazonensis</i>
<i>Premna serratifolia</i>	Laminaceae	Ecorce	<i>L. donovani</i>
<i>Cajanus cajan</i>	Fabaceae	Feuille/graine	<i>L. amazonensis/ L. chagasi</i>
<i>Uvaria afzelii</i>	Annonaceae	Feuille/tige	<i>L. donovani</i>
<i>Ocimum gratissimum</i>	Labiatae	Feuille/fleur	<i>L. amazonensis/ L. chagasi</i>
<i>Callitris neocaledonica</i>	Cupressaceae	Bois	<i>L. donovani</i>
<i>Wollastonia biflora</i>	Asteraceae	Feuille	<i>L. donovani</i>

### 5. Culture *in vitro* des plantes

#### 5.1. Historique de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* est une méthode assez récente développée au début du siècle (Jay-Allemand et Capelli, 1992), énoncée par Haberlandt en 1902 et démontrée par Steward en 1958 lorsqu'il a obtenu les premiers embryons artificiels appelés « embryons somatiques » à partir des cellules de carottes (Auge et al, 1989; Boxus et al, 1995 ; Tourte et Tourte, 1998). En 1922, les travaux de Rablens ont réussi à provoquer une croissance au niveau des pointes de racines isolées sur milieu synthétique, mais l'année qui marque réellement le début de la culture *in vitro* des plantes est 1932 par les travaux de White aux USA sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racines de tomates. Depuis, la culture *in vitro* des plantes a

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

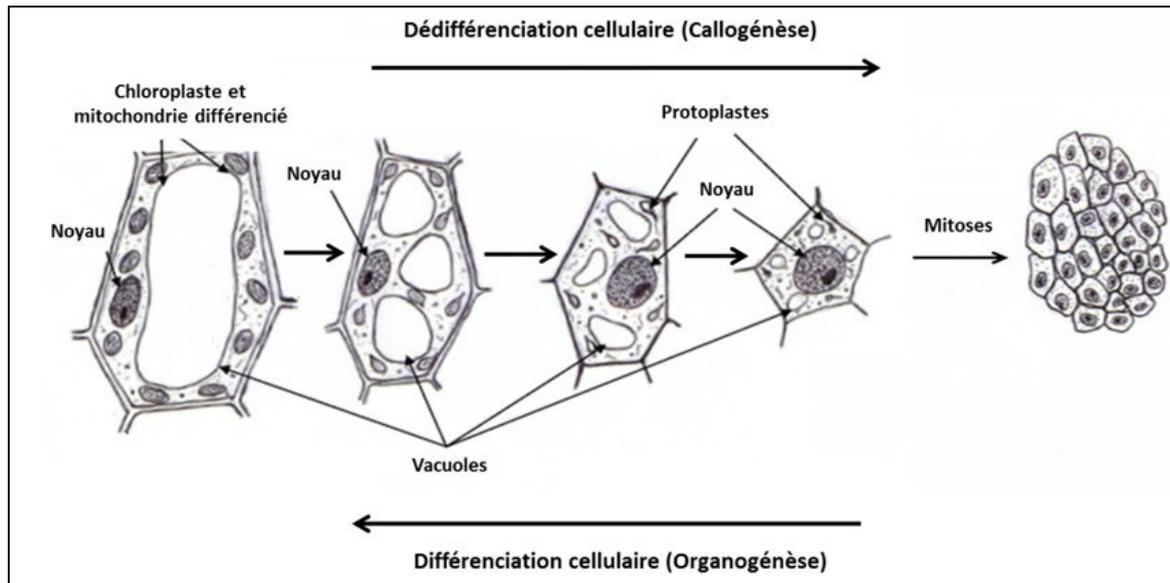
connu plusieurs étapes décisives qui ont permis de mettre au point des techniques de plus en plus performantes, particulièrement après la découverte des régulateurs de croissance végétales qui ont révolutionné cette technique (Vasilenko, 2008).

### **5.2. Principe**

La multiplication *in vitro* est la culture de cellules, tissus ou organes végétaux sur des milieux nutritifs artificiels appropriés permettant la prolifération et ainsi la conservation d'un organisme entier qu'on souhaite multiplier sous des conditions contrôlées (espace réduit, à l'abri de toute contamination) grâce à « la totipotence cellulaire » (Zrýd, 1988 ; Auge *et al*, 1989 ; Simonin, 2006 ; Marouf et Reynaud, 2007) qui est définie comme étant l'aptitude d'une cellule végétale à posséder toute l'information génétique nécessaire à régénérer une plante entière (Lüttge *et al*, 1992 ; Hopkins, 2003) ; elle se base sur le fait que toute l'information génétique est présente dans le noyau de chaque cellule vivante (Norrel, 1973). Une cellule végétale même très différenciée est souvent capable de revenir à l'état juvénile en se dédifférenciant sous l'effet d'un stress environnemental (Demarly et Sibi, 1996), elle peut ensuite se diviser pour donner tel ou tel tissu selon les conditions de culture (Djennane et Klifatti, 1996).

Les cellules végétales dans un milieu de culture se divisent et prolifèrent en produisant une masse de cellules relativement indifférenciées appelées « cal » : c'est le phénomène de la callogénèse (Margara, 1984 ; Alberts *et al*, 1989) qui débute par le processus de dédifférenciation où les cellules adultes retrouvent ainsi leur état méristématique (Margara, 1984 ; Lüttge *et al*, 1992) les rendant ainsi capables de s'orienter vers la formation de n'importe quel organe (**Figure 7**). Suivant la composition du milieu de culture, les cellules dédifférenciées continueront à proliférer leur permettant de se redifférencier et de donner différents types de cellules spécialisées (Cooper, 1999). Sous l'effet des hormones de croissance contenues dans le milieu de culture, l'explant subit une dédifférenciation cellulaire et acquies un pouvoir mitotique, aboutissant à l'augmentation du volume de l'explant, puis à la formation des cals qui peuvent être utilisés à n'importe quel moment pour régénérer en grandes quantités des plantes entières et la conservation des cals pourrait se faire par repiquage (Zrýd, 1988).

Toutefois, Il est à noter que la dédifférenciation ne peut affecter que les cellules qui ne sont pas trop spécialisées (Margara, 1984). Par exemple : Une cellule chlorophyllienne maintenue à la lumière reste chlorophyllienne, mais si elle est placée à l'obscurité ses chloroplastes s'étiolent et redeviennent des protoplastes indifférenciés.

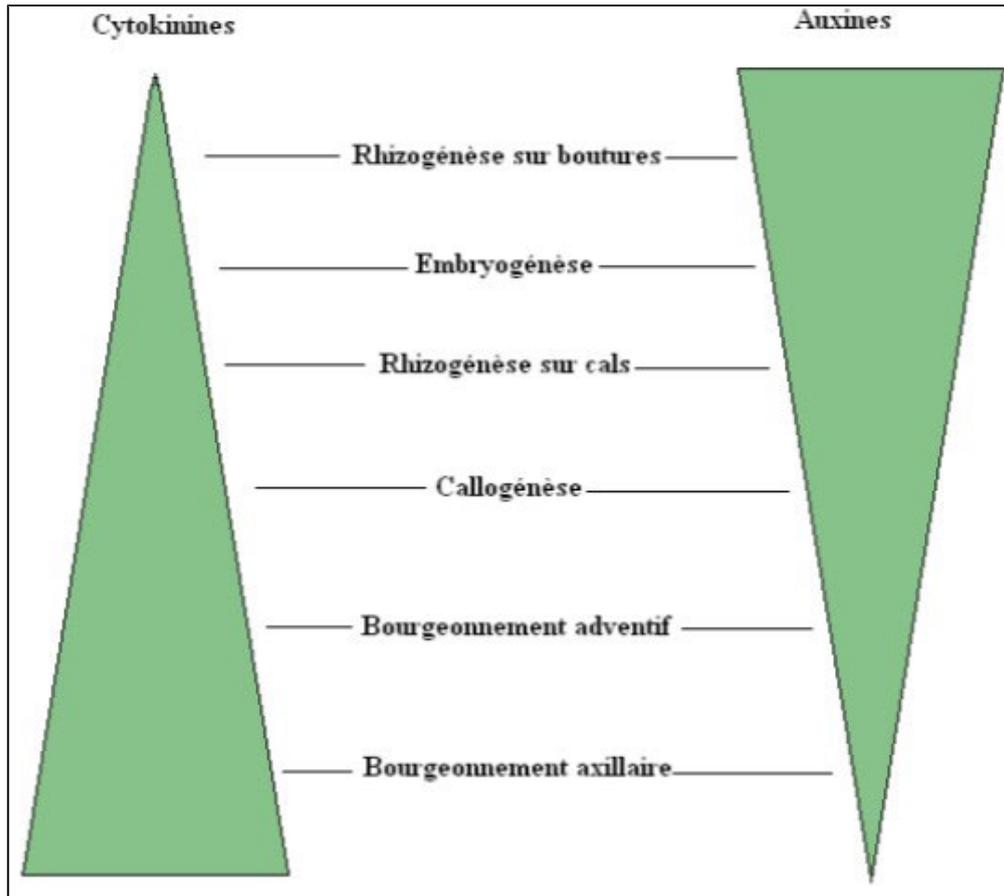


**Figure 7.** Schéma de dédifférenciation d'une cellule végétale (Halfaoui, 2010 ; modifié).

### 5.3. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance ou hormones sont des substances responsables de la modification ou la suppression du processus de cyto-différenciation et cela sous certaines conditions (Street, 1997). Ces hormones dirigent la croissance et le développement des plantes dans le milieu de culture vers un processus défini (Murray, 2011). Les deux familles d'hormones les plus souvent utilisées sont les auxines et les cytokinines. Le type de néoformation obtenu est influencé par le rapport hormone auxine/cytokinine, ainsi, la néoformation de bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinines (Abrie et Staden, 2001 ; Compton *et al*, 2001) qui permettent la séparation des chromosomes, tandis que les auxines stimulent la formation des racines (Hobbie, 1998; Abrie et Staden, 2001; Compton *et al*, 2001) et favorisent la duplication de l'ADN. Cependant, les effets de la combinaison hormonale varient selon le matériel végétal employé (**Figure 8**). Dans le même contexte, plusieurs auteurs Margara, (1984) ; Zrýd (1988) ; Auge *et al*, (1989) ; et Boxus *et al*, (1995) ont montré que :

- Si le rapport cytokinine/auxine  $>1$  ; c'est l'induction de la néoformation des bourgeons.
- Si le rapport cytokinine/auxine  $<1$  ; c'est l'induction de la rhizogénèse.
- Si le rapport cytokinine/auxine  $=1$  ; c'est l'induction de la callogénèse.



**Figure 8.** La balance hormonale selon Zrýd (1988).

### 5.3.1. Les cytokinines

Ce sont une famille de phytohormones qui régulent de nombreux phénomènes liés à la division et à la différenciation cellulaire, principalement au niveau des feuilles et des bourgeons, ils stimulent particulièrement la synthèse des protéines et participent au contrôle du cycle cellulaire, comme la kinétine qui était la première cytokinine découverte. L'effet des cytokinines est le plus perceptible dans les cultures de tissus où elles sont utilisées souvent avec des auxines, pour stimuler la division cellulaire et contrôler la morphogénèse. Ajoutés aux milieux de culture des pousses, ces composés surmontent la dominance apicale et libèrent les bourgeons latéraux de la dormance (George et *al*, 2008).

### 5.3.2. Les auxines

Le mot auxin du grecque «auxein» signifie agrandir ou grandir ; les auxines sont les premières hormones végétales découvertes, elles sont synthétisées par les apex caulinaires et racinaires de la plante, facilitant l'adaptation de la plante à son environnement. Au niveau cellulaire, les auxines contrôlent les processus de base tels que la division et l'élongation

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

cellulaire des tiges et des racines, ils sont impliqués dans la formation de méristèmes donnant naissance soit à des tissus non organisés, soit à des organes définis. Cependant, leur effet le plus marqué est le maintien de la dominance apicale (George et *al*, 2008). Parmi les auxines existantes, on peut citer l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, l'acide indole-acétique et l'acide naphthalèneacétique sont souvent employés en organogenèse ou en embryogenèse somatique (Evans et *al*, 1989).

### **5.3.3. Les gibbérellines**

Ces sont des substances chimiques dont la structure de base est l'ent-kaurène qui est la molécule précurseur de l'ent-gibbérelline. Il existe plus de 80 composés gibbérelliques naturels dont la principale action est l'induction de l'allongement des tiges et des entre-nœuds, comme l'encymimidol qui permet d'obtenir des amas d'apex. Cependant, la présence de fortes concentrations de gibbérellines dans le milieu de culture peut empêcher la formation des racines et les embryons somatiques (Hopkins, 2003).

### **5.4. Le milieu de culture**

Selon le type d'organe cultivé, le milieu de culture employé dans la culture de plante peut être liquide ou solidifié avec de l'agar-agar (Margara, 1984), il doit contenir de l'eau, des sels minéraux (les macroéléments et les microéléments), et des substances organiques telles que des sucres, des vitamines, des acides aminés ainsi que les régulateurs de croissance (Margara, 1984 ; Lüttge et *al*, 1992). Par ailleurs une grande importance doit être attribuée au pH du milieu qui doit être ajusté généralement entre 5 et 6 selon les milieux (Margara, 1984).

### **5.5. Facteurs de régénéralité *in vitro***

De nombreux facteurs influents sur la régénéralité *in vitro*, on peut citer d'une part la nature, la taille et l'âge ontogénique de l'explant ainsi que l'état physiologique de la plante mère et d'autre part les facteurs externes qui regroupent la composition des milieux et les conditions de culture.

#### **5.5.1. L'âge physiologique et ontogénique de l'explant**

Les cultures *in vitro* privilégient les explants les plus jeunes grâce à leur état juvénile qui offre le plus de possibilité d'une régénéralité reproductible (Davies, 1987 ; Saadi, 1991) pour la plupart des espèces végétales comme le coton (Brar et *al*, 1998), le soja (Santarem et *al*, 1997), ou encore le tournesol (Charniere et *al*, 1999).

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

### **5.5.2. La saison de prélèvement**

L'équilibre interne des régulateurs de croissance diffère selon les saisons de l'année, par conséquent on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie d'une plante conduisant à développer des réactions différentes en culture *in vitro*, particulièrement chez les plantes vivaces (Auge et al, 1989).

### **5.5.3. La taille de l'explant**

La taille de l'explant utilisé pour la culture varie selon sa nature, si le tissu est de nature organisée, un ensemble complet sera nécessaire (bourgeon entier, apex ...etc.), si le tissu est différencié (feuille, tige ou racine) une taille de l'ordre de 5-10 mm sera suffisante pour la culture (Zrýd, 1988 ; Auge et al, 1989 ; Hannweg et al, 1996).

### **5.5.4. Influence du milieu de culture**

Le milieu de culture doit assurer les besoins nutritifs de la plante soumise à la culture *in vitro*, ses principaux constituants sont généralement des macroéléments et des microéléments, une source de carbone et d'azote, vitamines et régulateurs de croissance. Le milieu Murashige et Skoog (MS) est utilisé dans 70% des cultures (Evans et al, 1989), essentiellement pour l'induction de l'organogénèse et particulièrement pour la néoformation de bourgeons (Margara, 1984), ce milieu de part sa une très forte teneur en sels minéraux, en particulier le potassium et l'azote, le rend très favorable à l'induction de l'embryogénèse somatique (Dalvesco et Guerra, 2001).

### **5.5.5. Les régulateurs de croissance**

Le rapport hormonal (auxine/cytokinine) définit grandement le type de néoformation obtenu. Dans le cas de la culture *in vitro* du parenchyme médullaire de tabac par exemple, ce rapport a conduit les tissus orientés soit vers la caulogénèse ou soit vers la rhizogénèse. Cependant, on ne peut pas dire avec certitude que l'influence de ce rapport hormonal est une règle générale pour toutes les espèces végétales, mais elle peut varier essentiellement selon la nature du matériel végétal employé.

### **5.5.6. La lumière**

La lumière est un facteur déterminant pour la prolifération et la croissance des cals. Le début de croissance nécessite généralement une faible intensité lumineuse, avec 12 à 16 heures de photopériodes (Bommineni et Jauhar, 2003).

# ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

## **5.5.7. La température**

La température d'incubation est un facteur important pour la viabilité des cultures *in vitro*, ce paramètre est variable selon les exigences des espèces cultivées, en général, la température d'incubation varie entre 22° à 25° C (Margara ,1984).

## **5.6. Les différentes applications de la culture *in vitro* des plantes**

La culture *in vitro* ou la micropropagation d'un explant ou d'un fragment d'une plante sur milieu artificiel est utilisée dans un but de multiplication en masse et permet l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère à partir d'un seul individu et qui présentent une grande uniformité indépendamment des saisons (Ferry *et al*, 1998 ; Samal, 1998). Cette technique s'avère utile pour la propagation des espèces sexuellement stériles tels que les triploïdes qui ne possèdent pas des graines comme la banane ou celles dont les semences sont rares ou présentent des difficultés de germination (Haicour, 2002). La technique de micropropagation emprunte essentiellement deux voies : La première utilise des tissus méristématiques (apex de tige, bourgeons axillaires) est appelée « microbouturage » car elle part d'un méristème préexistant dans lequel les cellules sont génétiquement très stables (Saadi, 1991) (Boxus, 1995), l'individu est généralement obtenu d'abord par la production de tige suivi de son enracinement. La deuxième voie utilise les tissus différenciés (tige, racines, feuilles, cotylédons...etc) pour aboutir à la néoformation soit de tiges (caulogénèse) ou de racines (Rhizogénèse) (**Tableau 10 ; Figure 9**).

### **5.6.1. La culture des méristèmes**

Appelée communément "cultures d'apex", elle a été mise au point par Kotte et Robbins en 1922 à partir d'un méristème radiculaire de fève et de maïs (Tourte et tourte, 1998). La multiplication du méristème, aboutit rapidement à l'obtention des nouvelles plantes génétiquement identiques et indemnes de maladies, ce qui permet la régénération d'un grand nombre d'espèces saines (Schmid et Keller, 1984 ; Samal *et al*, 1998), ainsi que l'éradication de nombreuses maladies telles que, les mycoses, et les bactérioses. (Tourte et tourte, 1998).

### **5.6.2. La culture des tissus**

#### **A. L'organogénèse**

L'organogénèse est une technique de multiplication végétative qui s'appuie sur la formation de méristèmes nouveaux pour aboutir à un nouvel individu.

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

### **– La caulogénèse**

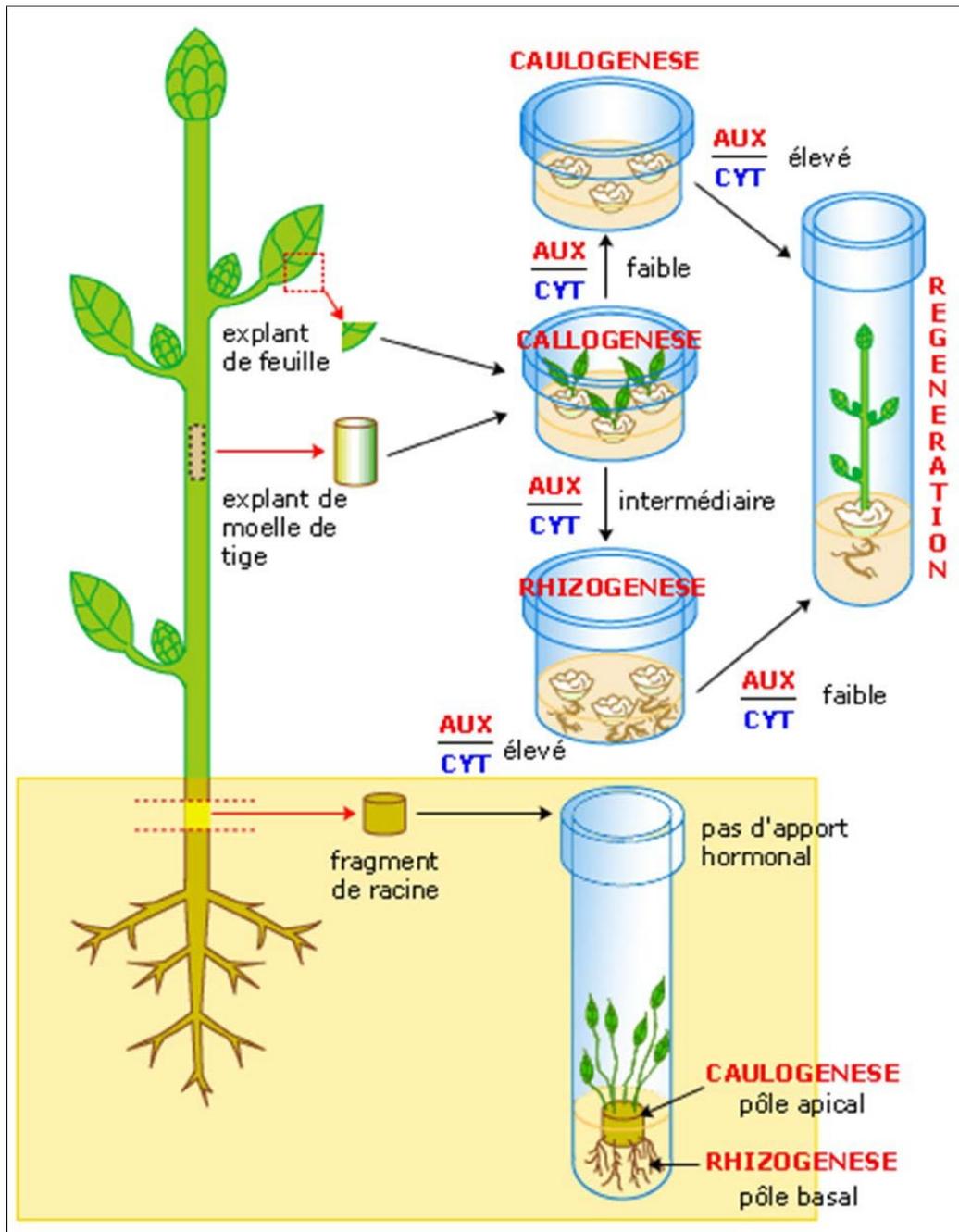
C'est la croissance de tiges néoformées *in vitro* sur un cal. Ces tiges sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Camefort, 1977 ; Zryd, 1988 ; Margara, 1984). L'induction des tiges se manifeste souvent à partir de certains types de tissus tels que: le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Fortes et Pais, 2000).

### **– La rhizogénèse**

C'est une technique qui permet la néoformation des racines, elle s'effectue en deux étapes majeures : la première est la dédifférenciation cellulaire qui permet d'obtenir un amas de cellules méristématiques; la deuxième est la différenciation et l'organisation de ces méristèmes en amas primordiaux racinaires qui se développeront ensuite en jeunes racines (Margara, 1984 ; Boxus, 1995).

**Tableau 10.** Techniques de culture *in vitro* et leur principales applications (Lachachi, 2010).

<b>Techniques de culture <i>in vitro</i></b>	<b>Applications</b>
Embryogénèse somatique	Production et transformation génétique
Culture d'apex	Etat sanitaire et rajeunissement
Micropropagation	Rajeunissement et production
Culture de cellules isolées	Modèle d'études et de recherches
Culture de nœuds et de bourgeons	Rajeunissement et microboutures
Culture de tissus, de cals	Substances pharmacologiques



**Figure 9.** Culture *in vitro* (Organogénèse) des plantes (<https://www.maxicours.com/se/cours/la-culture-in-vitro/>).

### B. L'embryogénèse

L'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit d'une structure bipolaire munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire qui suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante. L'embryogénèse somatique se montre plus séduisante en termes de performance et d'efficacité (Harkman et Arnold, 1985 ; Hamdani 2001) ; en effet, la maîtrise de la production

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

d'embryons chez certaines espèces en culture dans des suspensions cellulaires permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants. L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse) (Daikh et Demarly, 1987 ; Hamdani, 2001).

### **5.7. Intérêt de la culture *in vitro* des plantes**

La culture *in vitro* des plantes présente de nombreux avantages liés à plusieurs aspects :

- Cette biotechnologie permet la production d'un grand nombre de plantes génétiquement homogènes en un temps court et qui peuvent être obtenues tout au long de l'année indépendamment des saisons (Boxus et al, 1995).
- Elle permet l'obtention des plants indemnes d'atteintes virales à partir de plants infectés, et ceci grâce à la culture des méristèmes ou à la technique de microgreffage permettant ainsi d'éviter les pertes de productivité et la dégénérescence des plants cultivés (Auge et al, 1989 ; Evans, 1989 ; Simonin, 2006).
- Les cultures peuvent être conservées au froid, ce qui facilite ainsi la constitution de «Banque de gènes » (Margara, 1984).
- Elle joue un rôle important dans la reproduction des plantes difficilement reproductibles ou sexuellement stériles.
- Elle permet l'amélioration génétique des espèces en sélectionnant des variétés adaptées aux environnements difficiles, tolérantes aux maladies et présentant des caractères agronomiques intéressants (Dubois, 1989 ; Evans, 1989).

### **5.8. Inconvénients de la culture *in vitro* des plantes**

Malgré ces nombreux avantages, la culture *in vitro* des tissus peut toutefois présenter certains inconvénients et contraintes :

- Le coût élevé du plant *in vitro*, car il demande une main-d'œuvre spécialisée (Boxus et al, 1995).
- Les conditions optimales de culture ne sont pas toujours facilement déterminées (Semiria, 2013). Cette technique exige beaucoup de soin pour le maintien des cultures

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

en condition d'asepsie. La source de l'infection peut être aérienne ou due à une mauvaise stérilisation du milieu de culture (Auge et *al*, 1989).

- L'apparition d'anomalies génétiques ou «variation somaclonale», par exemple : perte de sexualité chez certaines espèces, l'apparition d'organes anormaux.
- Un déséquilibre hormonal peut présenter un risque de malformation ou « vitrification » en modifiant le patrimoine génétique ce qui risque d'aboutir à des variants physiologiquement et morphologiquement différents de la plante mère (Margara, 1984 ; Zrýd, 1988).

### **6. Famille des Chénopodiacées**

#### **6.1. Caractéristiques botaniques**

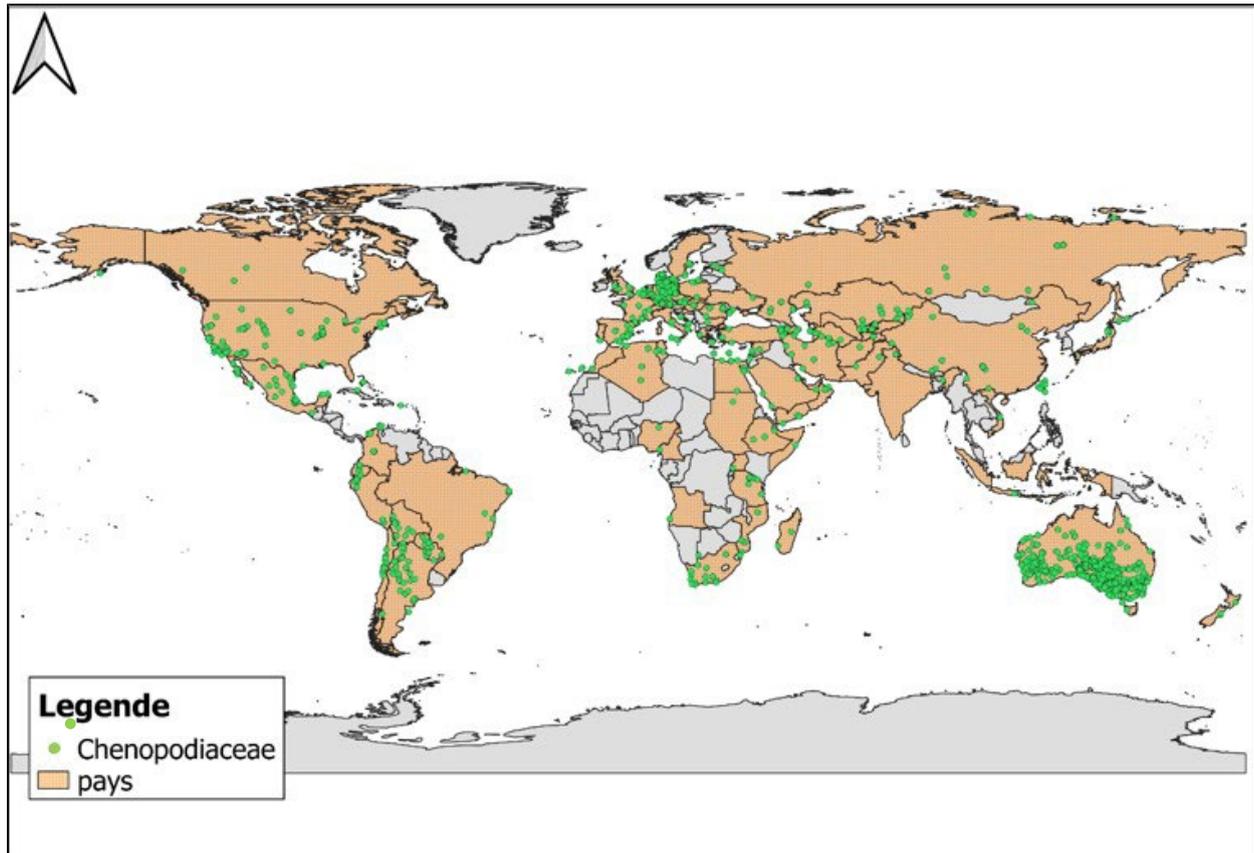
Le terme Chenopodiacées provient du grec : khèn : oie et podos : pied (Guignard et *al*, 2004). La famille des Chénopodiacées compte près de 1400 espèces distribuées sur 102 genres (Talamali et *al*, 2003). Ces espèces dites "halophiles" élèvent leur concentration osmotique à une valeur supérieure à celle du sol afin de s'adapter à la salinité de ce dernier, en conséquence, elles accumulent une grande quantité de sels (Goldhirs et *al*, 1990). La plupart de ses espèces sont xérophiles c'est-à-dire adaptées aux milieux secs et arides, et cela grâce à leur résistance particulière due à l'épaississement et à la succulence de leurs tiges et à l'état charnu de leurs feuilles (Crété, 1965).

Ses espèces sont des dicotylédones dont certaines feuilles ont la forme d'une patte d'Oie, par exemple : *Chenopodium*. La famille des Chénopodiacées comporte des plantes à fleurs sans pétales, hermaphrodites ou unisexuelles, peu visibles qui sont regroupées en inflorescences en épi (Mulas et Mulas, 2004). Les plantes de cette famille sont également caractérisées par des racines profondes et pénétrantes, destinées à absorber la plus grande quantité d'eau possible et des feuilles alternées, petites et farineuses ou recouvertes de poils, lobées parfois épineuses, formées de manière à réduire les pertes en eau dues à la transpiration ; ces feuilles sont souvent recouvertes par des trichomes et en cas de sécheresse, ces poils fonctionnent comme une réserve d'eau et quand celle-ci est épuisée, la couche de poils flétris forme un revêtement blanchâtre et farineux caractéristique des Chénopodiacées (Deysson et Mascré, 1951). Certaines espèces bisannuelles ou vivaces présentent des tiges avec des faisceaux libéro-ligneux dispersés ou groupés en plusieurs anneaux concentriques (Crété, 1965) ; cette formation permet de concentrer plus de soluté, ce qui est propre aux halophytes.

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## 6.2. Répartition géographique

La famille des Chénopodiacées présente une distribution cosmopolite (**Figure 10**), les espèces de cette famille ont une préférence marquée pour les sols salins (Crété, 1965) et vivent dans les climats arides et semi-arides (Ozenda, 1958). Cette famille est plus particulièrement répandue en Australie, en Europe, en Afrique méridionale, mais aussi dans les steppes arides de l'Asie centrale et orientale, les prairies alcalines des Etats-Unis, ainsi que dans les Pampas argentines (Mulas et Mulas, 2004).



**Figure 10.** Répartition géographique mondiale de la famille des Chénopodiacées (carte personnelle créé à partir des données de <https://www.gbif.org/fr/species/6719>).

## 6.3. Intérêt de la famille des Chénopodiacées

- **En agroalimentaire :** Les plantes de la famille des Chénopodiacées regroupe entre autre des plantes alimentaires et comestibles, les plus connues sont les légumes tels que les variétés de bettes et betteraves (*Beta vulgaris*), l'épinard (*Spinacia oleracea*) ; on connaît aussi l'arroche des jardins ou bonne dame (*Atriplex hortensis*), l'ansérine Bon-Henri ou épinard sauvage comestible (*Chenopodium bonus-henricus*) ou le quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivé en Amérique du Sud comme céréale (Multon, 1992).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

- **En phytothérapie** : Plusieurs espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle en raison de leur richesse en éléments actifs et leurs propriétés phytothérapeutiques, comme *Anabasis articulata* dont la partie aérienne s'avère efficace contre la gale des dromadaires, ou les décoctions de feuilles et rameaux de *Cornulaca monacantha* utilisés pour le traitement de certaines affections hépatiques, ou encore les décoctions de racines de *Périploca angustifolia* pour traiter l'hypertension, citons aussi *Haloxylon scoparium* (nom vernaculaire : Remt) dont la partie aérienne a un effet considérable sur les indigestions et les piqures des scorpions (Chehema et al, 2008) et enfin *Atriplex halimus* dont les racines sont utilisées comme remède contre les rages de dents, le rhume et la grippe (Daniel et Loren, 2005 ; Chehema et Djebbar, 2008).

### 6.4. Le genre *Traganum*

#### 6.4.1. Caractéristiques botaniques du genre *Traganum*

Les espèces du genre *Traganum* sont de petits arbustes à ganglions laineux. Les périanthes à fruits sont entièrement indurés et pourvus de deux dents en forme de corne dépourvus d'ailes. Les feuilles sont alternes et charnues avec une couche d'hypoderme qui sépare ce genre des autres lignées (Carolin et al, 1975 ; Akhani et al, 2007).

#### 6.4.2. Répartition géographique

Le genre *Traganum* comprend deux espèces présentes en Afrique du Nord et en Méditerranée orientale : *Traganum nudatum* Delile (*T. nudatum* Del) et *Traganum moquini*. En Algérie, ce genre est assez présent au nord du Sahara et particulièrement dans la région de la Saoura : Béchar, Ghardaïa, Ouargla, El oued et à l'extrême sud de Tébessa (Ali, 2012).

### 6.5. Présentation de la plante médicinale *T. nudatum* Delile

#### 6.5.1. Etymologie et nomenclature

- **Nom scientifique** : *Traganum nudatum* Delile (Raffeneau- Delile ,1813).

- **Nom vernaculaire** : Connue sous le nom arabe de Dhamrane "ضمران" et le nom berbère d'Ascaf (Chehema et Djebbar, 2008).

#### 6.5.2. Position systématique

Selon la systématique phylogénétique APG III (Angiosperm Phylogeny Group, 2009). *T. nudatum* Del est classé comme suit:

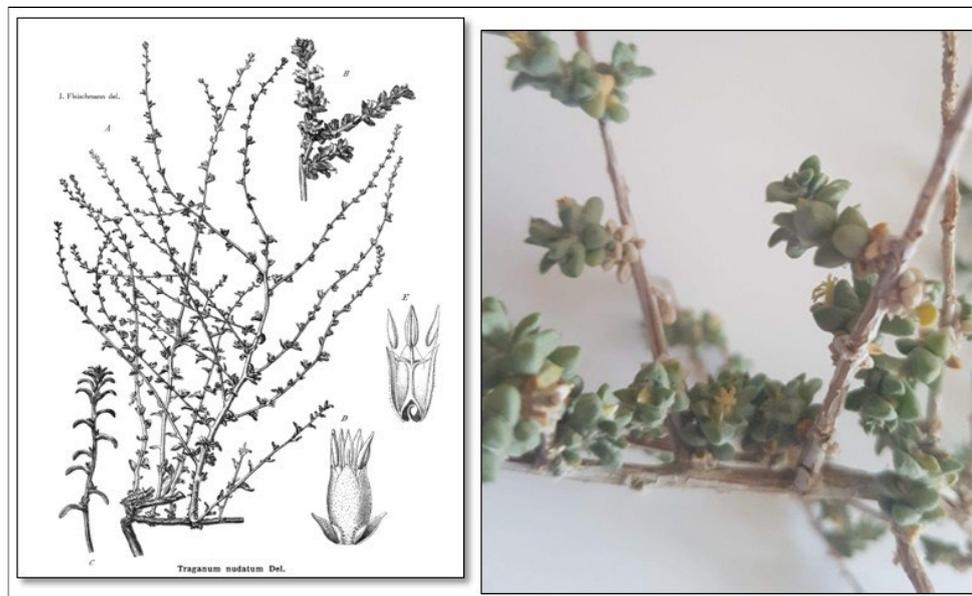
## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

Règne :	Plantae
Phylum :	Tracheophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Caryophyllales
Famille :	Amaranthaceae
Genre :	Traganum Delile
Espèce :	<i>Traganum nudatum</i> Delile

### 6.5.3. Caractéristiques de l'espèce

*T. nudatum* Delile est un feuillu vivace de la famille des Chénopodiacées, la plante adulte mesure entre 15 à 40 cm de hauteur mais peut atteindre parfois 1 m, l'espèce est pourvue de tiges dérivantes, de branches de couleur blanches, et de feuilles ovales en alternation, elle présente des chardons jaunes courbés vers le bas se terminant par une chevelure en coton qui couvrent les fleurons et les nouvelles tiges après la disparition des feuilles (**Figure 11**). La floraison de la plante se produit durant le printemps en formant de modestes fleurs qui se regroupent en deux à trois fleurs. La plante garde sa forme durant l'été avec jaunissement des feuilles (Boumlik ,1995).



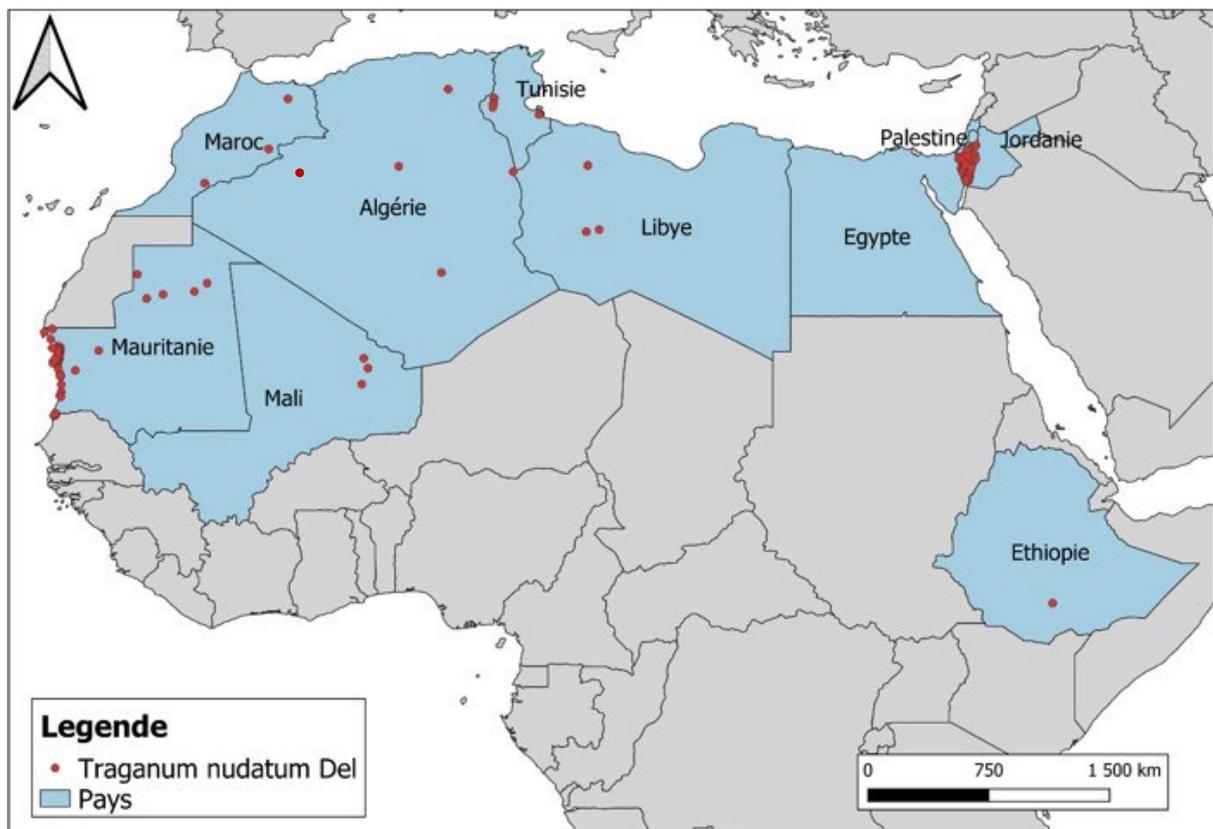
**Figure 11.** Caractéristiques morphologiques de *T. nudatum* Delile (<http://www.ethnopharmacologia.org/>). *A* : Branches en fleurs ; *B* : Partie d'une branche en fleurs ; *C* : Fin d'une branche ; *D* : Fleur avec bractées et bractéoles ; *E* : Coupe longitudinale de la fleur.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

### 6.5.4. Répartition géographique

A l'échelle mondiale, *T. nudatum* Del est présente dans plusieurs pays : l'Algérie, l'Égypte, le Koweït, la Mauritanie, la Libye, le Maroc, la Tunisie, Mali, Éthiopie et enfin en Palestine et en Jordanie (**Figure 12**) (<https://www.gbif.org/fr/species/3760351>).

En Algérie, *T. nudatum* Del est une plante désertique qui pousse dans l'erg et dans les régions sableuses, et particulièrement dans la zone qui sépare l'erg de La Hamada (Boumlik, 1995). La plante recouvre de grandes surfaces des wilayas d'Ouargla, El-Oued, Ghardaïa et Tébessa au nord centre du Sahara (Zerrouki, 1996).



**Figure 12.** Distribution géographique mondiale de *T. nudatum* Del (carte personnelle créée à partir des données de <https://www.gbif.org/fr/species/3760351>).

### 6.5.5. Usages médicaux

*T. nudatum* Del est connue par les populations locales comme plante médicinale utilisée sous forme de tisanes, poudres ou de baume ou pommade afin de traiter diverses affections et maladies (Ould el Hadj et al, 2003 ; Mohamed et al, 2018). Parmi lesquelles :

- Les plaies et les maladies cutanées.
- Les hémorroïdes.
- Les différentes formes du rhumatisme.

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

- Les maux du dos particulièrement les lombalgies.
- Les diarrhées et les exténuations.
- Les otites.

Le mélange de la plante avec le henné est utilisé pour le traitement des blessures et des tuméfactions cutanées. Enfin *T. nudatum* Del est une plante pastorale consommée par certains animaux comme les moutons, les dromadaires et les rats de sable (*Psammomys obesus*) (Zerrouki, 1996).

### **5.6.6. Travaux antérieurs sur *T. nudatum* Del**

Les travaux scientifiques antérieures ont démontré que la plante médicinale *T. nudatum* Del possédait une importante activité anti-bactérienne vis-à-vis de certaines souches bactériennes Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> à savoir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Streptococcus Sp* (Labeled et al, 2010) ; récemment une étude a montré que la plante présentait un meilleur effet antibactérien sur des souches Gram<sup>+</sup> que celles Gram<sup>-</sup>, mais sans effet antifongique notable sur *C. albicans* (Mouderas et al, 2019). Cependant, les travaux de Tefiani et al, (2020) ont montré que la combinaison de l'extrait éthyle acétate de *T. nudatum* Del avec un agent antifongique (Amphotéricine B) possède un effet remarquable contre les activités hydrolytiques de *C. albicans*.

Par ailleurs, l'évaluation du pouvoir antioxydant de la plante a démontré une bonne efficacité antioxydante ainsi qu'un bon potentiel protecteur de l'ADN des lymphocytes humains contre les dommages oxydatifs par le biais du piégeage du radical libre DPPH (Allaoui et al, 2016; Mouderas et al, 2019 ; Daradka et al, 2020). Selon Muwaffag et al, (2017) les extraits éthanoliques de cette plante possèdent aussi un grand potentiel anti- hyperglycémique pour le traitement du diabète de type 2 dépassant celui du médicament standard « Glibenclamide ® ».

Ces études ont conclu que les effets thérapeutiques de la plante sont attribués à la présence de métabolites secondaires dans la plante, ces derniers ont été identifiés par screening chimique et par Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC- PDA) : phénols totaux, tanins, flavonoides, alkaloides, saponines et quinones présents dans la partie aérienne de la plante (Gori et Tebbale, 2014 ; Mouderas et al, 2019 ; Daradka et al, 2020 ; Allaoui et al, 2016 ; Labeled et al, 2010).

Malgré ses propriétés bénéfiques et sa large utilisation dans la pharmacopée traditionnelle et particulièrement chez les populations du Sahara algérien, les études pharmacologiques menées sur *T. nudatum* Del n'ont pas été suffisantes pour cerner les

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

---

multiples aspects pharmacochimiques de la plante. En effet, aucune étude à ce jour n'a porté sur l'évaluation des effets toxicologiques, cytotoxiques, anti-inflammatoires, antalgiques et anti-parasitaires, ni la mise en culture *in vitro* de cette espèce en vue d'une éventuelle conservation ou production en masse; et donc de confirmer son utilisation et d'en trouver d'autres activités potentiellement intéressantes pour la santé humaine et/ou animale.

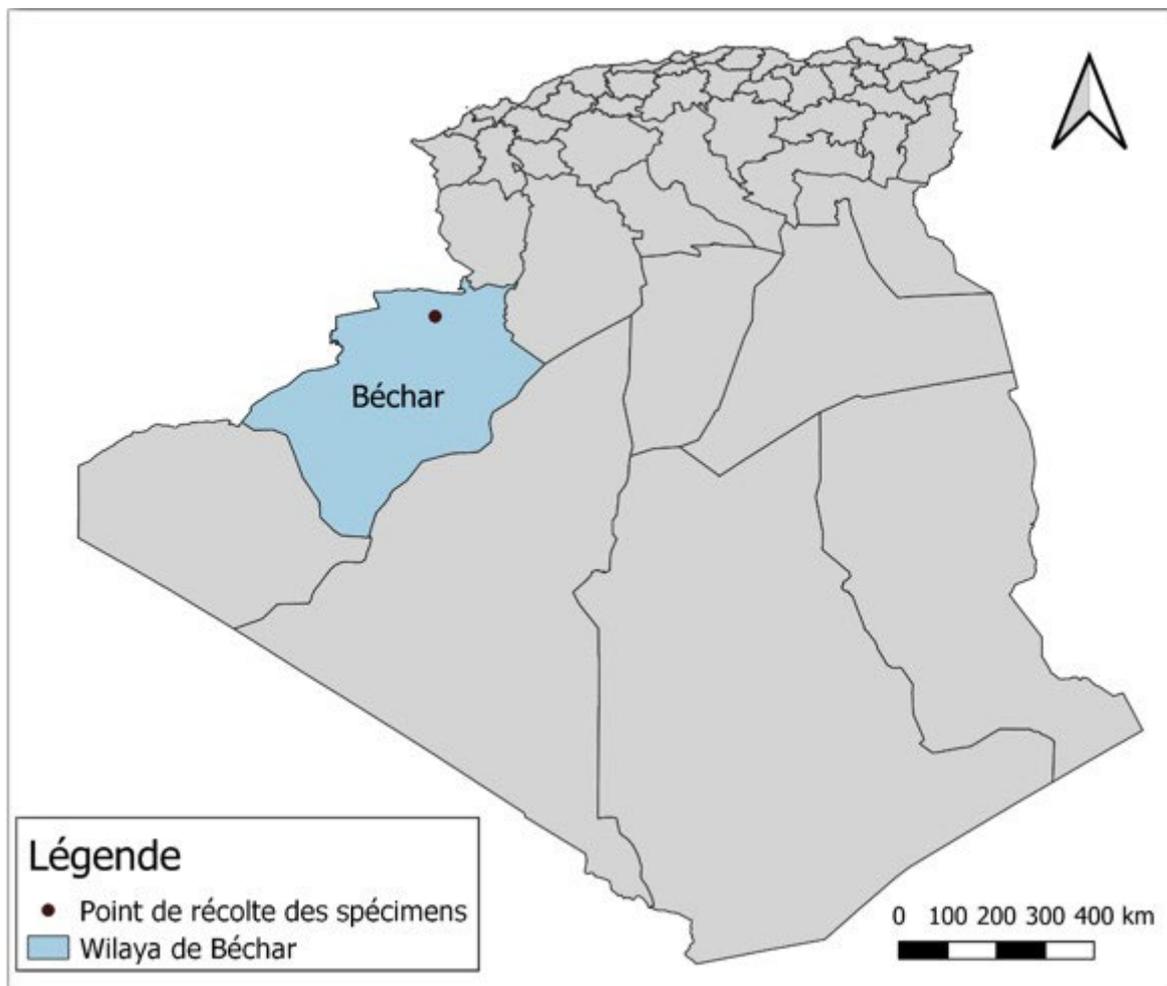
*Chapitre II*  
*Matériel et Méthodes*

## Chapitre II : Matériel et méthodes

### 1. Présentation de la région de récolte (Wilaya de Béchar)

Les spécimens récoltés proviennent de la wilaya de Béchar, celle-ci présente une situation géographique particulière avec des conditions climatiques désertiques favorables à la présence et au développement de *T. nudatum* Del.

La wilaya de Béchar est située au nord occidental du Sahara algérien, au pied du revers méridional de l'Atlas saharien ; limitée au nord par les wilayas de Naâma et d'El Bayadh, au sud par les wilayas de Tindouf et d'Adrar, à l'est par la wilaya d'Adrar et à l'ouest par le royaume du Maroc (**Figure 13**).



**Figure 13.** Station de récolte du matériel végétal *T. nudatum* Del (Carte personnelle).

La pluviométrie dans la zone d'étude est faible et irrégulière, avec des précipitations mensuelles qui ne dépassent pas les 15 mm (Benghanem, 2009) ; les données thermiques de la ville de Béchar montrent que la température annuelle moyenne varie entre 9.9°C (au mois de

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

Janvier) et 33.9°C (au mois de Juillet) avec une période sèche qui s'étale presque sur la totalité de l'année (Bagnouls et Gaussen, 1953).

### **2. Matériel expérimental**

#### **2.1. Matériel végétal**

La récolte de *T. nudatum* Del a été effectuée au mois de Mars 2017 dans la station d'Oued-Djdidia à Béchar, située à 31.63496°, -1.74545° (**Figure 14**) en sélectionnant à raison de 10 individus des plantes jeunes entières en période de floraison (**Figure 15**). Ces derniers ont été rapidement enveloppés dans du papier journal légèrement humecté afin d'éviter leur dessèchement.



**Figure 14.** Vue externe de la station de récolte Oued-Djdidia à Béchar.

L'identification de l'espèce végétale des spécimens récoltés a été validée par l'Institut National d'Agronomie (INA) à El-Harrach-Alger. Une partie du matériel végétal frais a été directement conservée au réfrigérateur à +4°C afin de l'utiliser ultérieurement dans la culture *in vitro*, tandis que le reste du matériel végétal a été séché à température ambiante, à l'ombre, et à l'abri de l'humidité, puis conservé dans des sacs en papier.

Au laboratoire, la partie aérienne de la plante séchée a été découpée puis broyée finement à l'aide d'un moulin électrique.



**Figure 15.** Le spécimen végétal *T. nudatum* Del dans la station de récolte Ain-Djdidia à Béchar.

### 2.2. Matériel Animal

Afin de réaliser les tests toxicologiques, anti-inflammatoires et antalgiques, 204 souris albinos *Mus musculus* de variété Swiss d'un poids moyen de  $20 \pm 5$ g ont été utilisées.

Les animaux (mâles et femelles) fournis par le centre d'élevage de l'Institut Pasteur d'Algérie ont été acclimatés pendant une semaine aux conditions de l'animalerie du laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie avant d'être soumis aux différentes expérimentations. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture et ont été maintenus à température constante de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sous un cycle nyctéméral 12h/12h. Toutes les manipulations *in vivo* ont été approuvées par le comité d'éthique sur l'expérimentation de l'IPA.

### 2.3. Matériel microbiologique

L'évaluation des effets bactéricides/ bactériostatiques de *T. nudatum* Del a été réalisée sur quatre souches bactériennes différentes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) ainsi que deux levures (*Candida albicans* et *Candida dubliniensis*) fournies par le Laboratoire de Microbiologie du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC) du Centre Hospitalo Universitaire Mustapha Pacha, Alger (**Tableau 11**).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

**Tableau 11.** Description et références des souches microbiennes testées.

Souches	N° ATCC	Gram	Famille	Pathologies causées
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Micrococcaceae	Gastro-entérites et Infections urinaires
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	Pseudomonadaceae	Crampes abdominales et troubles digestifs
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriaceae	Diarrhées dysentériques et Gastro-entérites
<i>Bacillus subtilis</i>	66633	+	Bacillaceae	Infections intestinales, respiratoires et nosocomiales
<i>Candida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae	Lésions cutanées
<i>Candida dubliniensis</i>	44508	/	Cryptococcaceae	Infections génitales

Pour l'évaluation de l'effet leishmanicide de *T. nudatum*, trois souches de *Leishmania* d'origine algérienne ont été utilisées, il s'agit de *L. infantum* responsable de la leishmaniose viscérale et *L. major*, *L. killicki* responsables des formes cutanées (**Tableau 12**). Ces souches sont issues de la souchothèque du Laboratoire d'Eco-Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations (Institut Pasteur d'Algérie).

**Tableau 12.** Description et références des souches parasitaires testées.

Espèce	Code OMS de la souche	Forme clinique	Origine du prélèvement	Origine géographique
<i>L. major</i>	MHOM/DZ/09/LIPA 100/09	Cutanée	Homme	M'sila (M'hir)
<i>L. killicki</i>	MHOM/DZ/11/LIPA 281/11	Cutanée	Homme	Ghardaïa
<i>L. infantum</i>	MHOM/DZ/05/LIPA15/05	Viscérale	Homme	Tizi Ouzou

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

### **3. Méthodes**

La méthodologie expérimentale globale est résumée dans l'**annexe 4**.

#### **3.1. Culture *in vitro* de *T. nudatum* Del**

La culture *in vitro* sur un milieu nutritif artificiel approprié permet la prolifération et la conservation d'une plante qu'on souhaite multiplier sous des conditions contrôlées grâce à « la totipotence cellulaire » (Zryd, 1988 ; Auge et al, 1989 ; Simonin, 2006 ; Marouf et Reynaud, 2007). Cette dernière est l'aptitude de la cellule végétale à posséder toute l'information génétique nécessaire à régénérer une plante entière (Lüttge et al, 1992 ; Hopkins, 2003).

##### **3.1.1. Préparation des explants**

L'étude a été réalisée sur du matériel frais issu de la partie aérienne de la plante *T. nudatum* Del. L'asepsie constitue une étape primordiale au succès de la culture *in vitro*, d'où l'importance de la désinfection afin de réduire au maximum le taux de contamination.

La partie aérienne est soigneusement séparée, ensuite désinfectée sous hotte à flux laminaire, selon le protocole suivant :

- Lavage à l'eau du robinet pour attendrir les fragments et éliminer les grains de sable.
- Trempage dans un bain d'eau de Javel 8° + deux gouttes de Tween 20 pendant 5-10 min.
- Rinçage avec une solution d'eau distillée stérile + l'alcool 70° (50:50) pendant 1 min.
- Trempage dans un bain antifongique de chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) à 2% pendant 5 min.
- Rinçage 3 fois dans un bain d'eau distillée stérile (10 min pour chaque bain) afin d'éliminer les restes des produits de stérilisation.

Après stérilisation, le matériel végétal est déposé sur du papier filtre absorbant préalablement stérilisé à l'autoclave pendant 1 h à 120°C à fin d'absorber les traces d'eau à la surface de l'explant.

##### **3.1.2. Mise en culture**

Le milieu de base utilisé pour l'induction de la callogenèse est le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) préparé à partir des solutions mères concentrées contenant des macroéléments, des microéléments et des vitamines de Morel (1950) additionnées de saccharose à 30 g/l et d'agar à 10 g/l (**Annexe 1**). Les différentes hormones utilisées ont été choisies pour leur aptitude à stimuler la croissance cellulaire et à favoriser une prolifération de type « cal ».

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Vu qu'aucune tentative de culture n'a été réalisée jusqu'à présent sur *T. nudatum* Del ou généralement sur le genre *Traganum*, les hormones à effet auxinique et à effet cytokinique ont été utilisées avec différentes combinaisons et concentrations issues de plusieurs protocoles basés sur la callogénèse des plantes médicinales de la même famille (Chénopodiaceae) telles que *Atriplex Halimus* et *Atriplex canescens* (Semiria, 2013 ; Mei et al, 1997 ; Ighilhariz, 2008) (**Tableau 13**). Enfin, le pH a été ajusté à 5.7 avec du NaOH (0.1N) ou du HCl (0.1N), puis stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes sous une pression de 1 Bar, le milieu a été ensuite coulé dans des boîtes de Pétri de 9 mm de diamètre.

**Tableau 13.** Les différentes combinaisons hormonales testées pour induire la callogénèse.

Milieux \ Hormones	Auxines (mg/l)		Cytokinines (mg/l)	
	ANA	2-4-D	Kinetine	BAP
M1	0.04	0.02	0.04	/
M2	0.04	/	0.04	/
M3	/	0.2	0.2	/
M4	0.2	/	/	3
M5	0.5	/	/	0.5
M6	1	/	/	1
M7	1.5	/	/	1.5
M8	/	0.5	0.5	/
M9	/	1	1	/
M10	/	1.5	1.5	/
M11	/	/	/	/

*ANA* : Acide naphthalène acétique ; *2-4-D* : Acide 2,4 dichlorophénoxy acétique ; *BAP* : 6-Benzylamino purine.

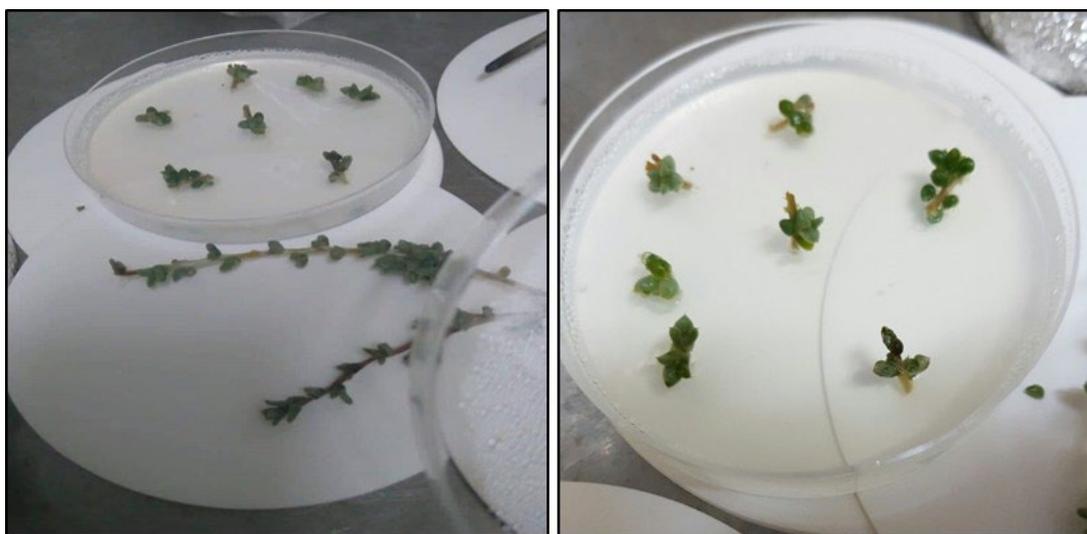
La mise en culture est réalisée sous hotte à flux laminaire sur une surface de papier filtre stérile, puis à l'aide d'un scalpel stérile, la partie aérienne (feuilles, tiges dépourvus de nœuds, bourgeons auxiliaires et fleurs) est fragmentée en petits morceaux d'environ 5 mm, ensuite à l'aide d'une pince, chaque type d'explants est repiqué en position verticale dans 03 boîtes de Pétri à raison de 5 fragments par boîte (**Figure16**).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à  $22 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 h jusqu'à apparition de réactions morphologiques notables ; une observation quotidienne est réalisée et les explants contaminés sont éliminés.

Après deux mois d'incubation, le taux de callogénèse est estimé en moyenne  $\pm$  Déviation standard des pourcentages des trois boîtes de Pétri de chaque type d'explant et pour chaque combinaison hormonale selon la formule suivante :

$$\% \text{ callogénèse} = \frac{\sum \text{nombre de cals} / 5 \text{ explants}}{3} \times 100$$



**Figure 16.** Mise en culture des fragments de *T. nudatum* Del (Tiges, feuilles, fruits et bourgeons axillaires).

### 3.2. Analyse phytochimique qualitative et quantitative des métabolites de *T. nudatum* Del

Le terme « métabolite » fait référence aux molécules de petite taille comme les acides aminés, les sucres, les hormones et les composés secondaires synthétisés par un organisme. Chez la plante, ces molécules peuvent représenter une réponse à une altération génétique, une pathologie, une exposition à une toxine ou à toute menace environnementale (Castrillo et al, 2003).

L'analyse phytochimique des métabolites de la plante menée à l'université de Lérida, Espagne au département de chimie avait pour objectif l'identification et la quantification des composés issus du métabolisme primaire et secondaire de la plante avec deux techniques :

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

- La technique de chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC) couplée à un détecteur à matrice de photodiodes (PDA) en série avec un détecteur à spectrométrie de masse (MS), afin d'identifier et quantifier les composés phénoliques, issus du métabolisme secondaire.

- La technique de chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur d'ionisation de flamme (FID) et un détecteur à spectrométrie de masse (MS), pour identifier les composés issus du métabolisme primaire et quantifier les acides gras sous forme d'esters méthyliques.

Afin d'identifier les composés détectés, un stock de 51 étalons phénoliques commerciaux a été utilisé incluant : (-) acide chlorogénique, acide gallique, rutine, quercétine, phloridzine, acide p-coumarine, acide férulique, acide caféique, catéchine; (+) ériocitrine, kaempférol, narirutin, phlorétine; + (-) acide p-salicylique, acide 3,5-dicaffeoylquinique, glucose 1,2,3,4,6-pentagalloyle, arbutine, chlorure de cyanidine-3-glucoside, daidzéine, chlorure de Delphinidine-3-O-rutinoside, acide ellagique, épicatechine, épicatechine gallate, ériodictyol, fisétine, galangine, gallocatéchine gallate, génistéine, hespéridine, hydroxytyrosol, luteoloside, myalicosine chlorure de pélargonidine-3-rutinoside, procyanidine A2, procyanidine B1, procyanidine B2, procyanidine C1, quercitrine, trangerétine, taxifoline, théaflavine, digallate de théaflavine, acide vanillique, acide vanillique, vicénine II et la vitexine. Toutes les solutions mères des standards ont été préparées dans une solution d'alcool méthylique (MeOH) et stockées à -80°C.

### **3.2.1. Analyses chromatographiques**

La chromatographie est la méthode analytique la plus largement utilisée pour la séparation, l'identification et la quantification des composés chimiques présents dans des mélanges complexes. Le principe de L'UPLC-MS introduit par Waters dans les années 2000 repose sur l'injection de l'échantillon à analyser par une phase mobile s'écoulant à haute pression (800 à 1000 bars) à travers une phase stationnaire ou colonne LC remplie de particules de taille inférieure à 4 µm (Kalili et De Villiers, 2011). L'interaction chimique de l'échantillon, la phase mobile et la phase stationnaire affecte différentes vitesses de migration à travers la colonne LC permettant la séparation des composés chimiques de l'échantillon. Ensuite, l'effluent est dirigé vers le spectromètre de masse (MS) où les composés sont ionisés positivement ou négativement selon le mode d'emploi utilisé, cette ionisation est très spécifique à la structure du composé d'intérêt avec un degré élevé de sélectivité. Les ions

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

isolés sont ensuite quantifiés avec un multiplicateur d'électrons qui convertit les ions en un signal électrique traité et traduit informatiquement en chromatogramme.

Avec le développement des sources d'électrospray ionisation (ESI), le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenu la technique la plus efficace dans l'analyse des mélanges complexes (Wolfender et *al*, 2000).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une méthode d'analyse qui permet la séparation de composés volatils de mélanges très complexes, ainsi que l'analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (Arpino et *al*, 1995). Elle s'applique sur les composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage (Stobiecki, 2000). Le même principe de chromatographie est appliqué à la GC-MS, sauf que le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte qu'est l'Hélium, appelé «gaz vecteur» qui constitue la phase mobile (**Paramètres UPLC-MS-PDA et GC-MS-FID, Annexe 3**).

### **3.2.2. Analyse des composés phénoliques par UPLC-MS-PDA**

Afin d'analyser les composés phénoliques présents dans la plante médicinale *T. nudatum* Del, une série d'extractions chimiques ont été réalisées au Laboratoire de Chimie à l'Université de Lérida, Espagne.

#### **A. Extraction des composés phénoliques libres**

Dans un bain à ultrason pendant 30 min, 250 mg de matériel végétal ont été extraits avec 5 ml d'une solution acidifiée composée d'acide acétique à 0.1% v/v, d'eau/méthanol (50:50) et d'acide ascorbique à 0.2 p/v, le résidu est ensuite extrait deux fois avec 5 ml d'une solution d'acétone/eau (70:30) additionnée d'acide ascorbique (0.2 p/v). Les solutions extraites ont été regroupées en une seule puis diluée au quart (1/4) dans une solution acidifiée d'eau ultra pure (0.1% v/v d'acide acétique) avant d'être filtrée à travers des membranes de polytétrafluoroéthylène (PTFE) à 0.20µm et enfin conservée à +6°C jusqu'à l'analyse UPLC (Delpino Rius et *al*, 2015). Enfin, le résidu de l'extraction est lyophilisé pour une utilisation ultérieure.

#### **B. Extraction des composés phénoliques liés**

Les composés phénoliques liés sont rattachés par liaison covalente à la cellulose ou par liaison ester à la pectine et polysaccharides les rendant ainsi difficilement hydrolysables, de ce fait les méthodes d'hydrolyse basique et acide sont utilisées pour libérer ces composés liés.

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

### **C. Hydrolyse basique des composés phénoliques liés**

Une quantité de 50 mg du résidu de l'extraction précédente est mélangée avec 1.5 ml d'une solution de NaOH à 2M additionnée de 10 mM d'EDTA et de 1% d'acide ascorbique, le mélange est ensuite vortexé à 45°C pendant 30 min, acidifié à pH 3 avec 0.285 ml d'une solution d'HCl à 7.2 M, puis centrifugé à 1400 x g pendant 5 minutes (Delpino Rius et *al*, 2015; Nardini et *al*, 2002).

L'extraction proprement dite est réalisée trois fois avec 4 volumes d'éthyle acétate et les surnageants sont récupérés après centrifugation à 1400 x g pendant 10 min puis regroupés en un seul flacon pour être stocké à -20°C. Juste avant l'analyse UPLC, l'échantillon est séché sous un flux de nitrogène, puis dissous dans 0.5 mL de méthanol et enfin dilué dans une solution tampon de 1.25% d'acide acétique glacial et 7% de Méthanol (Delpino Rius et *al*, 2015; Woodring et *al*, 1990).

### **D. Hydrolyse acide des pro-anthocyanes liés**

Dix (10) mg du résidu lyophilisé obtenu précédemment est incubé à 75°C pendant 60 minutes dans une solution de 5 ml de n-butanol/HCl (95:5) et de 200µl de réactif ferrique (2% de sulfate d'ammonium ferrique dans 2M HCL) (Porter, 1986), le mélange est centrifugé après refroidissement dans un bain d'eau glacée avant la lecture en spectrophotométrie à une longueur d'onde  $\lambda_{\max} = 550$  nm afin de mesurer le taux d'anthocyanidines en utilisant comme référence le chlorure de cyanidine (Delpino Rius et *al*, 2015).

### **3.2.3. Analyse des composés volatiles par GC-MS-FID**

Afin de permettre l'identification de différents métabolites par la technique de GC-MS, les composés volatils sont extraits à l'aide de solvants organiques en utilisant une méthode de dérivation combinée basée sur la méthylation d'acides carboxyliques et la silylation de groupes hydroxyles.

#### **A. Méthylation-silylation directe des composés volatiles**

Une combinaison de la méthode de dérivation basée sur la méthylation des groupes carboxyliques (-COOH) et la silylation des groupes hydroxyles (-OH) a été utilisée pour permettre l'identification de différents métabolites de la plante par la technique GC-MS. La dérivation est typiquement utilisée pour changer les propriétés des composants à analyser pour une meilleure séparation et une bonne sensibilité.

Selon le protocole du Laboratoire de Chimie de l'Université de Lleida, Espagne (Eras et *al*, 2004), environ 20 mg de poudre de matériel végétal ont été ajoutés dans un flacon

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

de réaction de 2 mL à bouchon revêtu de poly-tétrafluoroéthylène (PTFE). Du méthanol anhydre (60 µl, 1.48 mmol) et du chlorotriméthylsilane (CTMS) (250 µl, 1.96 mmol) ont été ajoutés à l'échantillon et le mélange a été vortexé pendant 2 min. Le flacon a été chauffé dans un bloc agitateur de digestion à 75°C pendant 15 min, puis de l'isooctane sec (600 µl, 3.62 mmol) a été ajouté au flacon refroidi et agité au vortex pendant 1 min. 180 µl de pyridine sèche (2.25 mmol) a été ensuite ajouté au mélange et agité au vortex pendant 2 min. Finalement, le flacon a été centrifugé à 1400 x g pendant 5 min et la phase supérieure a été récupérée et analysée immédiatement par la technique de GC-MS.

### **B. Méthylation des acides gras libres**

Afin de quantifier les acides gras libres et les acylglycérides en tant qu'esters méthyliques, une méthode de dérivation basée sur la catalyse acide a été utilisée (Jordi et al, 2004).

Environ 50 mg d'échantillon ont été ajoutés dans un flacon de réaction de 15 mL à bouchon revêtu de PTFE, puis 0.5 mL d'hexane contenant 1 mg/mL de solution étalon interne (ester méthylique de l'acide heptadécanoïque), 1 mL de méthanol et 0.5 mL de CTMS ont été ajoutés. Le flacon a été ensuite rempli d'azote et placé dans un bloc de digestion à 80° C pendant 45 min. Après refroidissement, 2 ml d'une solution d'hexane: éther diéthylique (1:1) ont été ajoutés et neutralisés en ajoutant 0.2 g de bicarbonate de sodium en poudre. Enfin, la phase supérieure a été récupérée puis séchée à travers une colonne de sulfate de magnésium anhydre et analysée par la technique de GC-FID.

### **3.3. Extractions phénoliques pour l'étude biologique de *T. nudatum* Del**

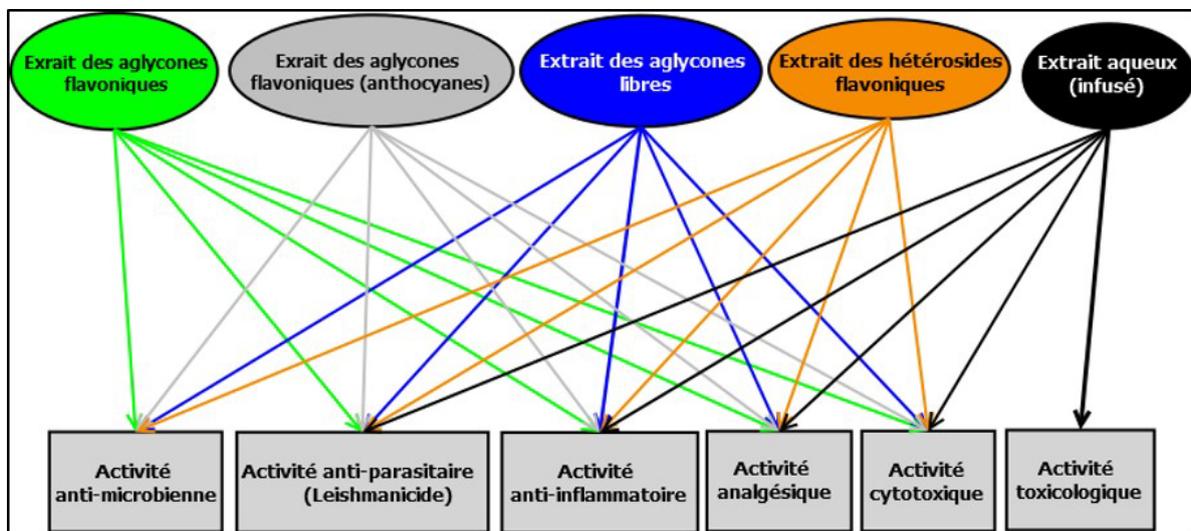
Afin d'évaluer les effets thérapeutiques de la plante, des extractions sélectives des métabolites secondaires notamment les composés phénoliques -de par leurs activités biologiques rapportées- ont été réalisées. Les différents extraits ont été testés contre certains germes (bactéries et champignons et protozoaires), ainsi que leur potentiel cytotoxique, inflammatoire et antalgique.

Les composés phénoliques se trouvent généralement dans des structures vacuolaires (Stalikas, 2007), leur solubilité dépend de leur structure chimique dans la plante ainsi que la polarité des solvants utilisés. Il n'existe cependant pas de protocole d'extraction universel approprié pour tous les composés phénoliques des plantes (Dai et Mumper, 2010), en effet, la grande diversité structurale des composés phénoliques implique une grande variabilité des propriétés physico-chimiques et par conséquent une variabilité de procédés d'extraction de ces composés en utilisant des solvants sélectifs (Stalikas, 2007; Handa et al, 2008)

## Chapitre II : Matériel et méthodes

(Vercauterenet Merillon, 1996). Par conséquent, quatre méthodes d'extraction ont été utilisées, visant à extraire les familles des composés des aglycones flavoniques, les aglycones libres et les hétérosides flavoniques.

Pour cela, 16 grammes de matériel végétal broyé ont été repartis en 4 fractions de 4 grammes pour être extraits séparément. Chaque extrait a été ensuite utilisé seul pour les différents tests biologiques (antimicrobiens, antiparasitaires, anti-inflammatoires et antalgiques). A noter que pour l'effet toxicologique, seul l'extrait aqueux (l'infusé) a été testé sur les souris. Au total 25 combinaisons de tests ont été réalisées (**Figure 17**) pour valider les différents effets thérapeutiques de la plante *T. nudatum*.



**Figure 17.** Les tests biologiques effectués avec les différents types d'extraits phénoliques de *T. nudatum* Del (Schéma personnel).

### 3.3.1. Extraction des aglycones flavoniques (Composés phénoliques liés)

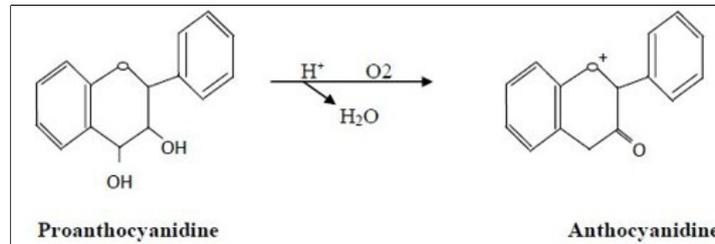
Mise au point pour la première fois par Lebreton et *al* en 1967, modifiée par Ouafi en 2007 (**Figure 18 et 19**), les principales étapes de cette extraction consistent en une hydrolyse acide à chaud, qui transforme les pro-anthocyanes en anthocyanes et libère les aglycones de flavonoïdes ainsi que leurs formes O-glucosidiques.

Une quantité de 4 g de poudre végétale a été ajoutée à 320 ml de HCl (2N) à froid, le mélange est chauffé à 40°C au bain marie pendant 40 min avec insufflation d'air toute les 10 min. Après refroidissement et filtration, la solution acide est transférée dans une ampoule à décanter en ajoutant successivement 100 ml puis 200 ml d'éther diéthylique afin de récupérer la première fraction contenant les aglycones flavoniques (flavones flavonols) et le reste subit

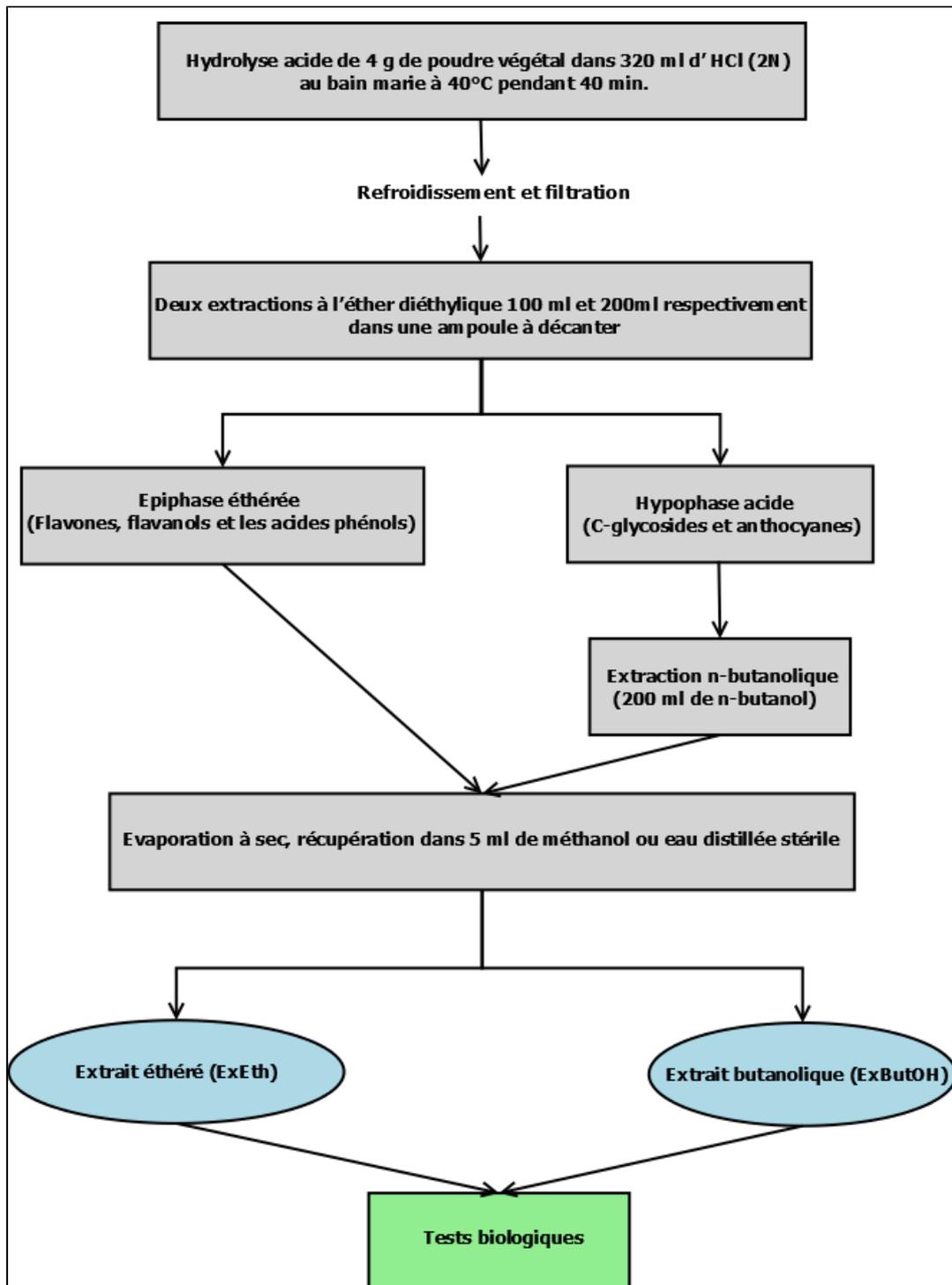
## Chapitre II : Matériel et méthodes

---

une deuxième extraction avec 200 ml de n-butanol permettant l'extraction des anthocyanes colorés en rouge et les C-glycosides. Enfin, l'extrait est évaporé à sec sous hotte ventilée et les résidus secs résultant de l'extraction par l'éther diéthylique (ExEth) et le n-butanol (ExButOH) sont récupérés chacun dans 5 ml de méthanol pur ou dans l'eau distillée stérile. Ces extraits sont conservés à +4°C.



**Figure 18.** Schéma de conversion des pro-anthocyanidines en anthocyanidines (Porter, 1986).

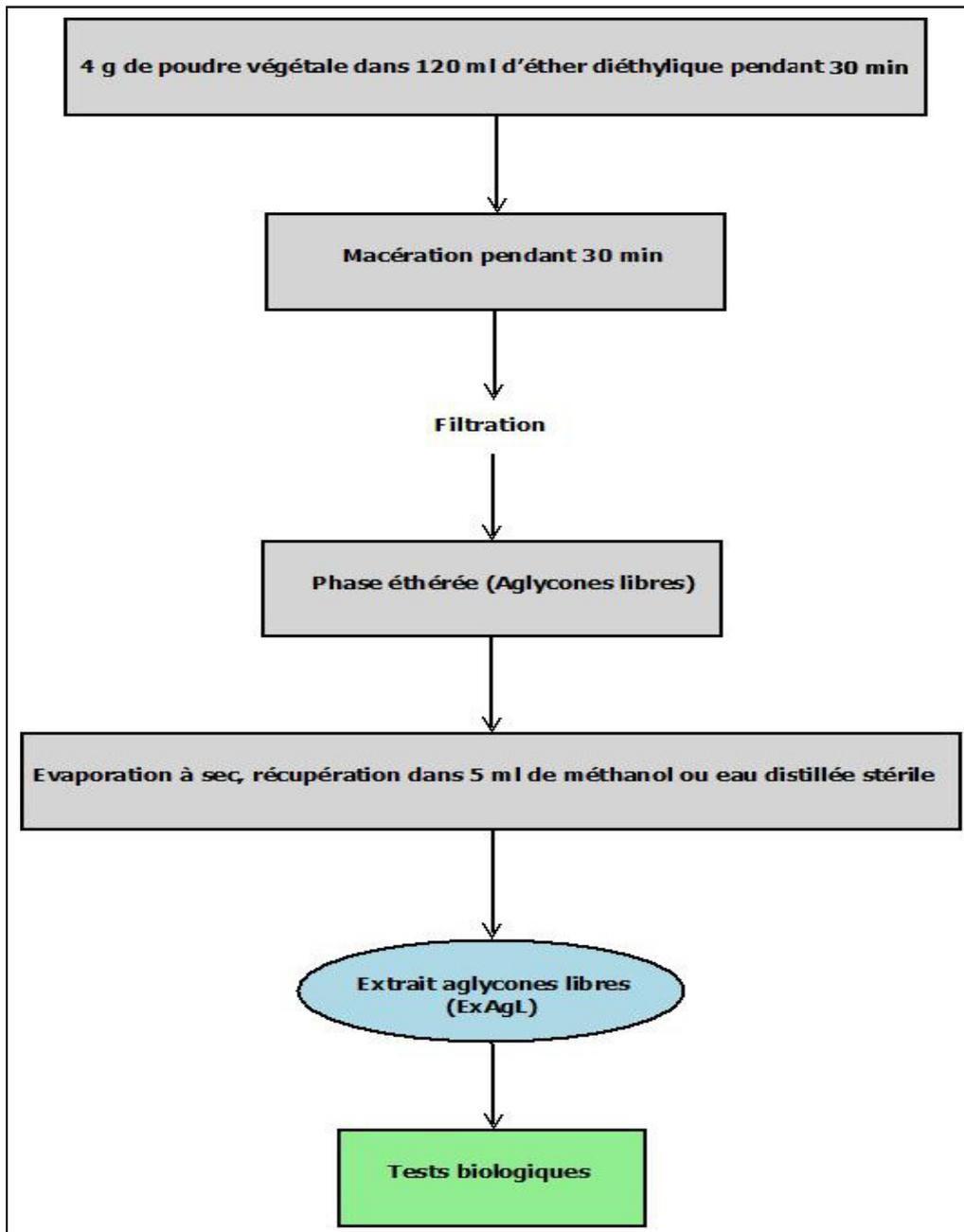


**Figure 19.** Protocole expérimental d'extraction des aglycones flavoniques de *T. nudatum* Del selon Lebreton et *al.* (1967) modifié par Ouafi (2007), modifié.

## Chapitre II : Matériel et méthodes

### 3.3.2. Extraction des aglycones libres (Composés phénoliques libres)

L'extraction des aglycones libres consiste en une macération de 4 g de poudre végétale dans 120 ml d'éther diéthylique pendant 30 min. Après filtration, la phase étherée contenant les aglycones libres est récupérée puis évaporée à sec. Le résidu sec de l'extrait contenant les aglycones libres (ExAgL) est repris avec 5 ml de méthanol ou l'eau distillée stérile, puis conservé au frais (Figure 20).



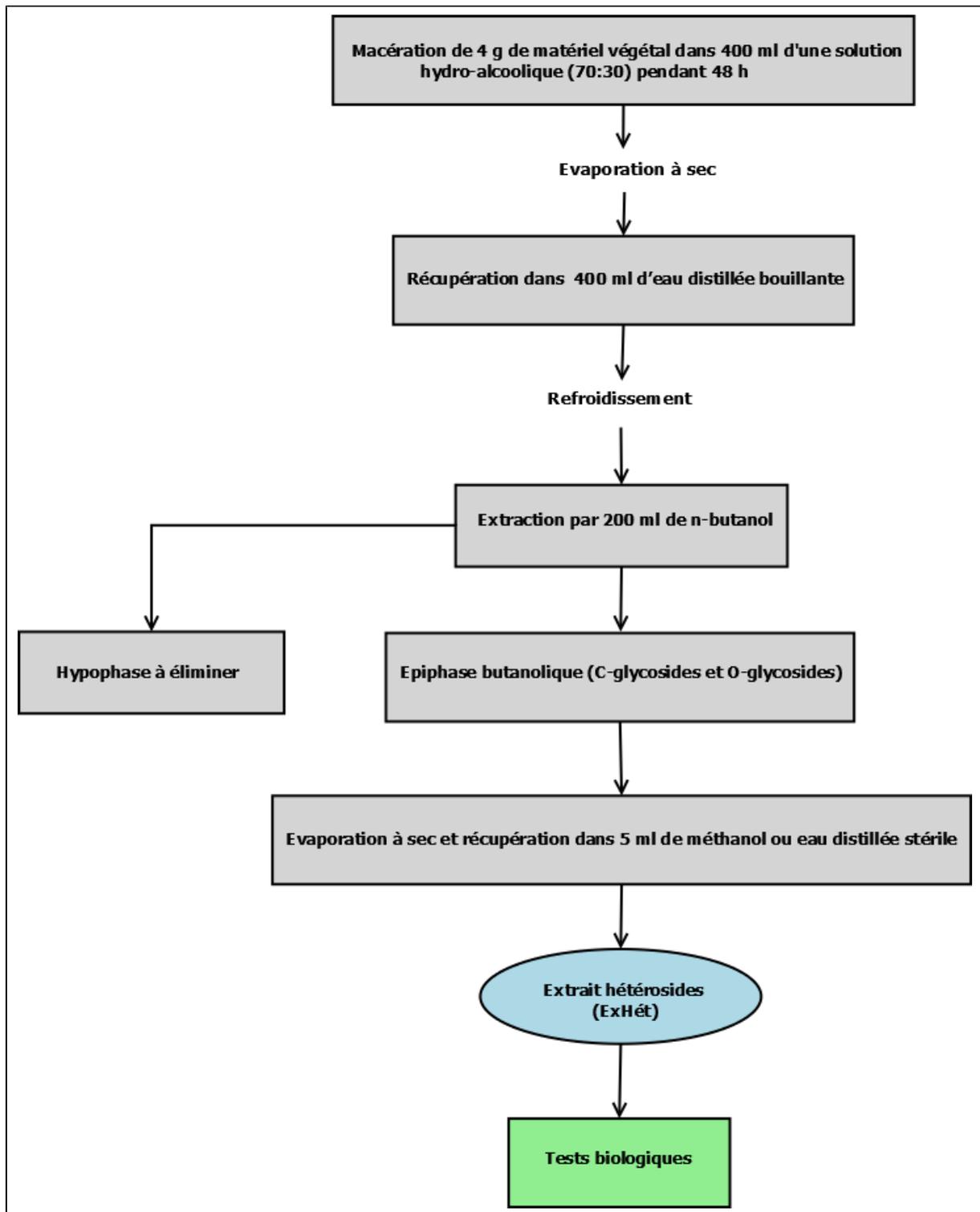
**Figure 20.** Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres de *T. nudatum* Del (Ouafi, 2007), modifié.

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

### **3.3.3. Extraction des hétérosides flavoniques (Les flavonoïdes liés)**

L'extraction des hétérosides flavoniques a été mise au point par Harborne en 1973, elle consiste en une macération à froid de 4 g de poudre dans 400 ml d'une solution hydro-alcoolique (70:30 d'éthanol/ eau) pendant 48 h suivie d'une évaporation à sec, le résidu est récupéré dans 400 ml d'eau distillée bouillante. Après refroidissement de la solution aqueuse, 200 ml de n-butanol sont rajoutés afin d'extraire les hétérosides flavoniques (O-glycosides et C-glycosides) contenus dans la poudre. Le résidu sec de l'extrait hydro-alcoolique (ExHét) contenant les hétérosides flavoniques est récupéré dans 5 ml de méthanol ou d'eau distillée stériles et conservé au frais (**Figure 21**).



**Figure 21.** Extraction des hétérosides flavoniques *T. nudatum* Del (Harborne, 1973), modifié.

### 3.3.4. Extraction de la phase aqueuse (Infusé)

L'extraction de la phase aqueuse est relativement simple, 4 g de poudre de plante ont été rajoutés à 200 ml d'eau distillée préchauffée à 100°C, le mélange est laissé infuser

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

pendant 30 minutes, puis filtré sur papier Wattman, l'extrait est récupéré puis stocké à +4°C à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation pour les tests biologiques.

### **3.4. Etude des activités biologiques de *T. nudatum* Del**

Afin d'évaluer l'efficacité des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del dans le traitement de diverses maladies, il est impératif de tester la toxicité des différents extraits afin de confirmer son innocuité sur les organismes vivants et les cellules humaines. Les extraits sont ensuite testés pour les différentes activités anti-inflammatoires, antalgiques, ainsi que l'activité antimicrobienne et leishmanicide.

#### **3.4.1. Test de toxicité aiguë de *T. nudatum* Del chez la souris**

Le but de ce test est de déterminer les doses léthales pour l'animal du laboratoire et de déterminer les symptômes de l'intoxication aiguë, ainsi que les circonstances de la mort.

La toxicité est évaluée par le calcul de la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>), c'est-à-dire la dose unique qui provoque la mort de 50% des animaux traités (Ruckebusch, 1981).

Les souris de chaque lot reçoivent la même dose de l'extrait végétale et l'observation des effets toxiques sur les animaux ainsi que le taux de mortalité, se fait tous les jours qui suivent l'administration de cet extrait.

#### **Protocol expérimental**

Le protocole expérimental utilisé est celui décrit dans la ligne directrice, code 423 (OCDE, 2001) avec de légères modifications.

Les souris ont été réparties au hasard en 8 lots de 6 souris (3 mâles et 3 femelles). Les animaux ont été maintenus à jeun 4 h avant le début de l'expérimentation ; elles ont été ensuite marquées et pesées juste avant l'administration des extraits. Un lot a été utilisé comme témoin et les autres lots ont été traités chacun une seule fois par différentes doses de l'infusé (extrait aqueux) par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage.

Les concentrations choisies sont en fonction du poids des souris et du volume de l'extrait à administrer (Djyh et al, 2010). L'infusé a été administrée avec des doses croissantes de 2000, 4000 et 6000 mg/ kg de poids corporel (p.c.) à raison de 0.5 ml pour 20 g de p.c. des souris. Le lot témoin a reçu uniquement de l'eau physiologique par la même voie.

Après l'administration de l'extrait aqueux, les souris ont été mises en observation pendant 4 h avant de leur donner à manger et à boire, avec prise de notes des signes apparents de toxicité (sommeil, coma, convulsion) ainsi que les cas de mort immédiate.

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

Pour le reste de la période d'expérimentation, les souris sont surveillées quotidiennement afin de noter les morts, une perte de poids ou des changements dans l'alimentation ou la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux ou cliniques supplémentaires de toxicité tel que: hyperactivité, ataxie, tremblements, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil ou coma.

La période d'observation s'étale sur 14 jours afin de permettre d'enregistrer d'éventuels effets tardifs y compris la mortalité totale finale (Sim et *al*, 2010). A la fin de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et les organes vitaux (cœur, foie) ont été prélevés, examinés et pesés afin de noter la présence d'éventuels hémorragies, kystes ou gonflements de ces organes.

### **3.4.2. Test de cytotoxicité *in vitro* de *T. nudatum* Del sur les monocytes humains**

Afin d'évaluer l'effet cytotoxique de *T. nudatum* Del, les différents extraits phénoliques ont été testés sur une lignée monocyttaire humaine commerciale (THP1), le protocole a été réalisé et optimisé au niveau l'unité de culture cellulaire de service d'Eco- Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

#### **Protocole expérimental**

Une souche de culture de lignée monocyttaire de type THP1 a été décongelée (**Annexe 1**) puis transférée dans un flasque de 25 cm<sup>2</sup> contenant 5ml de milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut), additionné de 10% du sérum de veau foetal (SVF). La suspension cellulaire a été mise en incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 à 5 jours et la concentration des cellules THP1 a été ensuite ajustée à 5x10<sup>5</sup> cellule/ml puis transférée vers une plaque de culture cellulaire de 96 puits à fond plat.

Afin de transformer la lignée monocyttaire THP1 en macrophages et les adhérer aux puits de la plaque, 20 ng/ml de Phorbol Mérystate Acétate (PMA) ont été ajoutés dans les puits et après 48 heures d'incubation, la suspension cellulaire de chaque puit a été jetée, ensuite 100 µl de chaque extrait aux différentes doses (200, 100, 50, 25 et 12.5 µg/ml) sont mis en contact avec les macrophages différenciés. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif. Après 48 heures d'incubation, les puits ont été lavés avec 100 µl de RPMI 1640.

Afin d'estimer le pourcentage de viabilité des cellules, une coloration au Bleu de Trypan 0.04% a été réalisée (test de l'inclusion par le Bleu de Trypan). Pour cela, 50 µl du colorant est rajouté pendant 5 min ; ensuite, les puits ont été lavés deux fois avec 100 µl de

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

RPMI 1640, puis, les microplaques ont été observées sous microscope inversé au grossissement X20 et les cellules vivantes et mortes sont comptées visuellement. (Castillo et *al*, 2007).

Pour chaque concentration d'extrait polyphénolique, quatre répliques ont été réalisés avec une répétition de la même expérience 3 fois.

La formule de viabilité est calculée comme suivant :

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{Moyennednombrecellulescontroles} - \text{Moyennednombrecellulesavecextrait}}{\text{Moyenne de nombre cellules controles}} \times 100$$

### **3.4.3. Test anti-inflammatoire de *T. nudatum* Del chez les souris**

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *T. nudatum* Del a été réalisée par la méthode de stimulus chimique induisant un œdème (réaction inflammatoire) au niveau de la patte chez les souris, l'œdème est induit en utilisant des agents chimiques, biologiques ou même alimentaires comme la carragénine (Calhoun et *al*, 1987).

#### **Protocol expérimental**

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode légèrement modifiée de Winter et *al*, 1962. Cette méthode consiste en l'injection de la carragénine dans la patte postérieure de la souris entraînant l'apparition d'un œdème, son intensité qui atteint son maximum au bout de quatre heures est évaluée par l'augmentation du volume de la patte. L'administration préventive par voie orale d'un produit anti-inflammatoire réduit de façon significative le développement de l'œdème.

Les animaux ont été répartis en 17 lots de 6 souris (3 mâles et 3 femelles) puis mis à jeun 4 h avant l'expérimentation. Tous les individus ont reçu les différents traitements par gavage à l'aide d'une sonde. Pour le lot témoin, les souris n'ont reçu qu'une solution d'eau physiologique à 0.9%, les souris du lot de référence ont été traitées quant à elles par l'acide acétylsalicylique (AAS) à une dose de 150 mg/kg de p.c. Pour les lots des essais, l'infusé a été administré à différentes doses (40, 80 et 120 mg/kg de p.c.), l'ExEth (contenant les flavones flavonols et les acides phénoliques), l'ExButOH (contenant les anthocyanes et les C- glycoside) ; l'ExAgL (contenant les aglycones libres) et l'ExHét (contenant les hétérosides flavoniques) ont été administrés quant à eux à 100, 300 et 500 mg/kg de p.c.

L'administration des extraits à tester se fait à raison de 0.5 ml/ 20 g de p.c. et 30 minutes après les traitements, l'inflammation aiguë a été induite en injectant 0.05 ml d'une solution de carragénine à 1 % (dans une solution d'eau physiologique à 0.9 %), dans le coussinet plantaire

## Chapitre II : Matériel et méthodes

de la patte postérieure droite des souris (Winter et al, 1962). L'évolution de l'œdème de la patte a été mesurée à 1h, 2h, 3h et 4h après l'injection à l'aide d'un pied à coulisse (**Figure 22**).



**Figure 22.** Injection de la carragénine (1%) et mesure de l'œdème de la patte injectée à l'aide un pied à coulisse.

L'augmentation du volume de la patte enflée des souris a été calculée, en mesurant la patte postérieure droite qui a reçu la carragénine et le volume de la patte saine (patte postérieure gauche) selon la formule suivante:

« Poids patte gauche (PPG) - poids patte droite (PPD) ».

Nous avons ensuite calculé pour chaque groupe la moyenne (M) et la déviation standard (DS). L'évolution de l'œdème (% d'œdème) est donnée par la mesure de la moyenne des deux pattes pour chaque groupe selon la formule suivante:

$$\% \text{ oedème} = \frac{M(PPD) - M(PPG)}{M(PPG)} \times 100$$

Les pourcentages d'inhibition de l'inflammation pour chaque groupe traité par les différentes doses des extraits et le médicament de référence, ont été calculés en comparant la moyenne de l'augmentation de l'inflammation avec celle du groupe témoin traité par l'eau physiologique. Les pourcentages d'inhibition de l'œdème (% inhibition) ont été calculés selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\% \text{ oedème du groupe témoin} - \% \text{ oedème du groupe traité}}{\% \text{ oedème du groupe témoin}} \times 100$$

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

### **3.4.4. Test antalgique de *T. nudatum* Del chez les souris**

Le but du test est d'évaluer l'activité antalgique de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del chez les souris en induisant une douleur à l'aide d'un stimulus chimique (test du writhing). Ce test est réalisé en injectant chez la souris par voie intra-péritonéale de l'acide acétique à 0.6% provoquant ainsi un syndrome douloureux qui se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures (crampes) qui peuvent être atténués par l'administration d'un produit antalgique. Ainsi, la réduction du nombre de crampes chez les souris traitées par les extraits phénoliques de la plante étudiée, prouve l'efficacité antalgique de cette dernière.

### **Protocole expérimental**

La méthode utilisée est celle décrite par Koster et *al*, 1959 et Collier et *al*, 1968 avec de légères modifications (Sawadogo et *al*, 2006; Das et *al*, 2013). 17 lots de 6 souris ont été utilisés (3 mâles et 3 femelles) et maintenues à jeun pendant 4h avant l'administration des produits par voie orale.

Le lot témoin négatif a reçu de l'eau physiologique (0.5 ml/ 20 g), les lots de test ont reçu les extraits à différentes doses : 40, 80 et 120 mg/kg de p.c pour l'infusé, tandis que L'ExEth, l'ExButOH, l'ExAgL et l'ExHét aux doses de 100, 300 et 500 mg/kg de p.c. Enfin le paracétamol autant que médicament de référence a été administré à 100 mg/kg de p.c.

Trente minutes après l'administration des extraits végétaux, les animaux ont reçu par voie intra-péritonéale, une solution de 0.6% (v : v) d'acide acétique dans l'eau physiologique à la dose de 10 ml/kg de p.c. Cinq minutes après l'injection, le nombre de crampes a été compté chez chaque souris durant 15 min (**Figure 23**).



**Figure 23.** Injection des souris par l'acide acétique (0.6%) et observation des crampes abdominales.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur ou pourcentage de protection pour chaque groupe traité aux différentes doses de l'extrait végétale, le paracétamol et par l'eau physiologique. Les moyennes des groupes traités par les extraits et le paracétamol ont été comparées avec celles du groupe témoin traité par l'eau physiologique. Le pourcentage de protection est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ protection} = \frac{Wt - We}{Wt} \times 100$$

Où « We » est la moyenne du nombre de crampes des souris du lot traité et « Wt » représente la moyenne du nombre de crampes des souris du lot témoin.

### 3.4.5. Activité antimicrobienne de *T. nudatum* Del

L'objectif est de déterminer la capacité des extraits polyphénoliques (ExBut, ExEth, ExHété, ExAgL) à inhiber la croissance de différentes souches microbiennes (bactéries et levures) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé décrite par Angioni et *al* (2004).

Quatre (04) espèces bactériennes: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et deux levures *Candida albicans* et *Candida dubliensis* ont été utilisées pour l'évaluation antimicrobienne des différents extraits phénoliques.

Les suspensions bactériennes et fongiques âgées de 24 h et 48 h respectivement ont été préparées à partir de 3 à 5 colonies isolées dans l'eau physiologique stérile 0.9% pour une

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

turbidité de 0.5 McFarland, puis agitées au vortex pendant quelques secondes et enfin étalées sur milieux de culture Mueller Hinton (MH) et Sabouraud (SAB) respectivement (**Annexe 1**) qui sont les milieux de culture les plus employés pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens.

Les milieux de culture ont été préparés à partir de flacons mères par ébullition à 100°C puis coulés stérilement après refroidissement à 40-50 °C dans des boîtes de Pétri, un lot est incubé à 37 °C pendant 48 h pour vérifier leur asepsie.

Selon le protocole de la technique de diffusion du National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Julia et al, 2000), des disques de bactériologie stériles de 9 mm de diamètre ont été imprégnés progressivement d'une quantité de 100 µl de chaque extrait phénolique. Parallèlement, un antibiogramme témoin a été aussi pris en considération avec comme antibiotiques de référence la Streptomycine et la Gentamycine permettant la comparaison des diamètres de zones d'inhibition obtenues avec ceux des extraits végétaux. Les cultures ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h à 25°C pour les levures. La lecture des boîtes de Pétri a été réalisée par la mesure du diamètre d'inhibition (zone d'inhibition) observé autour du disque.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits phénoliques ont été comparés avec ceux des standards. Selon Ouattara et al (2013), un diamètre de zone d'inhibition dépassant 10 mm traduit une sensibilité de la souche envers l'extrait utilisé.

La suite des tests a été appliquée sur les extraits phénoliques les plus efficaces contre les souches étudiées par l'évaluation de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide (**Figure 24**), pour cela, une série de quatre dilutions successives au ½ des extraits phénoliques a été préparée, puis, 0.5 ml de chaque dilution est ajouté à un tube contenant 0.5 ml de bouillon nutritif additionné à 0.5 ml de suspension bactérienne d'une concentration 0.5 Mc Farland. Les tubes ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24 h et la croissance bactérienne se traduit par l'apparition de troubles. La CMI correspondra à la concentration en extrait phénolique qui n'engendre pas de troubles.

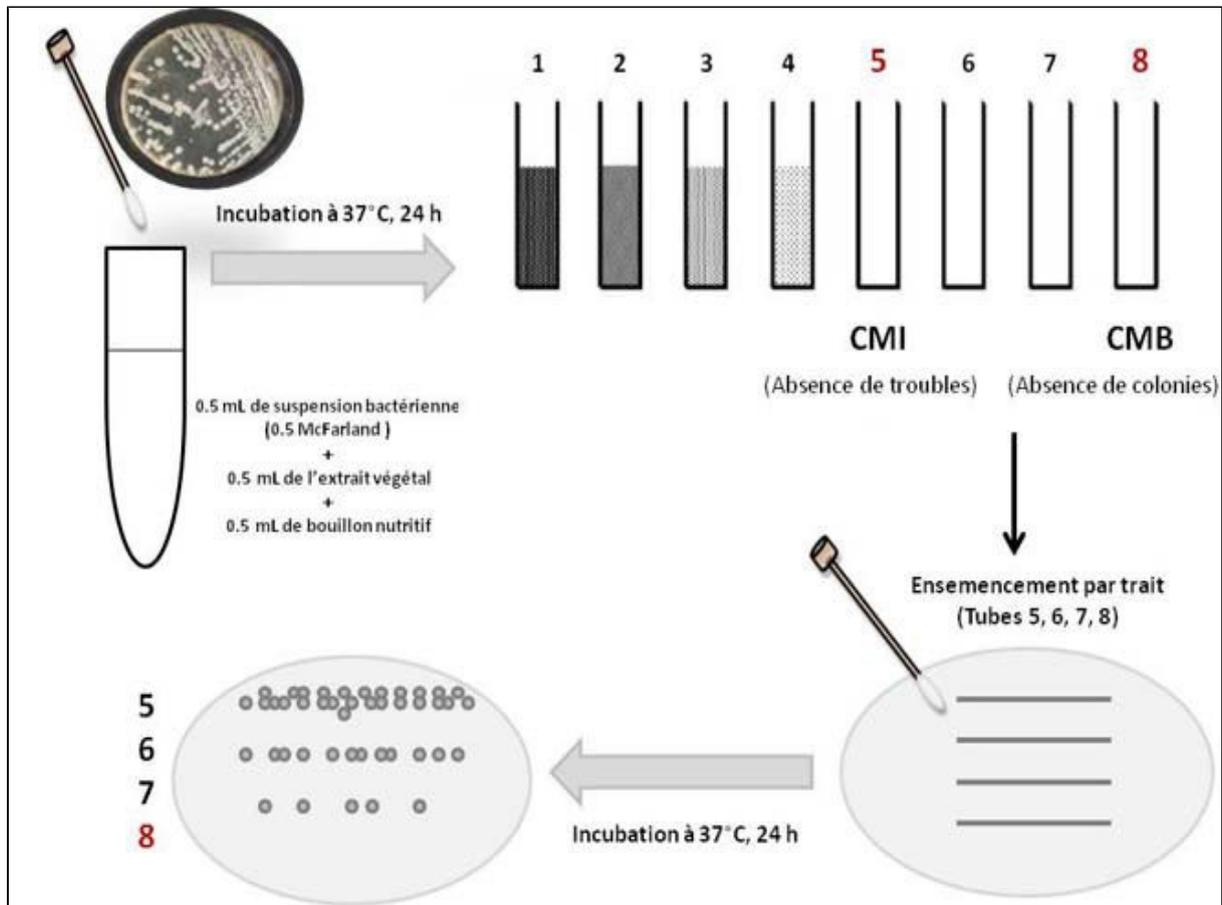
La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la concentration minimale de l'extrait phénolique engendrant 99.99% de mortalité bactérienne après incubation. Pour l'évaluer, les tubes précédents n'ayant pas engendré de troubles sont ensemencés en traits (ou spot) sur gélose MH préalablement coulée dans des boîtes de Pétri et en utilisant comme témoin une suspension bactérienne de 0.4 McFarland et incubés à 37°C pendant 24 h. La concentration correspondant à l'absence de colonies bactériennes indique l'effet bactéricide

## Chapitre II : Matériel et méthodes

ou la CMB. Enfin l'effet bactéricide ou bactériostatique est déterminé selon la formule suivante de Marmonier (1990):

$CMI/CMB < 4$ , c'est l'effet bactéricide.

$CMI/CMB > 4$ , c'est l'effet bactériostatique.



**Figure 24.** Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) et de la CMB (concentration minimale bactéricide) des extraits phénoliques de la plante (Schéma personnel).

### 3.4.6. Activité leishmanicide de *T. nudatum* Del sur la forme promastigote

La méthode utilisée repose sur l'estimation de l'inhibition des parasites en contact avec les différents extraits phénoliques de la plante en comparaison avec celle du médicament standard (Glucantime®) utilisé contre les leishmanioses.

Les souches qui ont fait l'objet de l'étude sont : *L. major*, *L. infantum* et *L. killicki* ; le protocole a été optimisé par l'unité de culture cellulaire du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations à l'Institut Pasteur d'Algérie (Warren, 1997; David et al, 1997).

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

---

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont: le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal) et le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), ce dernier supplémenté de 10% de SVF (Sérum de Vœu Fœtal) préparés au niveau du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) (**Annexe 1**).

A cause de la sensibilité de la culture des leishmanies vis-à-vis des contaminations, la préparation des dilutions, des milieux de culture, des plaques, de l'inoculum et du matériel s'opère dans des conditions aseptiques sous hotte à flux laminaire.

Après décongélation (**Annexe 1**), les souches parasitaires ont été d'abord cultivées sur le milieu de base NNN pendant 4 jours, puis repiquées sur le milieu RPMI additionné de 10% de SVF, la suspension parasitaire a été ensuite ajustée à  $2 \times 10^6$  parasite/ml.

Dans une plaque de culture cellulaire de 96 puits à fond plat, un volume de 10  $\mu$ l de chaque extrait phénolique à différentes concentrations (200, 100, 50, 25 et 12.5  $\mu$ g/ml) est mélangé avec 90  $\mu$ l de la suspension parasitaire. Le control positif utilisé est le Glugantime®- molécule de référence dans le traitement de la leishmaniose- à une concentration de 2 mg/ml, enfin, le contrôle négatif est le parasite cultivé sans aucun traitement.

Tous les tests ont été répétés 3 fois en quadruplâtes et ont été réalisés pour chaque concentration d'extrait phénolique.

Après incubation pendant 72 h à 26°C, la lecture des résultats est réalisée par comptage des parasites vivants sur une cellule de Thomas (**Annexe 2**).

Le pourcentage d'inhibition du parasite est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Nombre de parasite du groupe témoin} - \text{Nombre de parasite du groupe traité}}{\text{Nombre de parasites du groupe témoin}} \times 100$$

### **3.5. Analyse statistique des résultats**

Les résultats des tests biologiques obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard (D.S). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Graph- Prism (Version 7.00) et les données ont été analysées par ANOVA, analyse de variance à un facteur, suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de significativité. Les différences ont été considérées comme étant significatives si  $p < 0.05$  et hautement significatives si  $p < 0.01$ .

# *Chapitre III*

## *Résultats et discussion*

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

Le présent travail est une approche inédite de l'étude de la plante médicinale *Traganum nudatum* Delile qui a pour but d'évaluer son potentiel calogène, de valider son utilisation dans la médecine traditionnelle, et enfin de comparer les composés phytochimiques des cals produits avec ceux de la plante sauvage.

### **1. Etude de la culture *in vitro* des explants de *T. nudatum* Del**

L'induction de la callogénèse sur *T. nudatum* Del a été réalisée pour la première fois en utilisant différentes combinaisons de phytohormones et de macroéléments à différentes concentrations. Dans cette partie, les différents paramètres de la culture *in vitro* qui influent sur l'induction des réactions morphogénétiques de la plante provoquant ainsi la prolifération cellulaire ont été étudiés afin d'obtenir des cals.

Dans cette optique, nous avons étudié l'influence des différentes compositions hormonales d'auxines et de cytokines sur différents types d'explants dans le but d'obtenir des cals ainsi que pour mettre en évidence le type d'explant qui possède le meilleur pouvoir callogène.

#### **1.1. Effet de la nature de l'explant sur l'induction des cals**

Les explants de la partie aérienne de *T. nudatum* Del à savoir les feuilles, les tiges, les fleurs ainsi que les bourgeons axillaires ont été incubés sur le milieu de base le plus communément utilisé dans la culture *in vitro* des plantes : Murashig et Skoog (MS) additionné à différentes combinaisons hormonales composées d'auxines (ANA ; 2,4-D) et de cytokines (BAP ; Kinétine).

Les réactions morphogénétiques des explants mis en culture se sont traduites après une période d'environ deux mois d'incubation par une augmentation de la taille d'une partie ou de la totalité de la surface de l'explant avec une déchirure de l'épiderme indépendamment du milieu de culture employé et cela sous l'influence des divisions cellulaires internes ; particulièrement, les bourgeons axillaires et les feuilles au niveau du limbe et du pétiole et ceci par un gonflement à leurs bases, qui est plus ou moins présent aussi tout au long de la tige et la fleur de la plante étudiée.

L'observation à la loupe binoculaire a révélé l'apparition d'abord de petits points blancs éparpillés correspondant à une induction de cals, puis l'apparition de petits massifs couvrant partiellement et/ou complètement la surface des explants en culture (**Figure 25**).



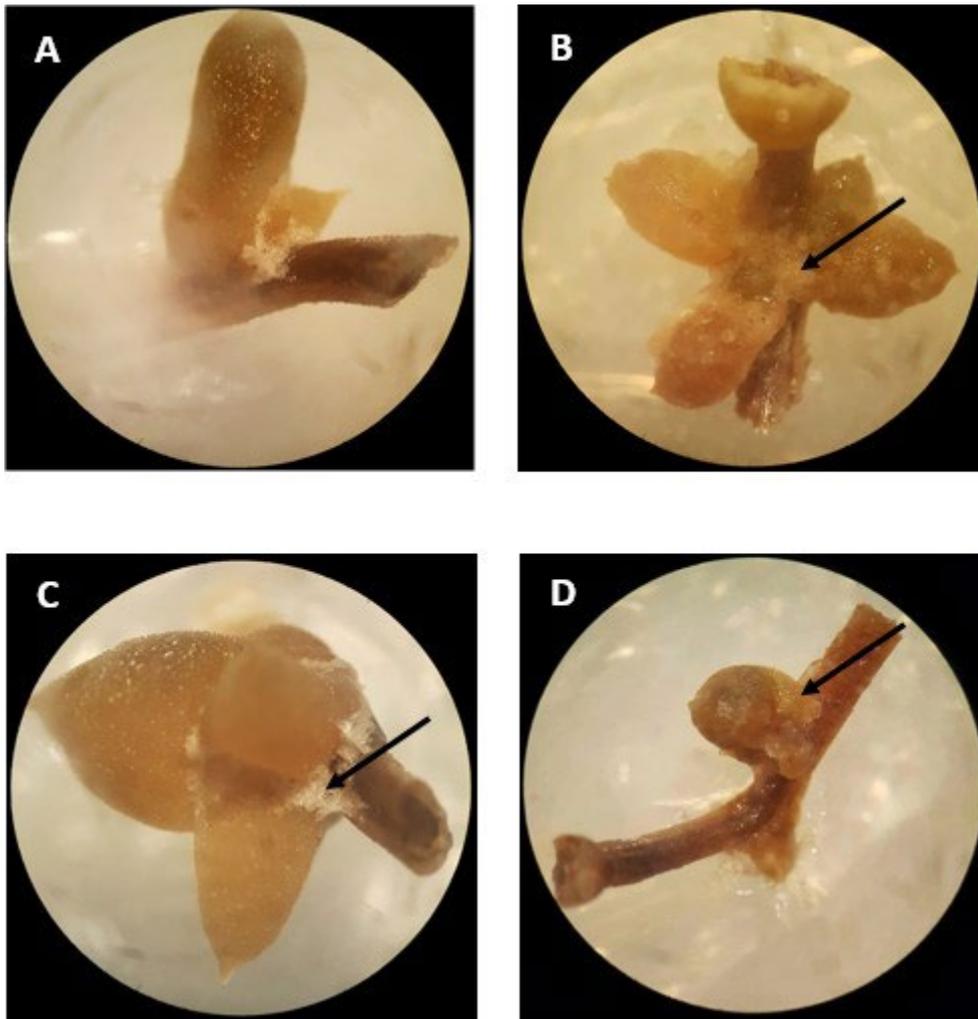
**Figure 25.** Cals primaires induits sur l'explant de feuille de *T. nudatum* Del en milieu MS.

La majorité des fragments de tiges, fleurs et bourgeons axillaires n'ont pas évolué au-delà de ce stade malgré les repiquages successifs réalisés à l'exception d'un fragment de feuille, dont les formations blanchâtres se sont amplifiées au cours du temps recouvrant complètement l'explant devenu méconnaissable par la suite. Nous avons obtenu ainsi un amas de cellules ou « cals primaires ».

Les cals amplifiés étaient de consistance friable, à forte hydratation et de couleur blanchâtre au début de la mise en culture, ensuite ont viré vers une couleur marron claire, puis brunâtre au fur et à mesure des repiquages.

Le suivi du processus de formation de cals de la plante *T. nudatum* Del en culture *in vitro*, a mis en évidence deux phases :

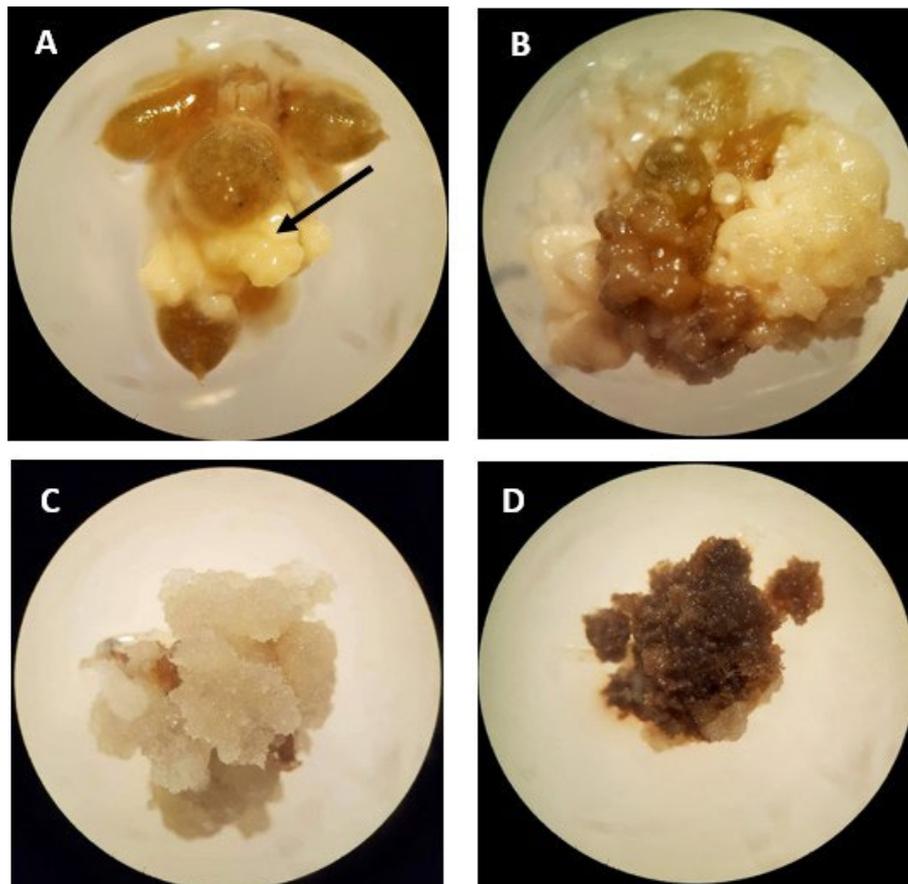
- **Phase d'induction** : Cette phase a débuté après l'ensemencement de l'explant sur le milieu de culture et a duré jusqu'à environ quatre semaines d'incubation selon les combinaisons hormonales employées. Les cals induits ou « cals primaires » étaient de nature friable et de couleur blanche ou jaunâtre et parfois de nature compacte et de couleur beige ou marron (**Figure 26**).



**Figure 26.** Induction de cals primaires (friables, blanchâtres) sur différents types d'explants obtenus de *T. nudatum* Del. (*A* : feuille ; *B* : bourgeon axillaire ; *C* : fleur ; *D* : tige).

- **Phase de multiplication** : Cette phase s'est manifestée par la formation d'une masse calogène importante de nature friable avec des structures compactes en fonction des repiquages des explants calogènes, ce sont des « cals secondaires » de couleur blanchâtre à verdâtre ou crème marron (**Figure 27**).

Cependant, la phase d'expression caractérisée par la formation de structures différenciées rappelant les embryons somatiques par leur couleur blanche n'a pas été atteinte et ce malgré le temps d'incubation alloué et les repiquages successifs.



**Figure 27.** Multiplication des cals primaires friables, blanchâtres (A, B, C) en cals secondaires compactes, brunâtres (D) sur le milieu M1 de l'explant de feuille.

Ces résultats montrent que l'induction de la callogenèse dépend fortement de la nature et l'origine tissulaire de l'explant utilisé (Duong *et al*, 1988). Ils concordent ainsi avec ceux de l'étude d'initiation à la callogenèse des deux espèces de la même famille à savoir *Atriplex halimus* L et *Atriplex canescens* Purch Nutt, en effet les explants foliaires de ces deux espèces ont montré une réactivité sur le milieu MS donnant naissance à des cals de consistance friable et de couleur qui varie entre le vert clair, le beige et le marron claire après un mois d'incubation (Halfaoui, 2010).

### 1.2. Effet des régulateurs de croissance sur l'induction de cals

Le type des régulateurs de croissance auxine et/ou cytokine est un facteur déterminant pour l'induction de la callogenèse. Ces phytohormones sont connues pour leur effet direct et/ou indirect sur l'induction de la prolifération cellulaire et leur orientation vers une organisation et une structure spécifique (Zrýd, 1988).

Sur les onze milieux de culture testés ne différant entre eux que par leur composition en régulateurs de croissance utilisés, seuls les milieux de culture M1, M2, M4 et M5

## Chapitre III : Résultats et discussion

contenant du ANA et de la kinetine à concentration égale ont pu produire des cals, tandis que les milieux M3, M6, M7, M8, M9, M10 et M11 n'ont pas pu induire la callogénèse et n'ont donné aucune réactivité.

Les données rassemblées dans le **Tableau 14** révèlent des réactions différentes des explants vis-à-vis des milieux de culture utilisés. En effet, le milieu M1 a donné le meilleur pouvoir calogène parmi tous les milieux de culture, par le taux le plus élevé  $60 \pm 13.33$  % avec l'explant de feuille ( $p < 0.01$ ), suivi par l'explant de bourgeon axillaire  $33.33 \pm 11.55$  % et par la tige et la fleur  $13.33 \pm 11.55$  % ( $p > 0.05$ ). En second lieu, le milieu M2 a enregistré chez l'explant de bourgeon axillaire le taux le plus élevé  $53.33 \pm 11.55$  % ( $p < 0.001$ ), suivi par l'explant de feuille, puis la fleur ( $33.33 \pm 30.55$  % et  $13.33 \pm 11.55$  % respectivement) ( $p > 0.05$ ); cependant on ne note aucune réactivité concernant l'explant de la tige dans ce milieu. De plus, le milieu M4 a induit le plus faible pouvoir calogène avec un taux de  $6.67 \pm 11.55$  % chez l'explant de fleur seulement ( $p > 0.05$ ). Enfin, le milieu M5 a permis d'avoir un taux similaire d'induction de cals  $6.67 \pm 11.55$  % avec tous les explants de la plante ( $p > 0.05$ ).

De ces résultats, il apparait clairement que l'apport combiné d'auxines et de cytokines particulièrement le milieu M1 et M2 (ANA-Kinetine) est très stimulant à la callogénèse chez la plante *T. nudatum* Del. En effet, la callogénèse a été induite à des degrés variables pour les milieux testés sur les différents explants de la plante étudiée.

**Tableau 14.** Pourcentage d'induction de cals des différents types d'explants.

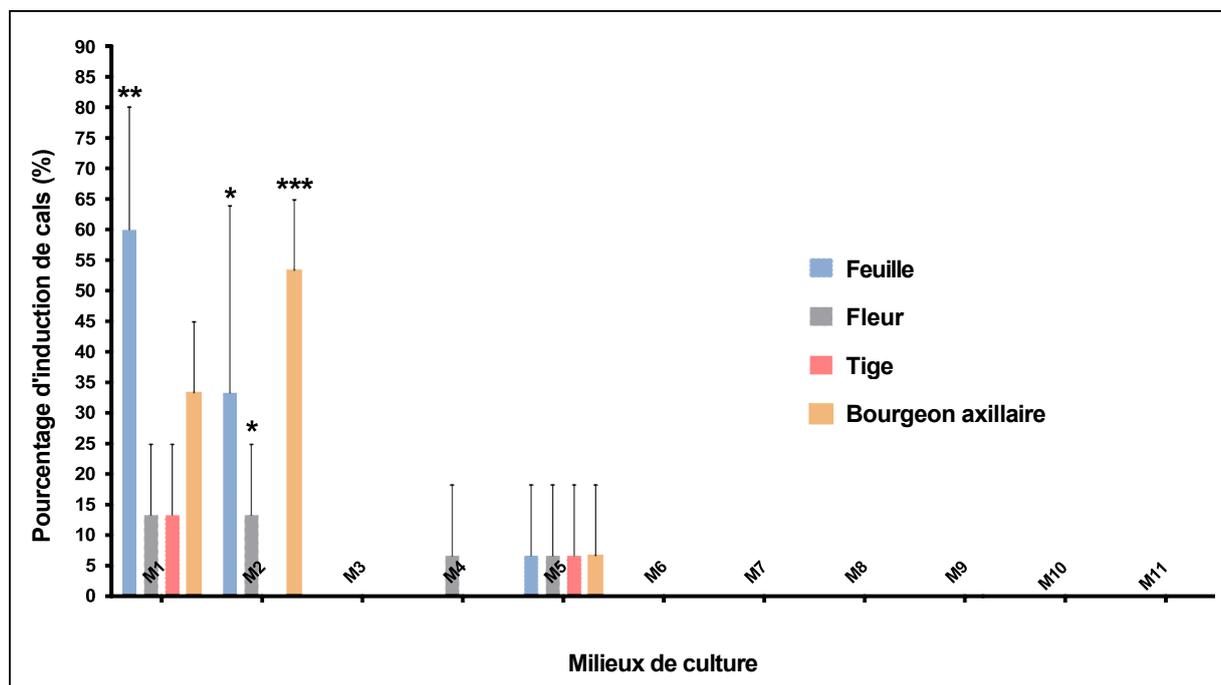
Milieux de culture	Pourcentage d'induction de cals (%)			
	Feuille	Bourgeon axillaire	Fleur	Tige
M1	$60 \pm 13.33$ **	$33.33 \pm 11.55$ ns	$13.33 \pm 11.55$ ns	$13.33 \pm 11.55$ ns
M2	$33.33 \pm 30.55$ *	$53.33 \pm 11.55$ ***	$13.33 \pm 11.55$ *	/
M3	/	/	/	/
M4	/	/	$6.67 \pm 11.55$ ns	/
M5	$6.67 \pm 11.55$ ns	$6.67 \pm 11.55$ ns	$6.67 \pm 11.55$ ns	$6.67 \pm 11.55$ ns
M6	/	/	/	/
M7	/	/	/	/
M8	/	/	/	/
M9	/	/	/	/
M10	/	/	/	/
M11	/	/	/	/

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart-type,  $n=5$ , ns: non significatif, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  par comparaison multiple.

## Chapitre III : Résultats et discussion

Les essais ont montré que la combinaison (Kin 0.04 mg/l-ANA 0.04 mg/l) a manifesté les meilleures potentialités callogènes et ce particulièrement chez les bourgeons axillaires et les feuilles de *T.nudatum* Del, ceci suggère que la combinaison d'une cytokine et d'une auxine est favorable à l'induction de la callogenèse chez cette espèce (**Figure 28**). Il est intéressant de montrer que le phénomène de callogenèse est obtenu sur des milieux équilibrés pour leurs concentrations en auxines et en cytokines ajoutés aux milieux de culture, ceci est en accord avec le principe mis en évidence par Skoog et Miller (1957).

En effet, plusieurs travaux montrent que la combinaison entre une hormone à effet auxinique et cytokinique joue un rôle important dans l'induction de la callogenèse chez plusieurs espèces végétales à savoir : *Atriplex halimus* (Ighilhariz, 2008) *Atriplex canescens* (Mei et al, 1997 ; Ighilhariz, 2008) *Gossypium hirsutum* (Kouadio et al, 2004) et le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L (Sané et al, 2006; Gueye et al, 2008). D'après Auge et al, (1989), la combinaison entre l'auxine et la cytokine joue un rôle fondamental dans l'orientation de l'organogenèse végétale et plusieurs auteurs rapportent qu'une bonne callogenèse est obtenue lorsque le rapport cytokine/auxine est égal à l'unité (Margara, 1984 ; Zrýd, 1988 ; Boxus et al, 1995).



**Figure 28.** Taux de cals formés sur les différents explants de *T. nudatum* Del en fonction de milieux de culture employés. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  DS,  $n=5$ , ns: non significatif, \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  et \*\*\* $p<0.001$  par comparaison multiple.

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

### **1.3. Effet de la composition minérale du milieu de culture sur l'induction de cals**

Les milieux de culture dont les macroéléments sont dilués à moitié (M1, M2, M3, M4, M5) ont donné le meilleur pouvoir calogène chez les fragments de feuille et de bourgeon axillaire de la plante *T.nudatum* Del par comparaison aux autres milieux qui n'ont donné aucune induction de cals (M6, M7, M8, M9, M10, M11).

Les travaux de Fotso et *al*, (2002) ont montré que le milieu de Murashige et Skoog (1962) dilué à moitié était favorable à l'organogenèse *in vitro* chez plusieurs espèces ligneuses tropicales et influe sur l'aspect des vitro plants. Nos résultats concordent avec ceux de Semiria (2013) où le milieu MS dont la concentration en macroéléments est diluée à moitié est favorable à la micropropagation chez *Atriplex halimus* à partir de bourgeons axillaires.

### **2. Analyse phytochimique qualitative et quantitative des métabolites de *T. nudatum***

Les plantes sauvages de la famille Amaranthaceae ont rarement été étudiées chimiquement, cependant, ils ont récemment attiré l'attention en tant que source précieuse de composés biologiquement actifs (Eva et *al*, 2015).

L'analyse chimique des plantes médicinales est une étape indispensable pour identifier et doser leurs molécules bioactives. L'étude de ces composés extraits à partir de *T.nudatum* Del a été réalisée avec différentes techniques de chromatographie d'identification (UPLC- MS) et de quantification (UPLC-MS-PDA). A l'instar des analyses métabolomiques, la chromatographie gazeuse (GC) est la méthode de choix pour identifier (GC-MS) et quantifier (GC-MS-FID) le plus grand nombre de composés volatiles (Villas-Bôas et *al*, 2011 ; Koek et *al*, 2006).

#### **2.1. Analyse des composés phénoliques par UPLC-MS**

Les composés phénoliques classiquement considérés comme métabolites secondaires, sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils regroupent une large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative différente selon les espèces considérées. L'objectif est de réaliser une étude phytochimique comparative de la plante naturelle et des cals issus de la culture *in vitro*. L'analyse métabolique a été réalisée à l'aide des techniques d'UPLC et de GC afin de d'identifier les composés phénoliques et volatils ayant des activités biologiques intéressantes et d'évaluer leur potentiel thérapeutique.

##### **2.1.1. Extraction des composés phénoliques libres**

Les composés phénoliques de la plante naturelle et de cals ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS-PDA). Les

## Chapitre III : Résultats et discussion

composés ont été identifiés et quantifiés par comparaison avec 57 composés standards phénoliques disponibles.

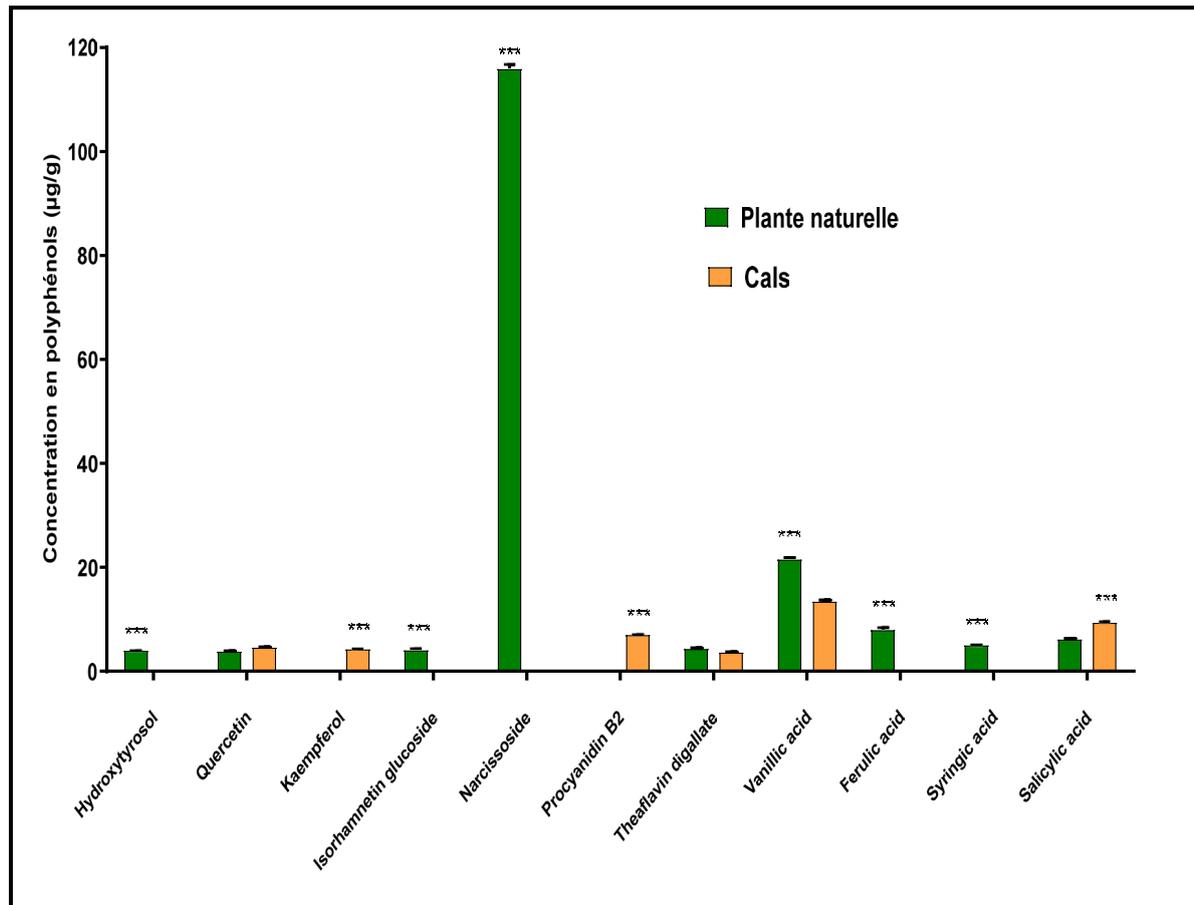
Les résultats révèlent de nombreuses différences dans les profils phénoliques des deux échantillons, qui accumulaient de grandes quantités de polyphénols (**Figure 29, Tableau 15**).

**Tableau 15.** Teneur en composés phénoliques libres chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ.

N° de pic	TR (min)	Nature de composé	Plante naturelle	Cals
2	5.06	Acide Vanillique	21.7±0.5***	13.1±0.4***
4	5.19	Acide salicylique	6.2±0.3***	9.0±0.4***
5	5.31	Acide syringique	5.1±0.2***	ND
6	5.57	Procyanidine B2	ND	6.9±0.1***
7	5.69	Kaempferol	ND	4.1±0.2***
11	6.72	Acide ferulique	7.2±0.9***	ND
13	6.96	Narcissoside	115.1±1.4***	ND
14	7.24	Isorhamnetin glucoside	3.8±0.4***	ND
16	8.50	Theaflavin digallate	4.4±0.4 <sup>NS</sup>	3.7±0.1 <sup>NS</sup>
18	8.74	Hydroxytyrosol	4.0±0.1***	ND
19	8.95	Quercétine	3.7±0.16 <sup>NS</sup>	4.5±0.2 <sup>NS</sup>

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 par comparaison multiple.

## Chapitre III : Résultats et discussion



**Figure 29.** Teneur en composés phénoliques libres chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ. Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  par comparaison multiple.

Les résultats montrent la présence d'une grande variété de composés phénoliques incluant les flavonoïdes, flavones, flavonol, flavan-3-ol, et les acides phénoliques, Ces résultats corroborent ceux de Badawneh et al (2017) et de Mouderas et al (2019) qui ont démontré la présence de flavonoïdes et de tanins dans la plante médicinale *T. nudatum* Del. Cependant les concentrations en polyphénols diffèrent entre les cals et la plante naturelle avec en général des valeurs en faveur de la plante naturelle.

En effet, quelques différences majeures dans les quantités totales de polyphénols libres peuvent être observées entre les deux échantillons. Dans certains cas, la présence d'un composé spécifique était très faible. Ces différences majeures pourraient s'expliquer par l'influence des phytohormones utilisées pour l'induction de la callogenèse, où la culture *in vitro* d'organes de plante biosynthétise et produit des composés identiques à ceux de la plante naturelle, mais également d'autres molécules absentes dans la plante naturelle, d'où l'importance de cette technologie (Ho et al, 2010). En ce sens, la quantité de narcissoside (flavonol) était significativement élevée chez la plante naturelle à 115.1 µg/g et absente chez

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

les cals, ce dernier a été isolé pour la première fois de *M.citrifolia*, une plante médicinale indienne connue pour son activité antioxydante (Bao-Ning et al, 2005).

En général, la plante naturelle a présenté la concentration la plus élevée dans toutes les familles de composés phénoliques, sauf pour la famille de flavan-3-ols, où la procyanidine B2 était la plus élevée chez les cals (6.9 µg/g) et absente chez la plante naturelle. Des études similaires ont été réalisées sur la plante médicinale *Fagopyrum esculent*, où la procyanidine B2 n'a pas pu être détectée chez la plante d'origine mais a été stimulée par le saccharose présent sur le milieu de culture des cals. À notre connaissance, le nombre de cultures de tissus végétaux produisant des pro-anthocyanidines est actuellement relativement limité (Mounou et al, 1991).

L'acide vanillique a montré une différence significative entre les deux échantillons en faveur de la plante naturelle (21.1 et 13.1 µg/g) ; d'après la littérature, l'acide vanillique est un candidat probable aux effets anti-inflammatoires de la plante médicinale *Clerodendrum petasites* (Brimson et al, 2019).

### **2.1.2. Extraction des composés phénoliques liés**

Une fois les composés phénoliques libres éliminés, les composés phénoliques liés ont été obtenus par hydrolyse basique à partir du matériau solide restant. La détermination a également été effectuée par UPLC-PDA-MS-tQ (**Figure 30, Tableau 16**).

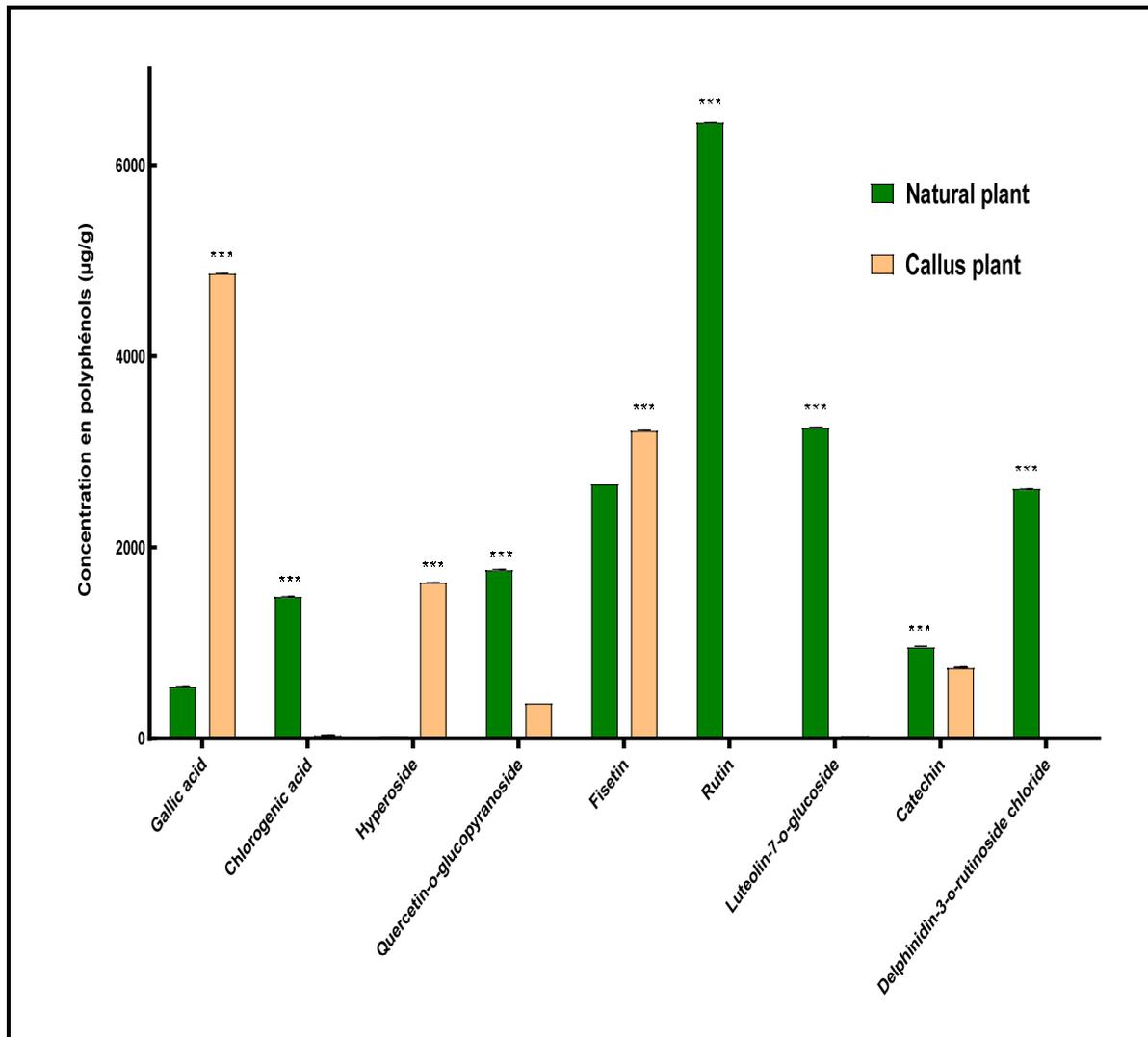
### Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 16.** Teneur en composés phénoliques liés chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ.

N° de pic	TR (min)	Nature du composé	Plante naturelle (µg/mg)	Cals (µg/mg)
1	4.25	Acide chlorogénique	1480±1.6***	30±0.4***
3	5.18	Catéchine	940±12.1***	733 ±9.8***
8	6.24	Delphinidin-3-o-rutinoside chloride	2614± 2.3***	ND
9	6.47	<b>Hyperoside</b>	26±0.3***	<b>1631± 2.0***</b>
10	6.56	Quercetin-o-glucopyranoside	1761±0.4***	367± 0.4***
12	6.81	<b>Rutine</b>	<b>6440± 3.0***</b>	ND
15	7.77	<b>Luteolin-7-o-glucoside</b>	<b>3250± 2.7***</b>	30±0.4***
17	8.63	<b>Acide gallique</b>	540±1.1***	<b>4863±6.0***</b>
20	9.16	<b>Fiséatine</b>	2660±0.4***	<b>3220±3.6***</b>

Les valeurs sont des moyennes ± écart-type, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 par comparaison multiple.

## Chapitre III : Résultats et discussion



**Figure 30.** Teneur en composés phénoliques liés chez la plante naturelle et les cals déterminée par UPLC-PDA-MS-tQ. Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  par comparaison multiple.

Les résultats montrent des différences statistiquement significatives entre la plante naturelle et les cals en termes de concentrations en composés phénoliques, ces différences sont généralement en faveur de la plante naturelle (**Figure 31**).

Parmi les acides phénoliques identifiés, l'acide chlorogénique était beaucoup plus présent chez la plante naturelle que le cal (1480µg/g et 30µg/g respectivement), ce dernier est un composé prédominant dans les cultures de cals de la plante médicinale de *Bellis perennis* L (Karakas et al, 2016), et connu pour réduire la pression artérielle (Takuya et al, 2009) et à réduire le risque de diabète de type 2 (Aimee et al, 2009).

L'acide gallique était significativement plus abondant chez les cals avec une concentration de 4863 µg/g contre 540 µg/g chez la plante naturelle. Il s'agit d'un composé prédominant chez la plante tropicale *A. lanata* (Amaranthaceae) largement utilisée en

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

médecine traditionnelle (Gaurav et al, 2013). L'acide gallique est responsable de plusieurs activités antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antivirales, anticancéreuses, antioxydantes et antidiabétiques. En raison de ces activités biologiques, l'acide gallique pourrait constituer un bon composé de tête pour les nouvelles utilisations thérapeutiques de *T.nudatum* Del (Omer et al, 2017).

Les flavonols, les flavones, les flavan-3-ols et les anthocyanes se sont révélés généralement plus abondants chez la plante naturelle que les cals. Selon la littérature, les plantes de la famille des Chenopodiaceae ont une teneur assez élevée en flavonoïdes (Repo- Carrasco et al, 2010). Pour les flavonols, la plante naturelle a montré la plus forte concentration de quercétine-o-glucopyranoside (1761 µg/g) contre 367 µg/g pour les cals. La quercétine et la rutine ont été identifiées comme responsables de l'activité antimicrobienne vérifiée chez la plante médicinale *Chenopodium ambrosioides* (Jesus et al, 2018).

La seule flavone identifiée est le lutéoline-7-o-glucoside qui était significativement plus abondante chez la plante naturelle que les cals (3250 µg/g et 30µg/g respectivement). Les flavonoïdes isolés de la plante médicinale *Halostachys caspica* (Chenopodiaceae) y compris la 3-O-β-D-glucopyranoside de quercétine et la lutéoline ont montré un large spectre d'activité antimicrobienne et antifongique ainsi qu'une activité antioxydante remarquable (Hao et al, 2010).

L'hyperoside était retrouvé soixante fois plus abondant chez les cals (1631µg/g) que chez la plante naturelle (26 µg/g), il a été identifié comme le composé le plus abondant chez une Amaranthaceae (*Agriophyllum squarrosum*) couramment utilisée en médecine traditionnelle chinoise (Wang et al, 2019) ; en effet, ce composé possède différentes activités anti-inflammatoires, antidépressives, neuroprotectrices, cardio-protectrices, antidiabétiques, anticancéreuses, antifongiques, radioprotectrices, gastro-protectrices et antioxydantes (Raza et al, 2017).

La fisétine qui était retrouvée en plus grande quantité chez les cals que la plante naturelle (3220 µg/g et 2660 µg/g respectivement) est un composé phénolique majeur identifié dans les extraits de *Hertia cheirifolia* L, et connue pour son activité anti- inflammatoire et anti cancéreuse (Majouli et al, 2017), il a été identifié comme un agent anticancéreux aux propriétés antiangiogéniques (Touail et al, 2011).

La rutine, bien connue en tant que composé naturel doté d'un large éventail de propriétés médicinales (Sofic et al, 2010) est responsable de l'activité antimicrobienne de la plante médicinale *Chenopodium ambrosioides* L (Jesus et al, 2018). Dans le cas de *T.nudatum* Del, elle était retrouvée seulement chez la plante naturelle (6440 µg/g).

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

La catéchine de la famille de flavan-3-ol était retrouvée chez la plante naturelle et le cal à une concentration de 940 µg/g et 733 µg/g respectivement, c'est un polyphénol naturellement présent dans certaines plantes alimentaires et médicinales, telles que les légumineuses, les rubiacées, l'écorce de tige des espèces de fabacées. Il présente des activités anti-tumorales et anti-inflammatoires remarquables (Fan et al, 2017).

Enfin, le chlorure de Delphinidine-3-o-rutinoside -composé appartenant au groupe des anthocyanes- était seulement détecté chez la plante naturelle (2614 µg/g). Des études antérieures ont démontré que les bienfaits des anthocyanes sur la santé sont principalement imputables à leurs activités antioxydantes, antiplaquettaires, ophtalmiques et vasoprotectrices (Hitoshi et al, 2001).

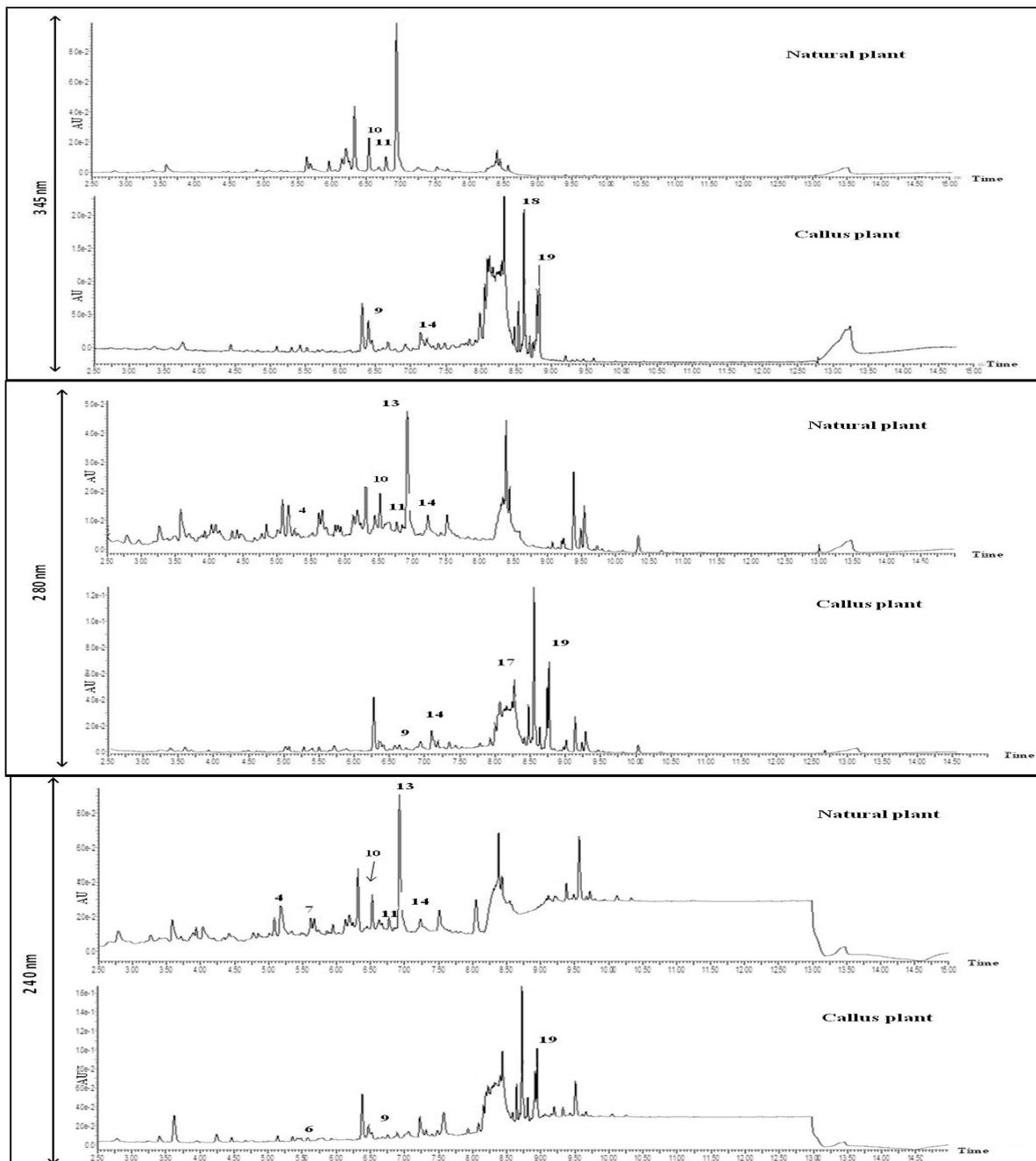
Ces résultats corroborent et confirment les travaux de (Badawneh et al, 2017) et (Mouderas et al. 2019) à propos de la présence de flavonoïdes et de tanins dans la plante naturelle *T. nudatum* Del. Les différences majeures en termes de quantités et de présence de composés phénoliques entre les cals et la plante naturelle peuvent être expliquées par l'influence des phytohormones (cytokinine et auxine) utilisés pour l'induction de la callogenèse, ainsi que l'arrêt de multiplication des cals primaires en cals secondaires malgré les repiquages successifs.

Les conditions *in vitro* peuvent donc fournir des composés bioactifs dans un système contrôlé dans des périodes de culture courtes garantissant un apport continu en métabolites d'intérêt que l'on ne trouve pas parfois chez la plante naturelle; en outre, les cellules issues des cultures *in vitro* sont indemnes de maladies et ne sont pas exposées aux variations saisonnières. (Loredo-Carrillo, 2013).

### **2.1.3. Extraction des pro-anthocyanes liés**

Les pro-anthocyanidines totales liées (tanins condensés) de la plante naturelle *T.nudatum* Del et les cals ont été mesurées par spectrophotométrie UV-visible en utilisant du chlorure de cyanure comme standard de référence. Nous avons remarqué son absence dans les deux échantillons. Ces résultats prouvent la présence sporadique des tanins condensés; comme chez d'autres familles comme les Amaranthaceae et les Chenopodiaceae (Bittrich et al, 1991).

## Chapitre III : Résultats et discussion



**Figure 31.** Chromatogrammes d'UPLC-PDA d'extraits phénoliques avec MeOH / H<sub>2</sub>O et Acétone / H<sub>2</sub>O, UV à 345 nm ; les pics numérotés correspondent aux composés identifiés: (9) Hyperoside, (10) Quercétine-o-glucopyranoside, (11) Acide férulique, (14) Isorhamnetin glucoside, (18) hydroxytyrosol, (19) quercétine. Chromatogrammes d'UPLC-PDA d'extraits phénoliques avec MeOH / H<sub>2</sub>O et Acétone / H<sub>2</sub>O, UV à 280 nm ; les pics numérotés correspondent aux composés identifiés: (4) acide salicylique, (9) hyperoside, (10) quercétine-o-glucopyranoside, (11) acide férulique, (14) glucoside d'isorhamnetine, (17) acide gallique, (19) quercétine. Chromatogrammes d'UPLC-PDA d'extraits phénoliques avec MeOH / H<sub>2</sub>O et Acétone / H<sub>2</sub>O, UV à 240 nm ; les pics numérotés correspondent aux composés identifiés: (4) acide salicylique, (6) procyanidine B<sub>2</sub>, (7) kaempférol, (9) hyperoside, (10) quercétine-o-glucopyranoside, (11) acide férulique, (13) narcissoside, (14) Isorhamnetin glucoside, (19) quercétine.

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

### **2.2. Analyse des composés volatiles par GC-MS-FID**

La technique GC-MS est un outil qui s'avère utile pour un premier criblage d'identification de composés volatils présents dans les tissus végétaux. Cette technique permet d'identifier des composés qui n'ont pas pu être détectés auparavant dans l'échantillon. Le **Tableau 17** répertorie le nombre de pics, le temps de rétention et les noms des composés détectés. Les résultats montrent la présence de nombreux composés métaboliques aussi bien chez la plante naturelle que les cals (**Figure 32**). À quelques exceptions près, les composés identifiés chez la plante naturelle et les cals étaient les mêmes.

Les acides carboxyliques, les acides dicarboxyliques et aromatiques à chaîne courte, comme l'acide benzoïque, l'acide malique, l'acide 3,4-diméthoxy cinnamique, l'acide citrique, l'acide férulique et enfin l'acide nonanedioïque (Pics 1, 3, 15, 8, 14 et 9 respectivement), ont été identifiés comme esters méthyliques dans les deux échantillons.

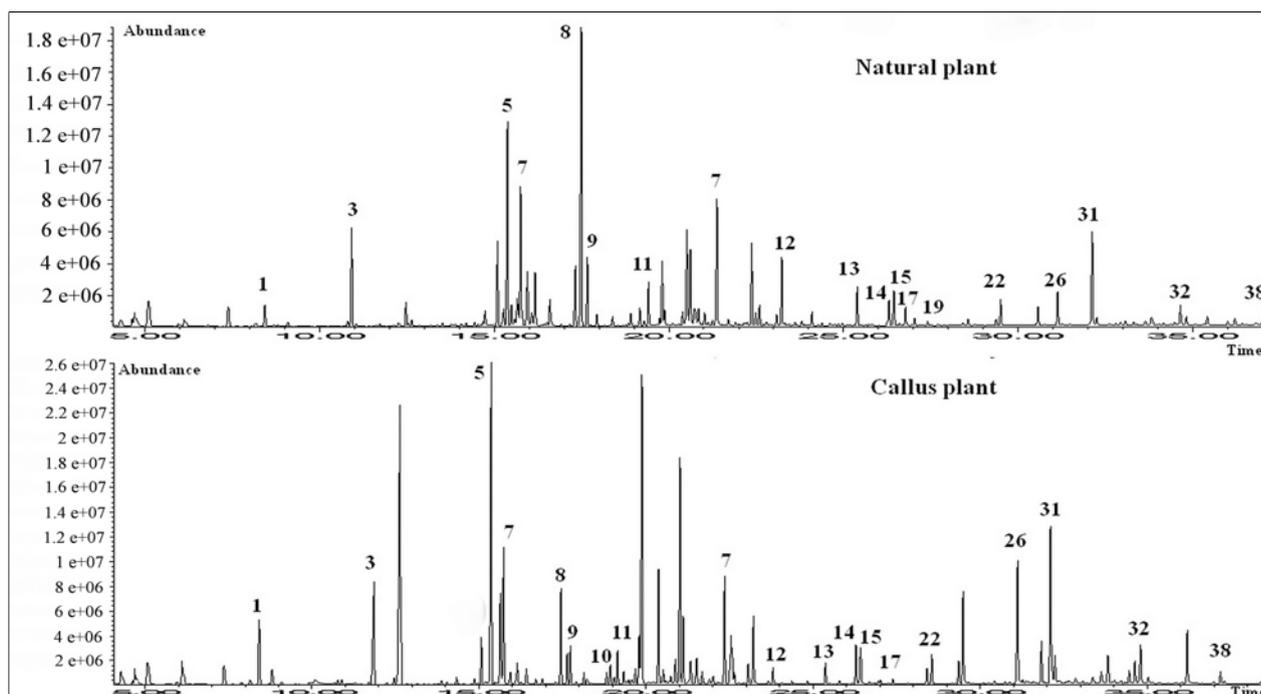
D'autres acides carboxyliques tels que l'acide salicylique, l'acide laurique et l'acide dihydroxybenzoïque (Pic 4, pic 6, pic10 respectivement) ont été retrouvés uniquement dans les cals. De plus, les monosaccharides étaient particulièrement abondants (Pic 7) et les disaccharides moins abondants dans les deux échantillons.

Les alcools gras à longue chaîne, les acides gras hydroxy et les stérols ont également été détectés.

Enfin, des acides gras communs ont été remarquablement détectés, tels que l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide margarique, l'acide arachidique, l'acide oléique, l'acide béhénique, l'acide lignocérique et enfin de l'acide hexacosanoïque (Pics 11, 13, 12, 22, 17, 26, 32, 38 respectivement) dans les deux échantillons, alors que seul l'acide linoléique (Pic 19) a été détecté chez la plante naturelle.

Tous ces composés sont connus par leurs activités antifongiques et antibactériennes (Lima et *al*, 2011; Chandrasekharan et *al*, 2008).

## Chapitre III : Résultats et discussion



**Figure 32.** Chromatogrammes GC-MS des composés volatils de la plante naturelle et des cals.

## Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 17. Les composés volatiles identifiés 1 chez la plante naturelle et les calcs par GC-MS.

No	Temps retention (RT)	Plante naturelle	Cals
1	8.15	Acide benzoïque	Acide benzoïque
2	8.43	Glycérol	Glycérol
3	10.92	Acide malique	Acide malique
4	15.02	-	Acide Salicylique
5	15.76	Monosaccharides sous Forme furanosique (coelutions)	Monosaccharides sous Forme furanosique (coelutions)
6	15.91	Acide laurique	-
7	16.01-22.60	Monosaccharides sous forme pyranoside (coelutions)	Monosaccharides sous forme pyranoside (coelutions)
8	17.32	Acide citrique	Acide citrique
9	17.91	Acide Nonanedioïque	Acide Nonanedioïque
10	19.55	-	Acide 2,4-Dihydroxybenzoïque
11	19.73	Acide Myristique	Acide Myristique
12	24.87	Acide Margarique	Acide Margarique
13	25.05	Acide Palmitique	Acide Palmitique
14	25.40	Acide Ferulique	Acide Ferulique
15	25.73	Acide 3,4-dimethoxy Cinnamique	Acide 3,4-dimethoxy Cinnamique
16	25.80	Acide 2-Hydroxyhexadecanoïque	Acide 2-Hydroxyhexadecanoïque
17	26.30	Acide Oleique	Acide Oleique
18	26.45	Acides Linoleique et stéarique (coelution)	Acides Linoleique et stéarique (coelution)
19	26.77	Acide Linolenique	-
20	28.42	1-Eicosanol	1-Eicosanol
21	28.57	Acide 16-Hydroxyhexadecanoïque	Acide 16-Hydroxyhexadecanoïque
22	29.37	Acide Arachidique	Acide Arachidique
23	29.50	Acide 1,16-Hexadecanedioïque	Acide 1,16-Hexadecanedioïque
24	30.58	Acide 10,16-Dihydroxyhexadecanoïque	-

### Chapitre III : Résultats et discussion

25	31.12	Acide Docoheptaénoïque	Acide Docoheptaénoïque
26	<b>32.10</b>	<b>Acide Behénique</b>	<b>Acide Behénique</b>
27	32.25	Acide 1,18-Octadécane-1,18-dioïque	Acide 1,18-Octadécane-1,18-dioïque
28	33.39	Acide Tricosanoïque	Acide Tricosanoïque
29	33.60	1-Tétracosanol	1-Tétracosanol
30	33.96	Acide 2-Hydroxydocosanoïque	Acide 2-Hydroxydocosanoïque
31	<b>34.01</b>	<b>Acide Docosadiénoïque</b>	<b>Acide Docosadiénoïque</b>
32	<b>34.64</b>	<b>Acide Lignocérique</b>	<b>Acide Lignocérique</b>
33	34.81	Acide Eicosane-1,19-dioïque	Acide Eicosane-1,19-dioïque
34	34.91	Acide Triacétanoïque	Acide Triacétanoïque
35	35.01	-	Acide 2-Hydroxytricosanoïque
36	35.99	1-Hexacosanol	-
			Acide 2-
		Acide 2-Hydroxytétracosanoïque et	Hydroxytétracosanoïque et
37	36.20	l'Acide 22-hydroxydocosanoïque (coélution)	l'Acide 22- hydroxydocosanoïque (coélution)
38	<b>37.01</b>	<b>Acide Hexacosanoïque</b>	<b>Acide Hexacosanoïque</b>
39	38.21	1-Octacosanol	-
40	39.23	Acide Octacosanoïque	-
41	40.29	1-Triacétanol	-
42	41.30	Stigmasterol	Stigmasterol
43	42.00	Béta-Sitosterol	Béta-Sitosterol
44	42.12	Stigmastanol	Stigmastanol

<sup>1</sup>Les composés avec les groupes hydroxyliques ont été identifiés comme étant des dérivés de triméthylsilyléther et les composés avec des groupes carboxyliques ont été identifiés comme étant des esters méthyliques préalablement transformés en dérivés.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### 2.3. Quantification des acides gras

L'analyse quantitative GC-FID des esters méthyliques d'acides gras a révélé la présence de plus d'acides gras saturés qu'insaturés (Figure 33, Tableau 18).

**Tableau 18.** Quantification des acides gras chez la plante naturelle et les cals déterminée par GC-FID<sup>1</sup>.

N° de pic	Nature de l'acide gras	Plante naturelle (ww %)	Cals (ww %)
21.50	Acide myristique	4.25±0.06***	0.55±0.09***
23.25	Acide pentadecanoïque	0.33±0.01 <sup>NS</sup>	0.43±0.02 <sup>NS</sup>
<b>25.05</b>	<b>Acide palmitique</b>	<b>17.54±0.09***</b>	<b>15.49±0.33***</b>
27.98	Acide oleique	8.57±0.03***	7.30±0.27***
28.08	Acide stearique	7.63±0.09 <sup>NS</sup>	8.35±0.02 <sup>NS</sup>
28.13	Acide gamma-linoléique	1.26±0.01***	5.69±0.05***
30.88	Acide arachidonique	6.29±0.01***	0.46±0.02***
30.98	Acide arachidique	5.19±0.02 <sup>NS</sup>	4.54±0.09 <sup>NS</sup>
<b>31.12</b>	<b>Acide docosahexaénoïque (EPA)</b>	<b>1.03±0.04***</b>	<b>15.40±0.34***</b>
32.34	Acide hénéicosanoïque	4.98±0.02***	0.47±0.02***
<b>32.10</b>	<b>Acide behénique</b>	<b>35.58±0.06***</b>	<b>30.59±0.67***</b>
33.82	Acide docosahexaénoïque (DHA)	4.23±0.04 <sup>NS</sup>	3.97±0.64 <sup>NS</sup>
34.93	Acide tricosanoïque	1.20±0.01 <sup>NS</sup>	0.90±0.05 <sup>NS</sup>
36.00	Acide nervonique	0.1±0.26***	2.28±0.01***
36.16	Acide lignocérique	1.82±0.02***	3.59±0.04***

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 par comparaison multiple.

<sup>1</sup>: quantifier les acides gras dans les deux échantillons par la méthode d'étalonnage; L'ester méthylique d'acide heptadécanoïque a été utilisé comme étalon interne (IS).

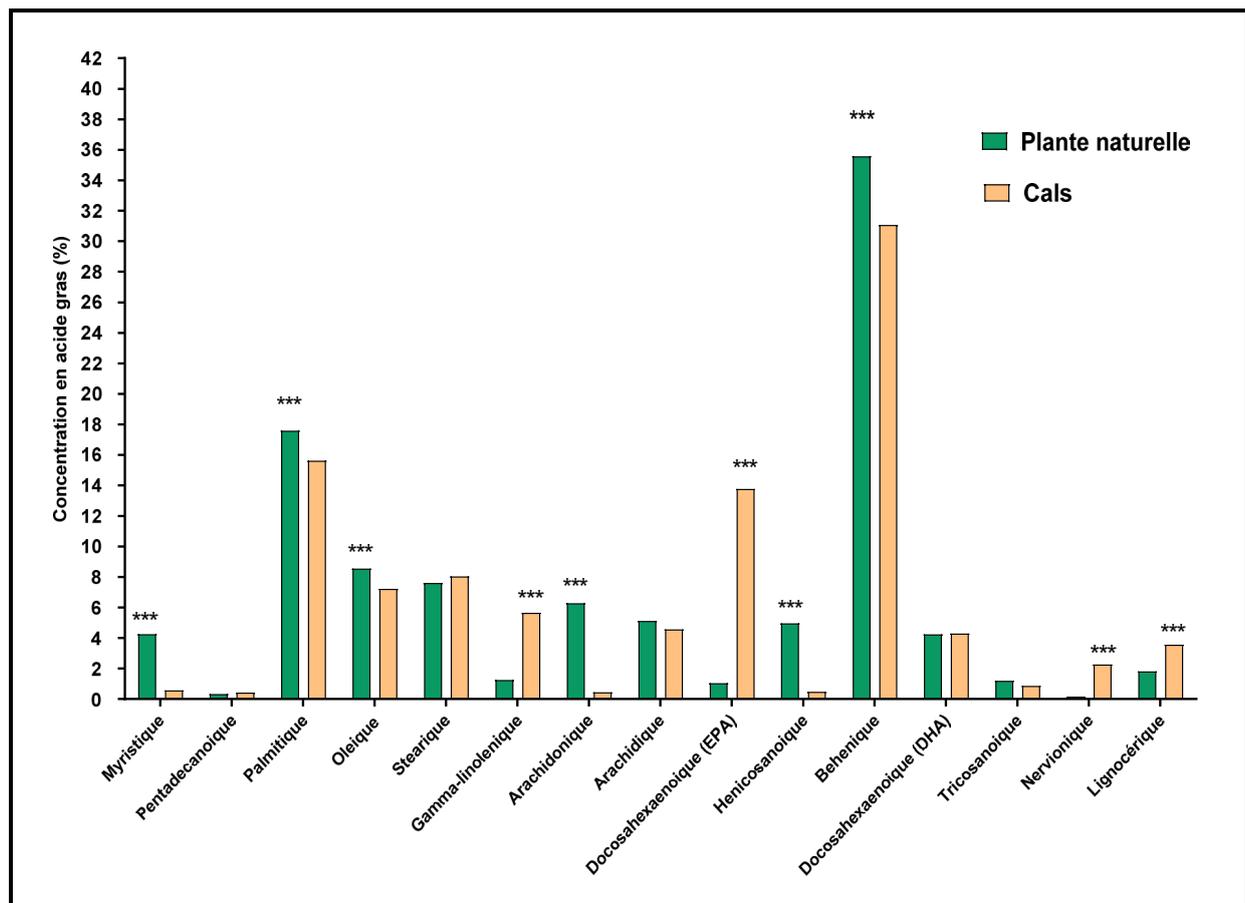
Parmi les acides gras analysés, trois composés principaux ont été détectés et quantifiés. Le premier est l'acide behénique (C22:2), qui était plus abondant chez la plante naturelle que les cals (35.58±0.06% et 30.59±0.67% respectivement). L'acide palmitique (C16:0) était le deuxième composé le plus abondant chez les deux échantillons à savoir 17.54±0.09% chez la plante naturelle et 15.49±0.33% chez les cals. Enfin, l'acide docosahexaénoïque (EPA) (C20:5) était significativement plus abondant chez les cals

## Chapitre III : Résultats et discussion

(15.40±0.34%) que chez la plante naturelle où il était retrouvé en très faibles quantités (1.03±0.04%).

Selon les travaux de Agoramorthy et al (2007) et Ali et al (2016), les acides gras sont réputés pour leur propriétés antifongiques, un extrait d'esters méthyliques d'acides gras riche en acide palmitique de *Excoecaria agallocha*, a inhibé la croissance de quatre espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*), c'est pourquoi ils peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens contre les microorganismes pathogènes pour l'homme (Chandrasekharan et al, 2011).

L'acide béhénique retrouvé chez *Chenopodium amrosioides* -plante médicinale de la famille des Chenopodiaceae- est connu pour son activité antimicrobienne contre certaines souches bactériennes et certains champignons (Muhammad et al, 2013). Enfin, l'acide docosadiénoïque semble également être impliqué dans l'activité antioxydante et anti-inflammatoire du corps humain (Geneive et al, 2002).



**Figure 33.** Quantification des acides gras chez la plante naturelle et les calms déterminée par GC-FID. Les valeurs sont des moyennes±DS, n=3, ND : non déterminé, ns: non significatif, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  par comparaison multiple.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### 3. Activités biologiques de *T. nudatum* Del

*T. nudatum* Del est une plante médicinale utilisée pour ses vertus thérapeutiques contre plusieurs affections. L'objectif était d'entre autre de tester pour la première fois l'effet pharmacologique de la partie aérienne de la plante, en évaluant certaines activités biologiques à savoir l'activité antalgique, anti-inflammatoire, antimicrobienne et anti parasitaire (anti-leishmanienne).

Malheureusement à cause de l'insuffisance du matériel biologique de la culture *in vitro*, les effets biologiques des cals n'ont pas pu être testés (toute la quantité a été épuisée dans l'étude phytochimique).

#### 3.1. Test de toxicité aiguë de *T. nudatum* Del chez les souris

En vue de l'étude de la toxicité aiguë de l'infusé de la partie aérienne de *T. nudatum* Del à différentes doses par voie orale, le monitoring des souris a été effectué quotidiennement durant 14 jours.

##### 3.1.1. Effets de l'administration de l'infusé sur les signes généraux des souris

La surveillance des souris n'a révélé aucun changement significatif notable tant sur l'aspect général des animaux (pilosité, peau, état des yeux, des oreilles et de la bouche) que sur la nature des selles et des urines, de plus, les observations quotidiennes n'ont pas révélé de diarrhées, d'hématurie, de mouvements non coordonnés ou de détresses respiratoires ; enfin, aucune mortalité n'a été enregistrée avant le sacrifice des animaux ce qui n'a pas permis la détermination de la DL50. Cette dernière serait donc supérieure à 6000 mg/kg de p.c. pour l'infusé.

En toxicologie, le niveau de toxicité d'une substance pharmacodynamique est défini selon sa DL50 (Diezi, 1989) (**Tableau 19**).

**Tableau 19.** Classification de la toxicité des substances pharmacodynamiques.

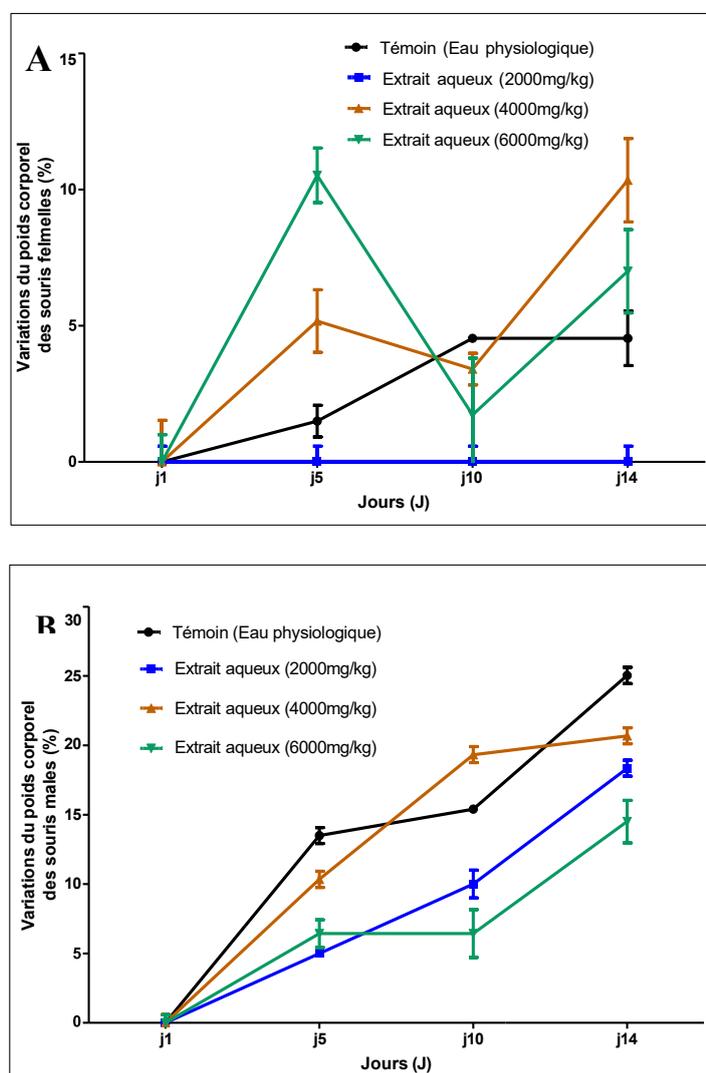
DL50 (mg/kg de p.c)	Niveaux de toxicité
< 5 mg/kg	Ultra toxique
5-50 mg/kg	Extrêmement toxique
500-5000 mg/kg	Modérément toxique
5000-15000 mg/kg	Légèrement toxique
>15000 mg/ kg	Non toxique

## Chapitre III : Résultats et discussion

Selon cette classification, l'infusé de la partie aérienne de *T. nudatum* Del administré par voie orale chez les souris est classé comme substance légèrement toxique voire non toxique. Toutefois d'autres tests toxicologiques devraient être entrepris avec d'autres voies d'administration comme la voie cutanée qui est très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des plaies cutanées.

### 3.1.2. Effets de l'administration de l'infusé sur l'évolution du poids corporel des souris

Afin de déterminer l'influence de l'administration de l'infusé par voie orale sur la croissance des souris, la variation du poids corporel des lots témoins et traités a été enregistrée sur un intervalle de 5 jours tout au long de l'expérimentation (**Figure 34**).



**Figure 34.** Variations du poids corporel (%) des souris durant 14 jours de traitement à différentes doses de l'infusé de *T.nudatum* Del administré par voie orale. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  DS,  $n=6$  (3 mâles et 3 femelles) ; A : souris femelles, B : souris mâles.

## Chapitre III : Résultats et discussion

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly et al, 2004). L'analyse des données par le test Anova à un facteur a permis de conclure qu'il n'y a aucune différence significative dans la croissance des souris mâles et femelles à toutes les doses de l'infusé (2000, 4000 et 6000 mg/kg p.c.) par rapport au lot témoin ( $p>0.05$ ). Cependant des analyses complémentaires comme les analyses hématologiques et biochimiques devraient être effectuées afin d'apprécier les effets non apparents ou à long termes de l'infusé de cette plante.

### 3.1.3. Effets de l'administration de l'infusé sur le poids moyen des organes internes des souris.

Le variation 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). A la fin de l'expérimentation, les souris traitées et témoins ont été sacrifiées et le foie et le cœur ont été extraits, examinés et pesés (Tableau 20). L'observation macroscopique de ces organes n'a révélé aucun changement statistiquement significatif tant sur la forme et la taille que sur le poids, de plus, l'examen des organes n'a pas révélé la présence d'hémorragies ou de kystes ; témoignant ainsi l'innocuité de l'infusé sur les organes vitaux.

**Tableau 20.** Poids moyen des organes internes chez les souris ayant reçu des doses croissantes de l'infusé de *T. nudatum* Del.

Poids moyen des organes (mg)	Témoin (mg/Kg)	Doses de l'infusé (mg/kg)		
		2000 mg/kg	4000 mg/kg	6000 mg/kg
<b>Souris mâles</b>				
Cœur	0.109±0.013	0.111±0.01 <sup>ns</sup>	0.111±0.013 <sup>ns</sup>	0.097±0.01 <sup>ns</sup>
Foie	1.229±0.017	1.141±0.10 <sup>ns</sup>	0.993±0.187 <sup>ns</sup>	1.025±0.19 <sup>ns</sup>
<b>Souris femelles</b>				
Cœur	0.126±0.01	0.132±0.02 <sup>ns</sup>	0.130±0.003 <sup>ns</sup>	0.141±0.05 <sup>ns</sup>
Foie	1.252±0.11	1.374±0.14 <sup>ns</sup>	1.377±0.06 <sup>ns</sup>	1.266±0.07 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles), ns: non significatif, \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  et \*\*\* $p<0.001$  comparé au groupe témoin.

### 3.2. Test de cytotoxicité *in vitro* de *T. nudatum* Del sur les monocytes humains (THP1)

La cytotoxicité des extraits phénoliques de *T. nudatum* a été évaluée sur des macrophages différenciés à partir de cellules de lignée humaine de type THP1 afin d'évaluer

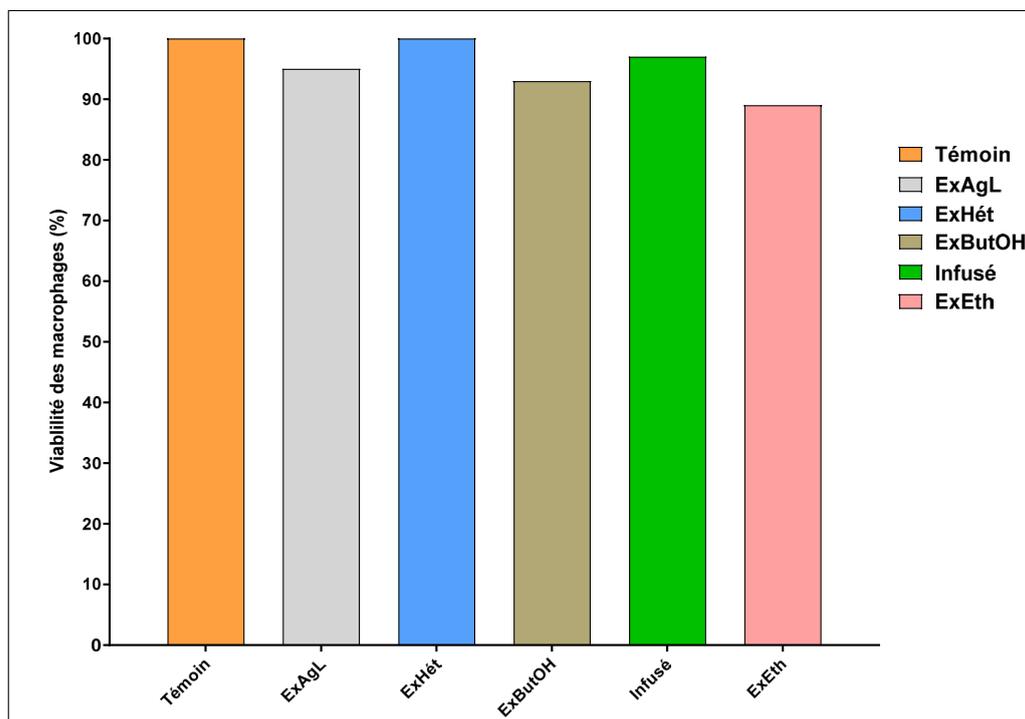
## Chapitre III : Résultats et discussion

leur innocuité sur les cellules humaines. Les résultats (**Tableau 21 ; Figure 35**) montrent que la viabilité des macrophages en présence des différents extraits phénoliques de *T. nudatum* reste élevée et varie entre 89 et 100 %, l'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les extraits à la dose de 2000 $\mu$ g/ml et le témoin.

**Tableau 21.** Pourcentage de viabilité des macrophages en présence des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del.

Pourcentage de viabilité des macrophages (%)	
Témoin	100
ExAgL	95
ExHét	100
ExButOH	93
Infusé	97
ExEth	89

*ExEth*: extrait éther diéthylique, *ExAgL* : extrait aglycones libres, *ExButOH*: extrait n-butanolique, *ExHét*: extrait hétérosidique.



**Figure 35.** Pourcentage de viabilité des macrophages en présence des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del.

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

Les tests de cytotoxicité sont très importants du fait de l'intérêt des produits naturels et leur utilisation comme traitements thérapeutiques alternatifs à partir des plantes médicinales. L'utilisation répandue de la médecine traditionnelle n'est pas prouvée comme étant sans danger pour les personnes n'ayant pas un accès aux médicaments conventionnels. Dans ce contexte, l'investigation de l'efficacité de produits naturels est nécessaire et obligatoire dans un processus de validation d'une plante médicinale (Edzard, 1998).

### **3.3. Test anti-inflammatoire de *T. nudatum* Del chez les souris**

Cette étude a pour objectif d'évaluer pour la première fois l'activité anti-inflammatoire de *T. nudatum* Del. Les expériences ont été réalisées sur la base du modèle de l'œdème aiguë de la patte de souris induit par une solution de carragénine à 1% ; la réponse inflammatoire induite par la carragénine a été décrite chez les rats par Winter et *al* (1962) et chez les souris par Levy en 1969. Ces dernières sont le modèle expérimental standard utilisé dans ce travail pour l'étude de l'inflammation aiguë (Magaji et *al*, 2008; Patel et *al*, 2010). Nous avons testé sur ce modèle l'infusé de plante à la dose de 40, 80 et 120 mg/kg de p.c. et les quatre extraits polyphénoliques; ExEth, ExButOH, ExAgL et ExHét à la dose de 100, 300 et 500 mg/kg de p.c. administrés par voie orale et avons suivi l'évolution des œdèmes durant 4 heures. Les résultats obtenus ont été comparés aux souris du lot témoin ayant reçu une dose de 150 mg/kg de p.c. d'acide acétylsalicylique qui est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (**Tableau 22, 23, 24 ; Figures 36, 37**).

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 22.** Effets de l'infusé, des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del et d'ASA sur l'œdème induit par la carragénine à 1%.

	Dose du produit (mg/kg p.c)	Pourcentage d'œdème (%)	Pourcentage de protection (%)
<b>Eau physiologique</b>	-	11.14	-
<b>AAS</b>	150	7.64	<b>31,41</b>
<b>Infusé</b>	40	25.04	0
	80	20.74	0
	120	4.44	<b>41,91</b>
<b>ExHét</b>	100	48.19	0
	300	50.54	0
	500	47.65	0
<b>ExAgL</b>	100	46.70	0
	300	60.57	0
	500	62.67	0
<b>ExButOH</b>	100	31.00	0
	300	35.74	0
	500	32.35	0
<b>ExtEth</b>	100	69.44	0
	300	73.20	0
	500	63.00	0

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles) **ASA**: acide acétylsalicylique, **ExEth**: extrait éther diéthylique, **ExAgL** : extrait aglycone libre, **ExButOH**: extrait n-butanolique, **ExHét**: extrait hétérosidique.

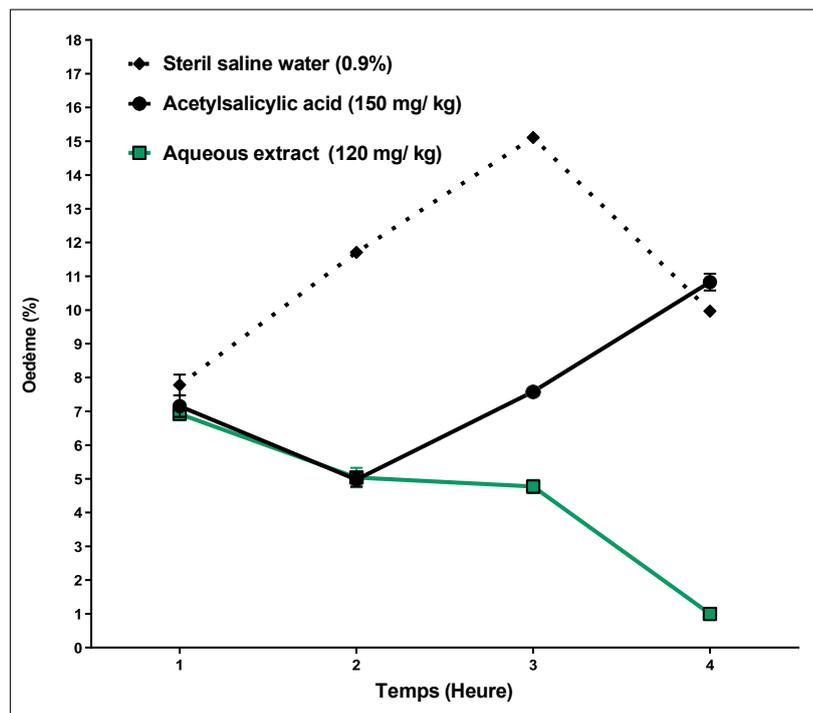
A l'issue des tests anti-inflammatoires, les résultats obtenus ont montré que parmi tous les extraits utilisés, seul l'infusé de plante administré à 120 mg/kg a entraîné une inhibition de la formation d'œdème à 41.91 % significativement supérieure à celle de l'agent anti-inflammatoire de référence (ASA) (31.41%).

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 23.** Evolution heure par heure du pourcentage d'œdème chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA.

	Doses (mg/kg)	1ère Heure	2ème Heure	3ème Heure	4ème Heure
<b>Témoin (Eau physiologique)</b>	-	7.78±0.31 <sup>NS</sup>	11.71±0.18**	15.11±0.17**	9.97±0.10 <sup>NS</sup>
<b>Acide acétylsalicylique (ASA)</b>	150	7.15± 0.32 <sup>NS</sup>	4.98± 0.21 <sup>NS</sup>	7.58± 0.18 <sup>NS</sup>	10.83± 0.25 <sup>NS</sup>
<b>Extrait aqueux</b>	120	6.92± 0.09 <sup>NS</sup>	5.04± 0.29 <sup>NS</sup>	4.77± 0.20 <sup>NS</sup>	1.00± 0.17**

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles), ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 comparé au groupe témoin.



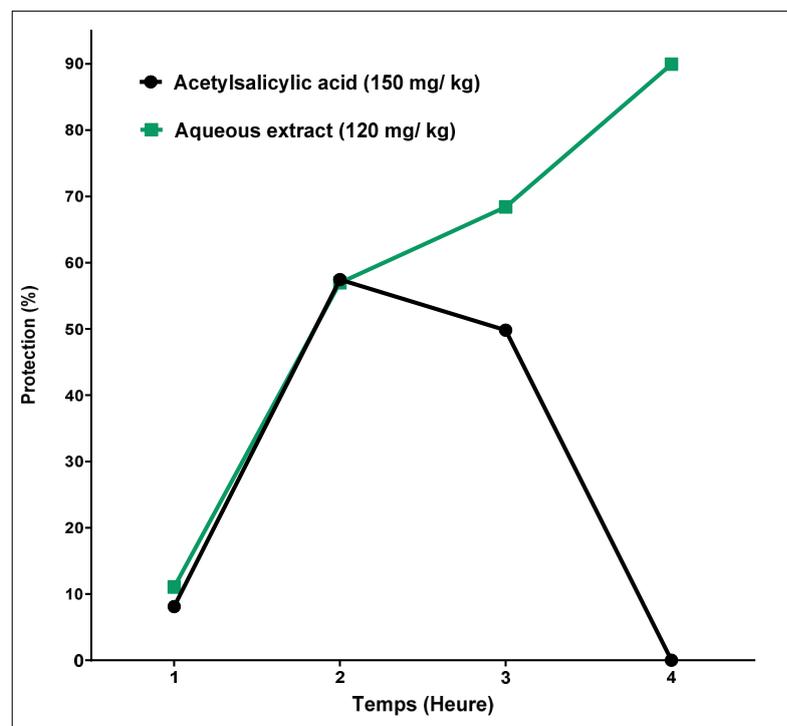
**Figure 36.** Evolution heure par heure du % d'œdème chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA. Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles).

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 24.** Evolution heure par heure du pourcentage de protection chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA.

		Pourcentage de protection (%)			
	Doses (mg/kg)	1ère Heure	2ème Heure	3ème Heure	4ème Heure
Acide acétylsalicylique	150	8.10± 0.32 <sup>NS</sup>	57.47± 0.21 <sup>NS</sup>	49.83± 0.18*	0± 0.25**
Extrait aqueux	120	11.05± 0.09 <sup>NS</sup>	56.96± 0.29 <sup>NS</sup>	68.43± 0.20*	89.97± 0.17**

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles), ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 comparé au groupe témoin.



**Figure 37.** Evolution heure par heure du pourcentage de protection chez les souris traitées par l'extrait aqueux et l'ASA.

La meilleure méthode d'évaluation de l'activité d'un nouvel agent anti-inflammatoire est sa capacité à réduire l'œdème local induit dans la patte des souris par l'injection d'un agent irritant (Ait El Cadi et al, 2012). La carragénine est un muco-polysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae (algues rouges), son administration provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques responsables du processus inflammatoire (Soro et al, 2015).

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

---

L'inflammation est un processus biphasique; la phase initiale est observée vers la première heure de l'injection de carragénine et attribuée à la libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine. La deuxième phase dite de gonflement est due principalement à la libération de prostaglandines ainsi que de protéases et de lysosomes au bout de la 2<sup>ème</sup> à la 3<sup>ème</sup> heure après l'injection de la carragénine (Brooks et Day, 1991; Morris, 2003), au cours de cette phase l'œdème est sensible aux agents anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (Soro et *al*, 2015).

L'effet anti inflammatoire de l'extrait aqueux de *T. nudatum* Del (120 mg/kg.pc) et de l'ASA (150 mg/kg.pc) a été évalué durant 4 heures. Une augmentation de protection a été enregistrée chez l'ASA (31.41±0.04%) et l'infusé (41.91±0.1%) correspondant à une diminution du diamètre de l'œdème à (7.64±0.04%) et (4.44±0.1%) respectivement. L'effet anti inflammatoire a atteint son maximum à la deuxième heure de l'expérimentation pour l'ASA (57.47±0.21%) et diminue jusqu'à disparition à la quatrième heure, tandis que pour l'extrait aqueux, l'effet continue d'augmenter jusqu'à la fin de l'expérience (89.97±0.17%). Cet effet pourrait être expliqué par la présence d'agents anti inflammatoires dans l'extrait aqueux de la plante, qui jouent le même rôle de l'indométacine (Soro et *al* 2015).

Selon Ajayi et *al* (2017) et Soro et *al* (2015), l'extrait aqueux de certaines plantes médicinales de la famille des Chénopodiacées possède des propriétés anti-inflammatoires importantes en raison de la présence de flavonoïdes, de polyphénols et de saponines, ces composés s'opposeraient à la formation de prostaglandines, de lysosomes et de protéases au niveau du site inflammatoire (Soro et *al*, 2015).

### **3.4. Test antalgique (test de Writhing) de *T. nudatum* Del chez les souris**

L'activité antalgique de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del a été évaluée par le biais du test Writhing en induisant une douleur à l'aide d'un stimulus chimique sur un modèle animal (souris).

Le **Tableau 25** et **Figure 38** représentent l'effet analgésique (pourcentage de protection) des différentes doses de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur le nombre de contorsions (crampes) provoquées par l'injection de l'acide acétique à 0.6%.

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 25.** Effet analgésique de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur les contractions abdominales chez les souris.

	Dose du produit (mg/kg de p.c)	Nombre de crampes	Protection (%)
<b>Témoin négatif</b>	-	32.17±2.36	-
<b>Paracétamol</b>	100	8.83±2.51	<b>72.54</b>
<b>Infusé</b>	40	4.8±2.18	45.3
	80	2.7±1.73	<b>69.8</b>
	120	3.0±1.48	66.0
<b>ExHét</b>	100	2.17±2.17	<b>75.47</b>
	300	3.50±3.09	60.38
	500	3.33±4.44	62.26
<b>ExAgL</b>	100	18.17±7.35	0.0
	300	20.83±9.59	0.0
	500	24.00±4.96	0.0
<b>ExButOH</b>	100	2.17±1.11	<b>75.47</b>
	300	2.83±1.07	67.92
	500	2.00±0.52	<b>77.36</b>
<b>ExtEth</b>	100	1.17±0.71	<b>86.79</b>
	300	1.33±0.91	<b>84.91</b>
	500	1.83±1.60	<b>79.25</b>

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=6 (3 mâles et 3 femelles), ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 comparées au groupe témoin. **ExEth**: extrait éther diéthylique, **ExAgL** : extrait aglycone libre, **ExButOH**: extrait n-butanolique, **ExHét**: extrait hétérosidique.

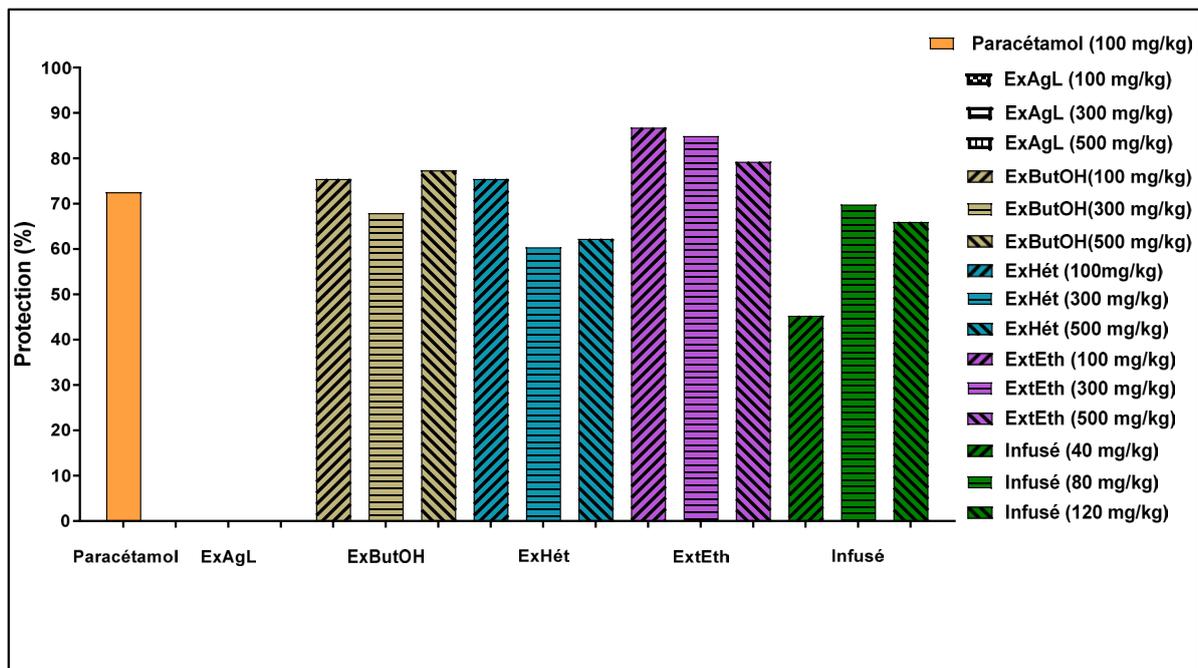
Au bout de 15 min après l'injection de l'acide acétique, on décompte environ 32.17±2.11 crampes pour le lot sans traitement (Eau physiologique) contre 8.83±2.26 pour le lot traité au paracétamol soit une protection de 72.54%.

En présence de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del à différentes doses, nous remarquons généralement une nette diminution du nombre de crampes abdominales par rapport au témoin négatif (Eau physiologique).

En comparant le pourcentage de protection des différents extraits de plante à celui du témoin Paracétamol, nous remarquons que plusieurs extraits présentent une meilleure protection. Il s'agit de: l'ExEth (100, 300 et 500 mg/kg) avec 86.79% 84.91% et 79.25% de

## Chapitre III : Résultats et discussion

protection respectivement ; l'ExHét et ExButOH (100 mg/kg) avec 75.47%, et enfin l'ExButOH (500 mg/kg) avec 77.36% de protection. A noter que l'infusé (80 mg/kg) présente une protection moindre (69.8%) mais très proche de la valeur standard (72.54%). Cependant, le reste des extraits ont enregistré un effet moindre que celui du Paracétamol allant de 45.3% à 67.92%. Enfin, l'extrait d'aglycones (ExAgL) avec ses différentes doses n'a donné aucun effet analgésique.



**Figure 38.** Effet analgésique de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur les contractions abdominales chez les souris. **ExEth:** extrait éther diéthylique, **ExAgL :** extrait aglycone libre, **ExButOH:** extrait n-butanolique, **ExHét:** extrait hétérosidique.

L'acide acétique met en jeu les mécanismes périphériques de la douleur (Collier et al, 1968; Hasan et al, 2010) en induisant la libération de nombreux médiateurs chimiques tels que l'histamine, les prostaglandines (PGE<sub>2</sub> $\alpha$ , PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ), la sérotonine et la bradykinine. Ces médiateurs ont été mis en évidence en proportions élevées dans les exsudats péritonéaux de rongeurs après injection d'acide acétique (Kouakou et al, 2010). Le paracétamol agirait sur les mécanismes de la douleur en intervenant dans la biosynthèse de prostaglandines (Vane et Ferreira, 1979) ; ainsi l'infusé et les trois extraits phénoliques (ExEth, ExButOH et ExHét) de *T. nudatum* Del aux différentes doses pourraient avoir un effet inhibiteur sur la libération des médiateurs impliqués dans la douleur périphérique, probablement par l'inhibition de l'activité ou de la synthèse des prostaglandines. Ces résultats concordent avec ceux d'Ibironke et Ajiboye (2007) qui ont mis en exergue l'effet analgésique de certaines plantes médicinales de

## Chapitre III : Résultats et discussion

la famille des chénopodiacées, qui pourrait être attribué à la présence des composés phénoliques, flavonoïdes et tanins.

### 3.5. Activité antimicrobienne de *T. nudatum* Del

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des quatre extraits phénoliques (l'ExEth, l'ExAgL, l'ExButOH et l'ExHét) vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*), et de deux souches de levures (*Candida albicans* et *Candida dubliniensis*) a été réalisée, et les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition comparé à celui de l'antibiotique de référence (Gentamycine) (**Tableau 26**).

Afin d'éliminer les biais statistiques d'un potentiel effet inhibiteur des solvants d'extractions phénoliques (méthanol, éther et butanol), des disques imprégnés de ces solvants ont été incubés avec les différentes souches microbiennes ; aucun effet inhibiteur de croissance n'a été enregistré sur aucune des souches.

**Tableau 26.** Effet antimicrobien des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur les souches bactériennes et fongiques.

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	Gentamycine	ExHét	ExAgL	ExButOH	ExEth
<i>E.coli</i>	22 ±0	6.66±5.77 **	3±5.20 ***	18 ±2.65	9.67 ±1.53
<i>B.subtilis</i>	29 ±0	0 ±0**	0 ±0***	18.33 ±2.08	9 ±2
<i>P.aeruginosa</i>	27 ±0	2.67 ±4.62 **	2 ±3.46 ***	19.67 ±2.08	10 ±2.65
<i>S.aureus</i>	14 ±0	9.33±0.58 **	0 ±0***	19.33 ±0.58	8 ±2
<i>C.albicans</i>	0 ±0	0 ±0**	0 ±0***	26.33 ±1.53	10 ±0
<i>C.dubliensis</i>	0 ±0	0 ±0**	0 ±0***	25 ±1	10 ±0

Les valeurs sont des moyennes±écart-type, n=3, ns: non significatif, \*p<0.05; \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001 comparées au groupe témoin, **ExEth**: extrait éther diéthylique, **ExAgL** : extrait aglycone libre, **ExButOH**: extrait n-butanolique, **ExHét**: extrait hétérosidique.

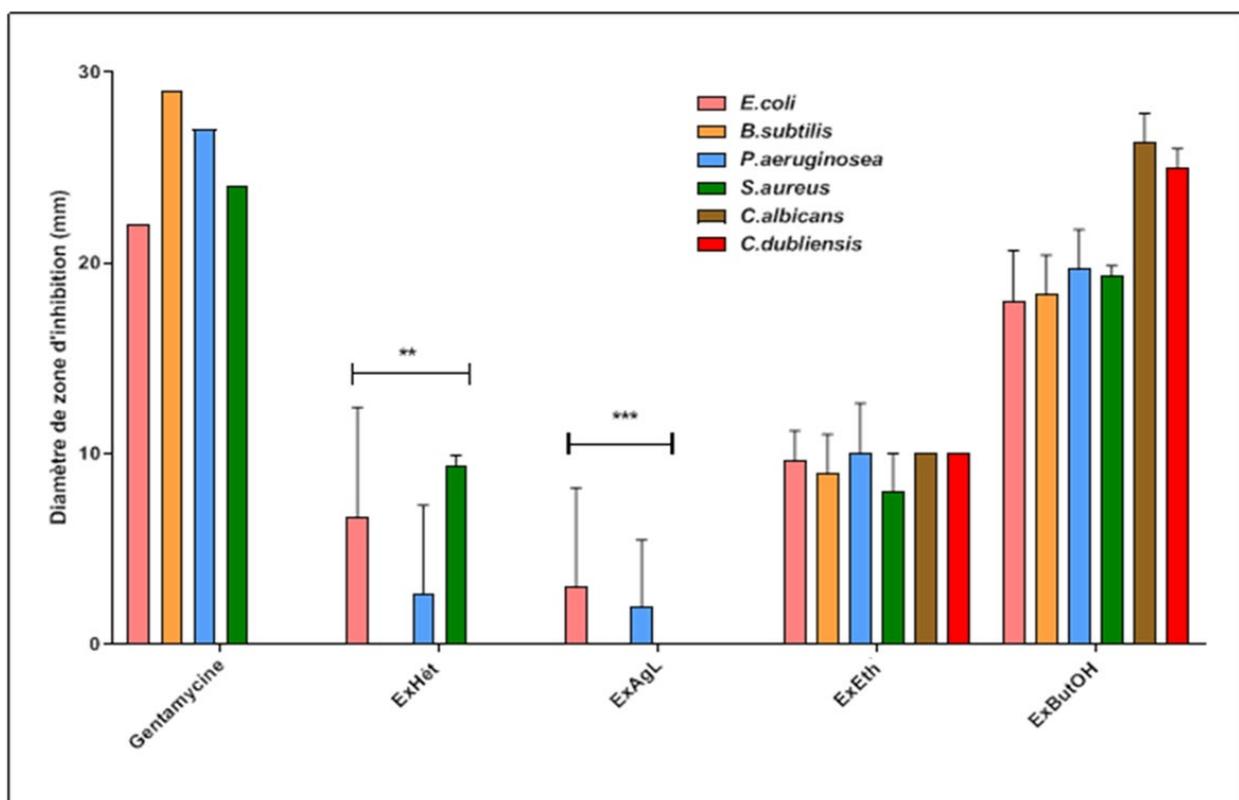
Les résultats du **Tableau 26** montrent que les extraits phénoliques de *T. nudatum* Del engendrent des zones d'inhibition variables selon les microorganismes testés.

En tenant en compte l'effet de la Gentamycine comme antibiotique de référence, les extraits ExHét et ExAgL sont ceux qui ont présenté les zones d'inhibition les moins importantes avec des valeurs allant de 0±0 mm à 9.33±0.58 mm pour les espèces bactériennes et sans aucun effet vis-à-vis des espèces fongiques. Cependant, l'ExEth et surtout l'ExButOH ont présenté une activité remarquable vis-à-vis de tous les microorganismes utilisés (**Figure**

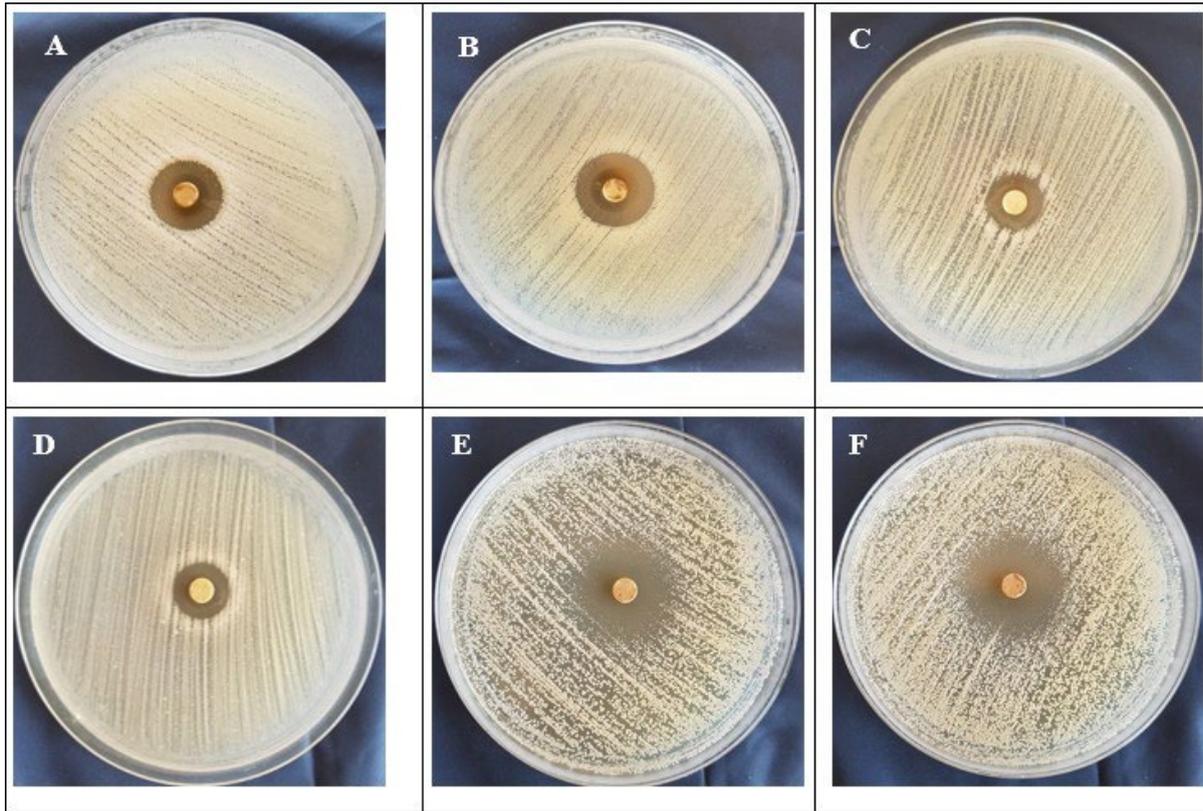
### Chapitre III : Résultats et discussion

39, 40). En effet, ces extraits ont engendré des zones d'inhibition vis-à-vis des espèces bactériennes significativement plus élevées que celles des autres extraits phénoliques (allant de  $8 \pm 2$  à  $10 \pm 2.65$  mm pour l'ExEth et de  $18.33 \pm 2.08$  à  $19.67 \pm 2.08$  mm pour l'ExButOH), ainsi qu'une activité fongicide plus importante et meilleure que la Gentamycine ( $10 \pm 0$  mm pour l'ExEth et de  $25 \pm 1$  à  $26.33 \pm 1.53$  mm pour l'ExButOH).

Le diamètre des zones d'inhibition traduit la sensibilité d'une souche bactérienne ou fongique vis-à-vis d'un composé anti-microbien. Selon Ouattara et *al* (2013), un diamètre de zone d'inhibition dépassant 10 mm traduit une sensibilité de la souche envers l'extrait utilisé. Dans cette étude, l'ExButOH et l'ExEth ont produit des zones d'inhibition intéressantes supérieures à 10 mm avec un meilleur effet statistiquement significatif pour l'ExButOH.



**Figure 39.** Effet antimicrobien des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur les souches bactériennes et fongiques. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart-type,  $n=3$ , ns: non significatif,  $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$  et  $***p<0.001$  comparées au groupe témoin, **ExEth**: extrait éther diéthylique, **ExAgL**: extrait aglycone libre, **ExButOH**: extrait n-butanolique, **ExHét**: extrait hétérosidique.



**Figure 40.** Zones d'inhibition de l'ExButOH vis-à-vis des souches microbiennes. (A: *S.aureus* ; B: *P.aeruginosa* ; C: *B.subtilis* ; D: *E.coli* ; E: *C.dubliensis* ; F: *C.albicans*).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) nous a permis non seulement de confirmer les résultats de l'activité antibactérienne, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par l'ExButOH sur chaque souche bactérienne (**Tableau 27**). Selon Marmonier (1990), si le rapport CMB/CMI  $\leq 4$  l'extrait étudié possède un effet bactéricide, si le rapport CMB/CMI  $\geq 4$  l'extrait possède un effet bactériostatique. Par conséquent, nous pouvons conclure que l'ExButOH exerce un effet bactéricide sur *P. aeruginosa*, *B.subtilis* et *E. coli* et un effet bactériostatique sur *S. aureus* (**Figure 41**).

## Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 27. Effet bactéricide/bactériostatique de l'ExButOH sur les souches bactériennes.

	ExButOH			Effet de l'extrait
	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMB/CMI	
<i>E.coli</i>	70	70	1	Bactéricide
<i>B.subtilis</i>	140	70	2	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i>	62	62	1	Bactéricide
<i>S.aureus</i>	140	3.5	40	Bactériostatique

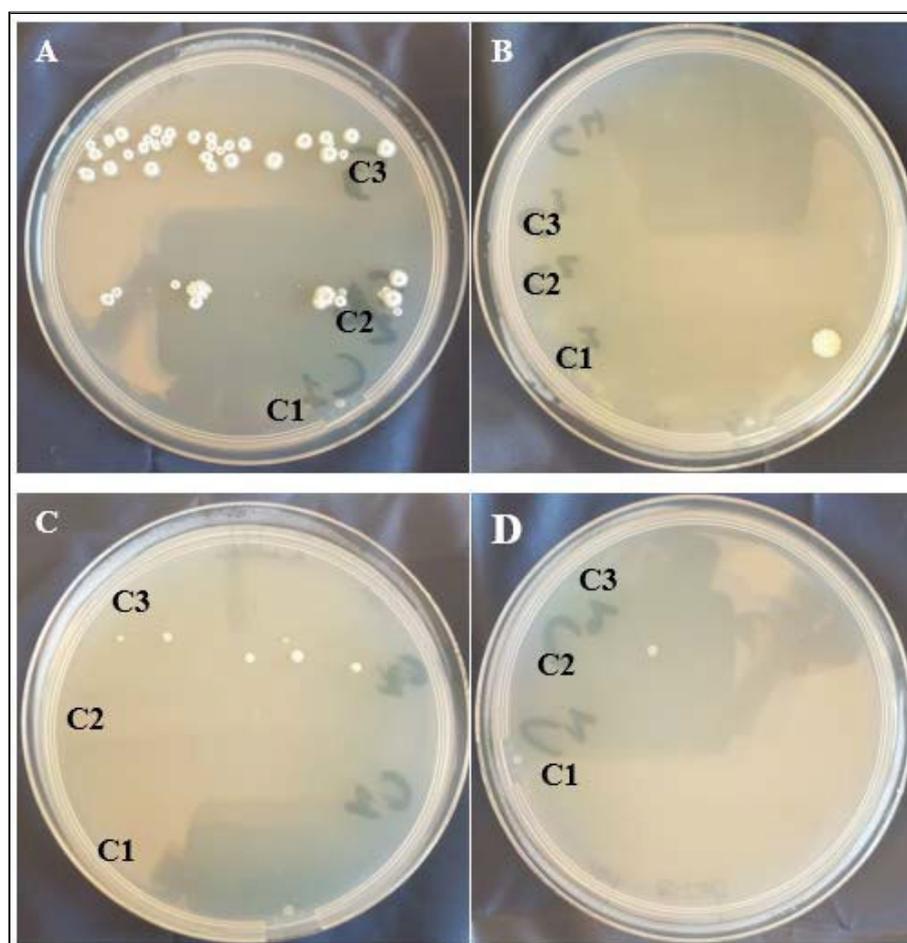


Figure 41. Evaluation de la CMB/CMI de l'ExButOH vis-à-vis des souches bactériennes. (A: *S.aureus* ; B: *P.aeruginosa* ; C: *B.subtilis* ; D: *E.coli*).

Les présents résultats confirment le potentiel antimicrobien des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del et corroborent les travaux de Pandey et Gupta (2014) qui ont démontré que l'extrait méthanolique de l'*Album chenopodium* de famille des Chénopodiaceae inhibe la

## Chapitre III : Résultats et discussion

croissance de certaines souches bactériennes telles que *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*. Ces résultats sont confortés également par les travaux de Mouderas et al (2019) et Tefiani et al 2020 sur le large spectre de l'effet antibactérien et antifongique de *T. nudatum* Del, et ceci grâce à sa richesse en composés phénoliques tels que les flavonoïdes comme la quercétine et le kaempférol, ces derniers sont bien connus pour leur potentiel anti-bactérien (Macé et al. 2017 ; Reddy et al. 2014).

### 3.6. Activité leishmanicide de *T. nudatum* Del sur les formes promastigotes

Dans cette partie du présent travail, un criblage primaire a été effectué afin de déterminer l'effet leishmanicide des quatre extraits phénoliques de *T. nudatum* Del à la concentration de 125 µg/ml. Puis en second lieu, un criblage secondaire des extraits les plus inhibiteurs de la croissance leishmanienne a été réalisé en utilisant une série de concentrations afin de déterminer l'IC50.

#### 3.6.1. Criblage primaire des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del

La sensibilité des trois souches parasitaires vis-à-vis des extraits phénoliques testés a été comparée à celle du médicament de référence : le Gucantime® (**Tableau 28**).

**Tableau 28.** Criblage primaire de l'effet leishmanicide des quatre extraits phénoliques de *T. nudatum* Del.

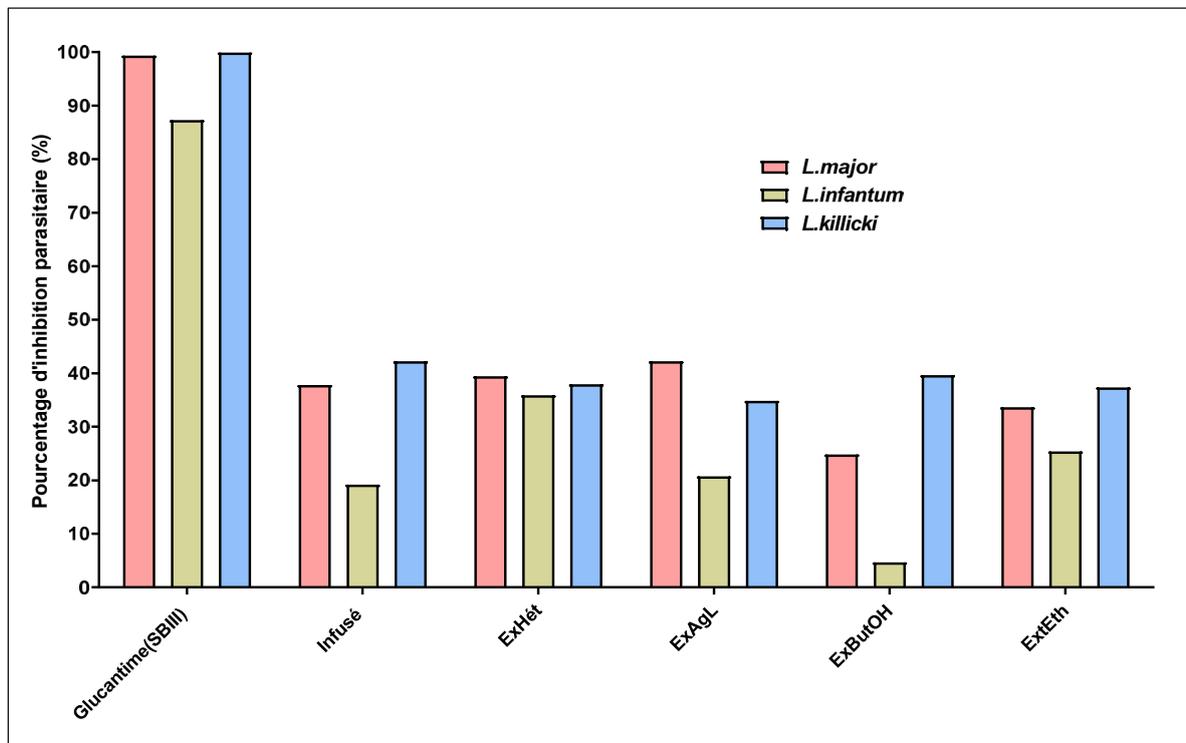
	Pourcentage d'inhibition des espèces parasitaires (%)		
	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. killicki</i>
<b>Témoin négatif</b>	-	-	-
<b>Glucantime®</b>	<b>99.33</b>	<b>87.31</b>	<b>99,91</b>
<b>Infusé</b>	37.80	19.20	<b>42.23</b>
<b>ExHét</b>	39.41	<b>35.91</b>	37.94
<b>ExAgL</b>	<b>42.23</b>	20.74	34.85
<b>ExButOH</b>	24.80	4.64	39.66
<b>ExtEth</b>	33.65	25.39	37.34

*ExEth*: extrait éther diéthylique, *ExAgL* : extrait aglycone libre, *ExButOH*: extrait n-butanolique, *ExHét*: extrait hétérosidique.

Les résultats du **Tableau 28** montrent des pourcentages variables d'inhibition des trois espèces de *Leishmania* vis-à-vis des différents types d'extraits de *T. nudatum*. L'ExAgL, l'ExHét et l'infusé sont ceux qui ont entraîné les taux d'inhibition les plus élevés vis-à-vis des

## Chapitre III : Résultats et discussion

souches *L. major*, *L. infantum* et *L. killicki* (42.23 %, 35.91% et 42.23%) respectivement. Toutefois les taux d'inhibition des souches restent bien inférieurs à ceux du Glucantime dont l'efficacité plus élevée varie entre 87.31% à 99.91% (**Figure 42**).



**Figure 42.** Criblage primaire de l'effet leishmanicide des quatre extraits phénoliques de *T.nudatum* Del. *ExEth*: extrait éther diéthylique, *ExAgL* : extrait aglycone libre, *ExButOH*: extrait *n*-butanolique, *ExHét*: extrait hétérosidique.

### 3.6.2. Criblage secondaire des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del

Afin de calculer les concentrations inhibitrices médianes (IC<sub>50</sub>) des extraits phénoliques ayant donné les meilleurs effets leishmanicides au criblage primaire, un criblage secondaire de l'effet leishmanicide a été réalisé avec une série de concentrations (150, 250, 500, 1000, et 2000 µg/ml) de l'ExHét vis-à-vis de *L. major* ; de l'ExAgL vis-à-vis de *L. infantum* et enfin de l'infusé vis-à-vis de *L. killicki* (**Figure 43, 44, 45, Tableau 29**).

## Chapitre III : Résultats et discussion

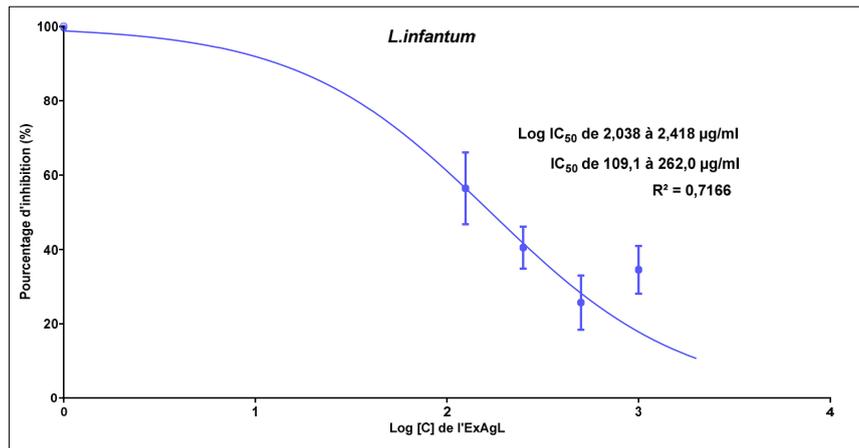


Figure 43. Courbe d'inhibition et  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'ExAgL vis-à-vis de *L. infantum*.

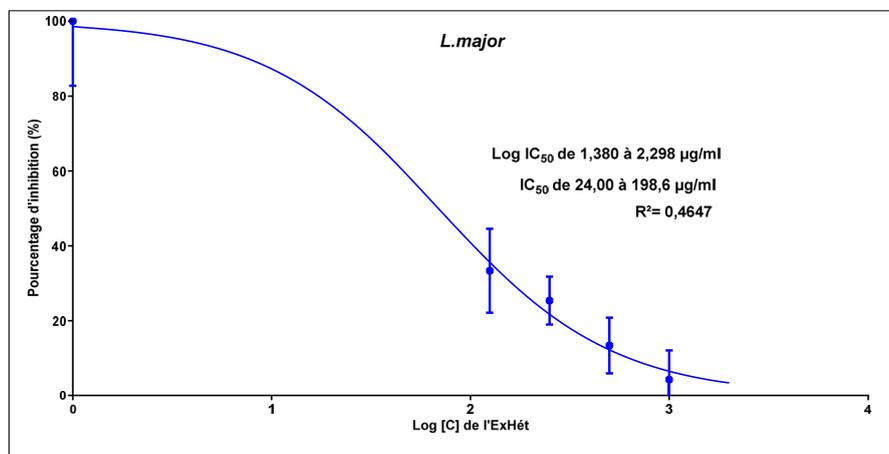


Figure 44. Courbe d'inhibition et  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'ExHét vis-à-vis de *L. major*.

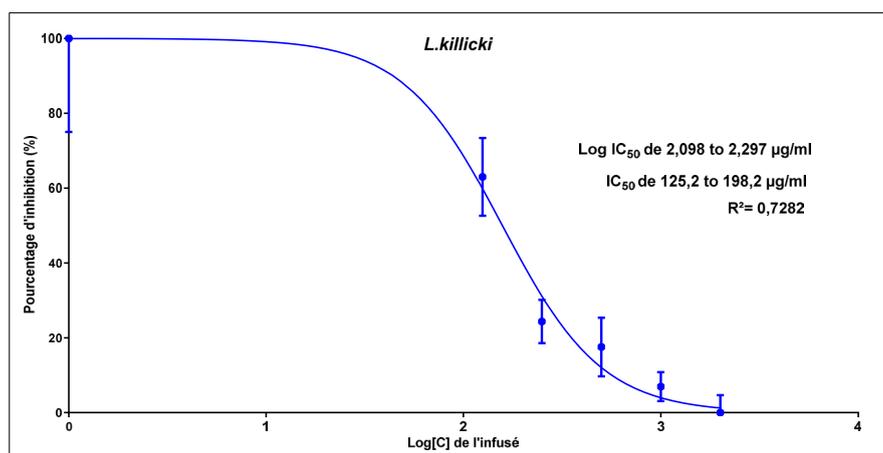


Figure 45. Courbe d'inhibition et  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'infusé de vis-à-vis de *L. killicki*.

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 29.** IC 50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del.

Extrait phénolique/espèce de <i>Leishmania</i>	Valeur IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	R <sup>2</sup>
ExHét/ <i>L. major</i>	24 à 198.6	0.4647
Infusé/ <i>L. killicki</i>	125.2 à 198.2	0.7282
ExAgL/ <i>L. infantum</i>	109.1 à 262	0.7166

Les résultats du **Tableau 29**; **Figure 43, 44 et 45** montrent des valeurs d'IC50 variables au sein du même extrait, allant de 24 à 198.6 $\mu\text{g/ml}$  pour l'ExHét, de 109.1 à 262  $\mu\text{g/ml}$  pour l'ExAgL et de 125.2 à 198.2  $\mu\text{g/ml}$  pour l'infusé avec des coefficients de corrélation R<sup>2</sup> de 0.4647, 0.7166 et 0.7282 respectivement.

Les variations des valeurs d'IC 50 peuvent être expliquées par la technique utilisée pour le comptage des parasites. En effet, le comptage visuel sur lames peut engendrer certaines erreurs conduisant à des écarts-type importants qui lors du calcul statistique de l'IC 50 ont engendré des écarts de calcul de ce dernier avec des coefficients de corrélation R<sup>2</sup> relativement bas, d'où l'intérêt d'utiliser des techniques de comptage automatisés comme la spectrophotométrie par la coloration MTT et qui n'étaient malheureusement pas disponible au laboratoire.

Cela dit, les valeurs d'IC50 restent en deçà de la DL50 calculée pour la toxicité aiguë *in vivo* (qui dépassait 6000 mg/kg), et donc peuvent présenter un intérêt thérapeutique en l'absence du médicament utilisé (Glucantime®) surtout que les espèces testées sont endémiques en Algérie (Arezki et al, 2021). En effet, la plante *Artemesia herba-alba* Asso de la famille des Asteraceae, largement utilisée dans la médecine traditionnelle maghrébine a montré une activité leishmanicide vis-à-vis de deux espèces de *Leishmania* à savoir *L.tropica* et *L.major* (Hatimi et al, 2001). De même, des extraits chloroformiques d'*Ampelocera eden-tula* Kuhl (Ulmacées) et de *Pera benensis* (Euphorbiacées), plantes employées dans le traitement de la leishmaniose cutanée, se sont montrées actives vis-à-vis des formes promastigotes des *Leishmania* sp. à des concentrations allant de 10 à 50  $\mu\text{g/ml}$  (Fournet et al, 1992 ; Fournet et al, 1994). Ce qui met en exergue la grande importance de la phytothérapie par les plantes en général, et par des molécules bioactives en particulier dans le traitement, la prévention et la lutte contre les leishmanioses cutanées causées par les différentes espèces du genre *Leishmania*.

*Chapitre IV*  
*Conclusion et*  
*perspectives*

## ***Chapitre IV : Conclusion et perspectives***

---

Ce présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques du sud Algérien utilisées en médecine traditionnelle. Cette thèse englobe un travail de recherche mené conjointement au Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides (LRZA) de l'Université d'Alger et au Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie sur la plante *Traganum nudatum* Delile de la famille des Chénopodiacées, largement utilisée en médecine traditionnelle par la population locale.

L'objectif de la présente thèse était en premier lieu de valider l'utilisation de *Traganum nudatum* Del dans la médecine traditionnelle par l'étude biologique de différents effets antimicrobiens, anti parasitaires, anti-inflammatoires et enfin antalgiques de la partie aérienne de la plante, puis de tenter pour la première fois d'induire des réactions morphogénétiques *in vitro* de la partie aérienne par la callogenèse afin de réaliser une étude comparative phytochimique quantitative et qualitative avec la plante naturelle.

Sur le plan biotechnologique, les explants végétatifs de la partie aérienne de *T.nudatum* Del se sont révélés les parties idéales pour initier la multiplication *in vitro* de la plante, cette multiplication a été permise par une composition du milieu dont les constituants hormonaux qui sont la 2,4-D, l' ANA et la kinetine ont pu engendrer le taux de cals le plus important par la différenciation des amas cellulaires en embryons somatiques et des repiquages mensuels afin de maintenir l'état juvénile des cals. Cela dit, d'autres combinaisons de phytohormones et de macro éléments doivent être mis au point afin d'optimiser la production de cals.

Du point de vue pharmacologique, nous avons procédé à l'évaluation de la toxicité aiguë et des activités pharmacologiques à savoir anti-inflammatoires, antalgiques, antimicrobiennes et antiparasitaires de l'infusé et des quatre extraits polyphénoliques (ExEth, ExButOH, ExAgL et ExHét) de la partie aérienne de *T. nudatum* Del. L'étude de la toxicité aiguë chez les souris a montré que l'infusé peut être classé comme extrait de très faible toxicité voire non toxique avec une DL50 supérieure à 6000 mg/kg.

L'étude microbiologique a montré que l'extrait n-butanolique a révélé un effet antifongique significatif sur *Candida*, bactéricide sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, et enfin, un effet bactériostatique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Les activités biologiques étudiées ont permis de mettre en exergue le potentiel remarquable anti inflammatoire et antalgique de l'infusé qui ont généralement dépassé l'effet des molécules de référence utilisées (Aspirine et Paracétamol). L'effet positif des différentes

## ***Chapitre IV : Conclusion et perspectives***

---

doses sur les animaux de laboratoire évoque leurs compositions en substances actives capables d'agir sur les médiateurs communs à l'inflammation, la fièvre et au processus douloureux comme l'histamine et les prostaglandines. Enfin, les résultats de l'effet anti parasitaire de l'infusé et des extraits phénoliques de *T. nudatum* Del sur 3 espèces de *Leishmania* endémiques en Algérie ont révélé un potentiel inhibiteur certes de moindre effet par rapport à la molécule de référence (Glucantime) mais qui ne reste pas moins intéressant vu l'innocuité des extraits de plante et leur IC50 relativement basse.

Sur le plan phytochimique, en plus de l'infusé obtenu selon la méthode traditionnelle afin de vérifier son innocuité, l'extraction des composés phénoliques contenus dans la plante a été réalisée selon trois protocoles différents utilisant plusieurs solvants ce qui a permis l'obtention de quatre extraits phénoliques : l'extrait éther diéthylique (ExEth) contenant les flavones-flavonols et les acides phénoliques, l'extrait n-butanolique (ExButOH) contenant les anthocyanes et C-glycosides, l'extrait hydro-alcoolique (ExHét) contenant les hétérosides flavoniques et enfin l'extrait des aglycones libre (ExAgL).

Pour la caractérisation chimique de ces mélanges complexes, nous avons mis en œuvre différentes techniques d'analyse en fonction du but recherché et cela, à partir du matériel végétal *in situ* et celui induit *in vitro*:

- L'analyse qualitative par UPLC, a mis en évidence de nombreux composés phénoliques, dont la narcissoside, l'acide vanillique, le kaempférol, la rutine, la fisétine, l'acide gallique, la lutéoléine, en plus de la quercétine et de l'acide salicylique qui ont été détectés et quantifiés par la technique d'UPLC-PDA-MS.

- L'analyse qualitative par GC-MS a permis d'identifier plusieurs composés appartenant à la classe des acides gras, tels que l'acide palmitique, l'acide béhénique et l'acide docosahexaénoïque (EPA) qui ont été détectés et quantifiés par la technique de GC-FID-MS. Décrits dans la littérature, ces métabolites secondaires possèdent des activités et des effets biologiques très intéressants (activités anti microbiennes, antalgiques, anti diabétiques... etc).

A la lumière des résultats obtenus, il est clair que de par sa richesse en métabolites secondaires *T. nudatum* Del possède des propriétés pharmacologiques dont certaines ont pu être scientifiquement prouvés pour la première fois confirmant et validant ainsi son emploi dans la pharmacopée traditionnelle par la population locale. Cela dit, la poursuite des études et recherches sur d'autres propriétés pharmaco-dynamiques devraient être entreprises en parallèle aux études chimiques afin d'isoler les molécules bioactives et d'éluder leur mécanisme d'action et *in fine* de pouvoir produire ces molécules *in vitro* grâce à la callogénèse.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- Abrie, A. L., & van Staden, J. (2001). Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla. *Plant Growth Regulation*, 33(1), 19–23. <https://doi.org/10.1023/A:1010725901900>
- Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., & Hsu, M. J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 739–742. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400028>
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00695-5](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00695-5)
- Ahmed, O. H., Hamad, M. N., & Jaafar, N. S. (2017). Phytochemical investigation of Chenopodium Murale (family: Chenopodiaceae) cultivated in Iraq, isolation and identification of scopoletin and gallic acid. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(11), 70–77. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20504>
- Ait El Cadi, M., Makram, S., Ansar, M., Khabbal, Y., Alaoui, K., Faouzi, M. A., Cherrah, Y., & Taoufik, J. (2012). Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de Zygophyllum gaetulum. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 70(2), 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2011.11.004>
- Ajayi, A. M., Tanayen, J. K., Magomere, A., & Ezeonwumelu, J. O. C. (2017). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of Chenopodium opulifolium schrad leaves. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(1), 14–21. <https://doi.org/10.5455/jice.20161229055924>
- Akerele, O. ., Heywood, V., & Synge, H. (1991). *Conservation of Medicinal Plants* (O. Akerele, V. Heywood, & H. Synge (Eds.)). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511753312>
- Akhani, H., Edwards, G., & Roalson, E. H. (2007). Diversification of the old world Salsoleae s.l. (Chenopodiaceae): Molecular phylogenetic analysis of nuclear and chloroplast data sets and a revised classification. *International Journal of Plant Sciences*, 168(6), 931–956. <https://doi.org/10.1086/518263>
- Akroum, S., Satta, D., & Lalaoui, K. (2009). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some algerian plants. *European Journal of Scientific Research*, 31(2).
- Alberts, B., Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1989). *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion Médecine- Science.
- Alessandri, J. M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aïd, S., Poumès-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., & Laviaille, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: Evolution of concepts and nutritional implications throughout life. In *Reproduction Nutrition Development* (Vol. 44, Issue 6). <https://doi.org/10.1051/rnd:2004063>
- Al Hussein, R., & A. El-Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Ali, A., Javaid, A., & Shoaib, A. (2017). GC-MS analysis and antifungal activity of methanolic root extract of chenopodium album against sclerotium rolfsii. *Planta Daninha*, 35. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100046>
- Ali Kalla. (2012). *Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : Pituranthos scoparius, Rantherium adpressum et Traganum nudatum*. Université Mentouri Constantine.

## Références bibliographiques

---

- Allaoui, M., Cheriti, A., Chebouat, E., Dadamoussa, B., & Gherraf, N. (2016). comparative study of the antioxidant activity and phenols and flavonoids contents of the ethyl acetate extracts from two saharan chenopodacea: *Haloxylon scoparium* and *Traganum nudatum*. *Algerian Journal of Arid Environment*, 71, 71–79.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Andersson, C., Hallberg, A., & Hogberg, T. (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances in Drug Research*, 28, 180. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-51174>
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., & Cabras, P. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530–3535. <https://doi.org/10.1021/jf049913t>
- Arpino, M., Prevot, J., Serpinet, J., Tranchant, A., Vergnol, P., & Witier, A. (1995). *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Masson.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6). <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1467s>
- Auge, R., Beauchesne, G., Boccon, G., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, C., Reynoirdj, P., Strullud, G., & Vidalie, H. (1989). *La culture in-vitro et ses application horticoles*. Editions Lavoisier.
- Babaamer, Z. Y., Sakhri, L., Al-Jaber, H. I., Al-Qudah, M. A., & Abu Zarga, M. H. (2012). Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(12). <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.733700>
- Badawneh, M., Aljamal, J., Alsehli, B. R., & Daradka, H. M. (2017). antidiabetic effect of ethanolic extract of *Traganum nudatum* on alloxan induced diabetics wistar rats. *IJBPAS*, 6(5), 918–930.
- Bagnouls, F., & Gaussen, H. (1954). Saison sèche et indice xérothermique. *Revue de Géographie de Lyon*, 29(3), 269–269.
- Baborun, T. (1997). Substances naturelles actives La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research*, 83–94. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1395824](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1395824)
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bao Ning, S., Pawlus, A. D., Jung, H. A., Keller, W. J., McLaughlin, J. L., & Kinghorn, A. D. (2005). Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 68(4), 592–595. <https://doi.org/10.1021/np0495985>
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: Molecular mechanisms. In *Clinical Science* (Vol. 94, Issue 6). <https://doi.org/10.1042/cs0940557>
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 37, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bauer, J. E. (2007). Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. In *Journal of the American Veterinary Medical Association* (Vol. 231, Issue 11).

## Références bibliographiques

---

- <https://doi.org/10.2460/javma.231.11.1657>
- Baumann, H., Stearn, W., & Stearn, E. (1993). *The Greek Plant World in Myth, Art and Literature*. Timber press.
  - Bellakhdar, J. (2006). *Plantes médicinales au Maghreb et soins de base-Précis de phytothérapie moderne* (Le fenec).
  - Benghanem, A. (2009). *Etude écologique des formations à Acacia tortilis ssp raddiana dans la région de Béni-Abbès (Wilaya de Béchar)*. USTHB.
  - Benhassine, I. Ouafi, S. Eras, J. Harrat, Z. Bouslama, Z. Canela-Garayoa, R. (2021). Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Phytochemical Study of Traganum nudatum Delile. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (3): 1-22.
  - Bisoli, E., Garcez, W. S., Hamerski, L., Tieppo, C., & Garcez, F. R. (2008). Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of combretum laxum. *Molecules*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/molecules13112717>
  - Bittrich, V., & Amaral, M. D. C. E. (1991). Proanthocyanidins in the testa of centrospermous seeds. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19(4), 319–321. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(91\)90020-Z](https://doi.org/10.1016/0305-1978(91)90020-Z)
  - Bommineni, V. R., & Jauhar, P. P. (1996). Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Science*, 116(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)84541-9](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)84541-9)
  - Boudaakkar, M. (2020, October). *La médecine arabe au Moyen Âge | Apprendre l'arabe avec DILAP*. <https://dilap.com/la-medecine-arabe-au-moyen-age/>
  - Bouhadjra, K. (2005). *Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes Oudneya africana RBr et Aristida pungens L*. Université Abou-bekr Belkaid.
  - Boumaza, D. (2011). *Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : Inula viscosa et Rosmarinus officinalis de la région d'Oran*. Université d'Oran.
  - Boumlik, M. (1995). *Systématique des spermaphytes*. Office des publications universitaires.
  - Boxus, P., Bercetche, J., Bollon, H., Ducos, J., Jemmali, A., Pâques, M., Petiard, V., & Amiot, M. (2006). Multiplication végétative micropropagation et embryogenèse somatique . In *Biotechnologies végétales* (CNED AUPELF-UREF, pp. 191–191).
  - Brar, K. ., Sandhu, B. ., & Gosal, S. . (1998). Tissue culture response of cultivated and wild cotton species. *Crop Improvement Society*, 25(1), 59–65.
  - Brat, P., Georgé, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., & Amiot, M. J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition*, 136(9). <https://doi.org/10.1093/jn/136.9.2368>
  - Brimson, J. M., Onlamoon, N., Tencomnao, T., & Thitilertdecha, P. (2019). Clerodendrum petasites S. Moore: The therapeutic potential of phytochemicals, hispidulin, vanillic acid, verbascoside, and apigenin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109319. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109319>
  - Brito, A. M. G., Dos Santos, D., Rodrigues, S. A., Brito, R. G., & Xavier-Filho, L. (2013). Plants with anti-Leishmania activity: Integrative review from 2000 to 2011. *Pharmacognosy Reviews*, 7(13), 34–41. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112840>
  - Bruneton, J. (1999). *Les tanins*. Edition Médicinales Internationales .
  - Bruneton, Jean. (2009). *Pharmacognosie: Phytochimie plantes médicinales* (4ème édition). Technique & Documentation Lavoisier.

## Références bibliographiques

---

- Calhoun, W., Chang, J., & Carlson, R. P. (1987). Effect of selected antiinflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF and carrageenan induced paw edema in the mouse. *Agents and Actions*, 21(3–4). <https://doi.org/10.1007/BF01966499>
- Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R. S., Filho, V. C., & Yunes, R. A. (2000). Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research*, 14(6), 401–418. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200009\)14:6<401::aid-ptr762>3.3.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200009)14:6<401::aid-ptr762>3.3.co;2-8)
- Camefort, H. (1972). Morphologie des végétaux vasculaires. Cytologie, Anatomie, Adaptions. In Doin (Ed.), *Feddes Repertorium* (Issues 9–10). <https://doi.org/10.1002/fedr.19730840912>
- Carolin, R. C., Jacobs, S. W. L., & Vesk, M. (1975). Leaf structure in Chenopodiaceae. *Bot.Jahrb.Sys.*, 95.
- Cartier, O., & Roux-Sitruk, D. (2007). *Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie* (Cahiers du préparateur en pharmacie - Les Editions Porphyre (Ed.)).
- Castillo, D., Arevalo, J., Herrera, F., Ruiz, C., Rojas, R., Rengifo, E., Vaisberg, A., Lock, O., Lemesre, J. L., Gornitzka, H., & Sauvain, M. (2007). Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 410–414. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.025>
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., & Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, 62(6). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00713-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00713-6)
- Chabrier, J.-Y. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie* [Université Henri Poincaré]. <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>
- Chan-Bacab, M. J., & Peña-Rodríguez, L. M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. In *Natural Product Reports* (Vol. 18, Issue 6). <https://doi.org/10.1039/b100455g>
- Chandrasekaran, M., Kannathasan, K., & Venkatesalu, V. (2008). Antimicrobial activity of fatty acid methyl esters of some members of chenopodiaceae. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 63(5–6), 331–336. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-5-604>
- Chandrasekaran, M., Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. (2011). (12) (PDF) Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 775–780. [https://www.researchgate.net/publication/51512946\\_Antibacterial\\_and\\_antifungal\\_efficacy\\_of\\_fatty\\_acid\\_methyl\\_esters\\_from\\_the\\_leaves\\_of\\_Sesuvium\\_portulacastrum\\_L](https://www.researchgate.net/publication/51512946_Antibacterial_and_antifungal_efficacy_of_fatty_acid_methyl_esters_from_the_leaves_of_Sesuvium_portulacastrum_L)
- Charrière, F., Sotta, B., Miginiac, É., & Hahne, G. (1999). Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(10), 751–757. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)86688-7](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)86688-7)
- Chehema, A., & Djebar, M. R. (2008). Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien: distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Synthèse: Revue Des Sciences et de La Technologie*, 17, 36–45. <https://www.ajol.info/index.php/srst/article/view/117860>
- *Chenopodiaceae*. (n.d.). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset. Retrieved May 14, 2021, from <https://www.gbif.org/fr/species/6719>
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 72). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

## Références bibliographiques

---

- Cieřlik, E., Gręda, A., & Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.015>
- Collier, H. O., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 32(2), 295–310. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>
- Compton, M. E., Pierson, B. L., & Staub, J. E. (2001). Micropropagation for recovery of *Cucumis hystris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1). <https://doi.org/10.1023/A:1010645206280>
- Cooper, G. (1999). *LA CELLULE. Une approche moléculaire de Geoffrey-M Cooper - Poche - Livre - Decitre*. De Boeck Université. <https://www.decitre.fr/livres/la-cellule-9782744500565.html>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Crete, P. (1960). Précis de botanique. vol. 2. Systématique des angiospermes. In *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* (Vol. 49, Issue 8). Edition Masson & Cie Tome II PARIS. <https://doi.org/10.1002/jps.3030490826>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Dadáková, E., Vrchotová, N., Třířka, J., & Děkanová, Z. (2013). Content of phenolic substances in the selected species of the Chenopodiaceae family. *Journal of Agrobiology*, 30(2), 127–135. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153165960>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Daikh, H., & Demarly, Y. (1987). Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits*, 42(10), 593–596. <https://revues.cirad.fr/index.php/fruits/article/view/34947>
- Dal Vesco, L. L., & Guerra, M. P. (2001). The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1), 19–25. <https://doi.org/10.1023/A:1010635926146>
- Daradka, H., Aljohani, H., Alotaib, M., Khabour, O., Eskandrani, A., Alsharif, S., & Al-shdefat, R. (2020). Protective effects of *Traganum nudatum* against oxidative DNA damage in human lymphocytes. 25(02), 1–8. [https://www.researchgate.net/publication/339599937\\_Protective effects of Traganm nudatum against oxidative DNA damage in human lymphocytes](https://www.researchgate.net/publication/339599937_Protective_effects_of_Traganm_nudatum_against_oxidative_DNA_damage_in_human_lymphocytes)
- Das, B., Tarana, F., Qazi, A. M., JMA, H., Rajib, B., & Biplab, K. Das. (2013). Antinociceptive and Anti-inflammatory Activity of the Bark Extract of *Plumeria rubra* on Laboratory Animals. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(1), 114–126. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2013/1026>
- David, J., Satoskar, A., Brombacher, F., Shoemaker, C., Titus, R., & Boza, M. (1997). Immunomodulatory properties of maxadilan, a peptidederived from sand fly saliva. *Acta Parasitol Turcica*, 21, 174–174.
- Davies, P. . (1988). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. In *The Quarterly Review of Biology* (Vol. 63, Issue 2). University of Chicago Press. <https://doi.org/10.1086/415875>
- De Padua, L. ., Bunyaphatsara, N., & Lemmens, R. (1999). *Plant Resources of South-East*

## Références bibliographiques

---

- Asia* (Vol. 12). Backhuys Publishers.
- Demarly, Y., & Sibi, M. (1996). *Amélioration des plantes et biotechnologie*. John Libbey Eurotext.
  - Depeint\*, F., Gee, J. M., Williamson, G., & Johnson, I. T. (2002). Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(1), 97–103. <https://doi.org/10.1079/pns2001133>
  - Deysson, Y., & Mascré, M. (1951). *Classification des plantes vasculaires* (Tome II). société d'édition et d'enseignement supérieur .
  - Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. In *Life Sciences* (Vol. 65, Issue 4, pp. 337–353). [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)
  - Diezi, J. (1989). Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. In *Pharmacologie: des principes fondamentaux aux applications thérapeutiques* (pp. 33–44). Slatkine.
  - Djennane, S., & Klifatti, A. (1996). *Etude de quelque facteur influençant la tubérisation in vitro de trois variétés de pomme de terre*. INA.
  - Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
  - Djuric, Z., Severson, R. K., & Kato, I. (2012). Association of dietary quercetin with reduced risk of proximal colon cancer. *Nutrition and Cancer*, 64(3), 351–360. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.658950>
  - Djyh, G., Adeoti, M., Djaman, A., Guede Guina, F., & Sess, E. (2010). Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait total aqueux d'écorces de *Mansonia altissima* (BOIS BÊTE) chez les souris. *Journal of Science of Pharmacology Biology*, 11(2), 13–20.
  - Drabu, S., Chaturvedi, S., & Sharma, M. (2012). Analgesic activity of methanolic extract from the fruits of *Trichosanthes Dioica*. *International Journal of Research and Pharmaceutical Biomedical Science*, 3, 399–405.
  - Dubois, J. (1989). *Biotechnologie Et Amélioration Des Plantes Plantes vivrières tropicales*. Aupelf-Uree John Libbey Eurotext .
  - Dugowson, C. E., & Gnanashanmugam, P. (2006). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 17(2), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2005.12.012>
  - Duraffourd, C., Lapraz, J. C., & Chemli, R. (1997). La plante médicinale de la tradition à la science 1er congrès Intercontinental –Tunis- de l'usage empirique à la phytothérapie clinique. *1er Congrès Intercontinental –Tunis- de l'usage Empirique à La Phytothérapie Clinique*, 222-undefined.
  - Durand, G., Guesnet, P., Chalon, S., Alessandri, J., Rizkalla, S., & Lebranchu, Y. (2002). Importance nutritionnelle des acides gras polyinsaturés. In M. Roberfroid (Ed.), *Aliments Fonctionnels* (pp. 193–219). Tec & Doc-Lavoisier.
  - El Rhaffari, L., & Zaid, A. (2002). Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilale) Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. In J. Fleurentin, J. M. Pelt, G. Mazars, & J. C. Leiosne (Eds.), *Des sources du savoir aux médicaments du futur actes du 4e congrès européen d'ethnopharmacologie* (pp. 293–318).
  - Elyasi, H., Sepahvand, A., Rahimi, H., Nafari, A., Azizi, S., Khadem, E., Zamani, A., Behnaminia, N., & Bahmani, M. (2019). Fatty Acids and Herbal Medicine. *Current Traditional Medicine*, 5(3), 246–256. <https://doi.org/10.2174/2215083805666190514082338>

## Références bibliographiques

---

- Eras, J., Ferran, J., Perpiña, B., & Canela, R. (2004). Chlorotrimethylsilane, a reagent for the direct quantitative analysis of fats and oils present in vegetable and meat samples. *Journal of Chromatography A*, 1047(1), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.014>
- Ernst, E. (1998). Harmless herbs? A review of the recent literature. In *American Journal of Medicine* (Vol. 104, Issue 2, pp. 170–178). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00397-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00397-5)
- Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. (2002). In *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264071018-fr>
- Evans, D.A., Sharp, W. ., & Flick, C. . (1989). *Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis*. Academic Press, 1981. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301316438>
- Evans, David A. (1989). Somaclonal variation - Genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics*, 5(C), 46–50. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90021-8)
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 29–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29>
- Fan, F. Y., Sang, L. X., Jiang, M., & McPhee, D. J. (2017). Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22030484>
- Farnsworth, N. R., & Kaas, C. J. (1981). An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 3(1), 85–99. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(81\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(81)90014-3)
- Farnsworth, N. R., & Soejarto, D. D. (2010). Global Importance of Medicinal Plants. In *Conservation of Medicinal Plants* (pp. 25–52). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511753312.005>
- Ferry, M., Bouguedoura, N., & El Hadrami, I. (1998). Patrimoine génétique et technique de propagation in-vitro pour le développement de la culture du palmier dattier. *Oasis Sécheresse*, 9(2), 139–146.
- Fortes, A. M., & Pais, M. S. (2000). Organogenesis from internode-derived nodules of humulus lupulus var. Nugget (Cannabinaceae): Histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany*, 87(7), 971–979. <https://doi.org/10.2307/2656996>
- Fotso, M., Omokolo Ndoumou, D., & Mbouna, D. (2002). Comparative study of *in vitro* regeneration of *Cola anomala* and *C. acuminata*. *Cahiers d'études et de Recherche Francophone: Agricultures*, 11(5), 355–360. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2003003083>
- Fournet, A., Barrios, A. A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P., & Bruneton, J. (1994). Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 8(3), 174–178. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650080312>
- Fournet, Alain, Angelo, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., & Cavé, A. (1992). Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 159–164. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90074-2)
- Gaurav, K., Karthik, L., & Rao, K. V. B. (2013). Phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extract of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schult. Stem

## Références bibliographiques

---

- (Amaranthaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(3), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60020-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60020-6)
- Gbenou, J., Ahounou, J., Ladouni, P., Agbodjogbe, W., Tossou, R., Dansou, P., & Moudachirou, M. (2011). Propriétés anti-inflammatoires des extraits aqueux de *Sterculia setigera* Delile et du mélange *Aframomum melegueta* K. Schum – *Citrus aurantifolia* Christm et Panzer. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 634–641. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i2.72128>
  - Geneive, E., Momin, R. A., Nair, M. G., & Dewitt, D. L. (2002). Antioxydant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2231–2234. <https://doi.org/10.1021/jf0114381>
  - George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. De. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd edition. In *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
  - Golan-Goldhirsh, A., Hankamer, B., & Lips, S. H. (1990). Hydroxyproline and proline content of cell walls of sunflower, peanut and cotton grown under salt stress. *Plant Science*, 69(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90101-S](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90101-S)
  - Goodwin, T. ., & Mercer, E. . (1990). *Introduction to Plant Biochemistry, Second Edition* (2nd ed.). Pergamon.
  - Gori, Z., & Tebbale, H. (2014). *Impact de différents modes de conservation sur les caractéristiques biochimiques de quelques Plantes spontanées médicinales*. université Kasdi Merbah .
  - Gueye, B., Herve, J., Sané, D., Borgel, A., Aberlenc-bertossi, F., & Verdail, J. (2008). Les cellules végétales compétentes à se réactiver constituent des cibles privilégiées du 2,4-D | Request PDF. *Actes Cu Colloque "Biotechnologies Végétales et Gestion Durable Des Résistances Face à Des Stress Biotiques et Abiotiques*. [https://www.researchgate.net/publication/281098964\\_Les\\_cellules\\_vegetales\\_competentes\\_a\\_se\\_reactiver\\_constituent\\_des\\_cibles\\_privilegiees\\_du\\_24-D](https://www.researchgate.net/publication/281098964_Les_cellules_vegetales_competentes_a_se_reactiver_constituent_des_cibles_privilegiees_du_24-D)
  - Guignard, J. (1996). *Biochimie végétale*. Masson.
  - Guignard, J. (2000). *Biochimie végétale* (2ème édition). Dunod.
  - Guignard, J., & Dupont, F. (2004). *Botanique : systématique moléculaire* (13eme édition). Masson.
  - Haicour, R. (2002). *Biotechnologie végétale technique de laboratoire*. Tec et Doc Montréal AUF.
  - Hakman, I., & Arnold, S. Von. (1985). Plantlet Regeneration through Somatic Embryogenesis in *Picea abies* (Norway Spruce). *Journal of Plant Physiology*, 121(2), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80040-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80040-7)
  - Halfaoui, Y. (2010). *Valorisation des deux espèces d'Atriplex (Atriplex halimus L. et Atriplex canescens Purch Nutt) par la culture des tissus in vitro*. Université d'Oran.
  - Hamdani, F. Z. (2001). *Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le Scorpiurus*. Université de Chlef.
  - Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. In *Journal of natural products* (Vol. 5, Issue 8). International Centre for Science and High Technology.
  - Hannweg, K., Watt, M. P., & Berjak, P. (1996). A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 37(3), 213–218.

## Références bibliographiques

---

- Hao, L., Mou, Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L., Wang, M., Wang, D., Han, J., Yu, Z., & Yang, F. (2010). Flavonoids from halostachys caspica and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, 15(11), 7933–7945. <https://doi.org/10.3390/molecules15117933>
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical Methods : A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. second ed.,. In *Chapman and Hall*. Chapman and Hall.
- Harborne, Jeffrey B., Boardley, M., Fröst, S., & Holm, G. (1986). The flavonoids in leaves of diploid Triticum species (Gramineae). *Plant Systematics and Evolution*, 154(3–4), 251–257. <https://doi.org/10.1007/BF00990127>
- Harborne, Jeffrey B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. In *Phytochemistry* (Vol. 55, Issue 6, pp. 481–504). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hasan Raquibul, S. M., Jamila, M., Majumder, M. M., Akter, R., Hossain, M., Mazumder, E. H., Alam, A., Jahangir, R., Rana, S., Arif, & Rahman, S. (2009). Analgesic and antioxidant activity of the hydromethanolic extract of Mikania scandens (L.) Willd. leaves. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2009.1.7>
- Hasan, S. M. ., Hossain, M. M., Akter, R., Jamila, M., Mazumder, M. E. H., Alam, M. A., Faruque, A., Rana, S., & Rahman, S. (2010). Analgesic activity of the different fractions of the aerial parts of Commelina benghalensis Linn. *International Journal of Pharmacology*, 6(1), 63–67. <https://doi.org/10.3923/ijp.2010.63.67>
- Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, N., Chaib, N., & Idrissi, N. (2001). Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne d'Artemisia herba-alba Asso. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, 94(1), 29–31.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96, Issues 2–3, pp. 67–202). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3–6. <https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8>
- Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>
- Hitoshi, M., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., & Tsuda, T. (2001). Orally administered Delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1546–1551. <https://doi.org/10.1021/jf001246q>
- Ho, H. Y., Liang, K. Y., Lin, W. C., Kitanaka, S., & Wu, J. Bin. (2010). Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of Eriobotrya japonica Lindl. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 588–592. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.009>
- Hobbie, L. J. (1998). Auxin: Molecular genetic approaches in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(1–2), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80094-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80094-6)
- Hollman, P. C.H., & Katan, M. B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 51(8), 305–310.

## Références bibliographiques

---

- [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(97\)88045-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(97)88045-6)
- Hollman, Peter C.H., Hertog, M. G. L., & Katan, M. B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1), 34–46. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(96\)00065-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(96)00065-9)
  - Hopkins, P. (2003). *Physiologie végétale* (2ème édition). De Boeck.
  - Hunskaar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)
  - Hurabielle, M., & Paris, M. (1980). *Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie)*. Masson.
  - Ibrionke, G. F., & Ajiboye, K. I. (2007). Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *International Journal of Pharmacology*, 3(1), 111–115. <https://doi.org/10.3923/ijp.2007.111.115>
  - Ighilhariz, H. Z. (2008). *Contribution à la valorisation d’Atriplex halimus L et Atriplex canescens (Pursh) Nutt par la culture in vitro*. Univ Oran Es-senia.
  - Iserin, P. (2001). *Larousse encyclopédie des plantes médicinales Identification Préparations soins* (2ème édition). Dorling Kindersley Limited.
  - Izri, A., Bendjaballah-Laliam, A., Sereno, D., & Akhouni, M. (2021). Updates on geographical dispersion of leishmania parasites causing cutaneous affections in algeria. *Pathogens*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030267>
  - Janićijević, J., Tošić, S., & Mitrović, T. (2007). Flavonoids in plants. *9th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions*, 156.
  - Jay-Allemand, C., Capelli, P., & Cornu, D. (1992). Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, 51(3–4), 335–342. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(92\)90132-V](https://doi.org/10.1016/0304-4238(92)90132-V)
  - Jesus, R. S., Piana, M., Freitas, R. B., Brum, T. F., Alves, C. F. S., Belke, B. V., Mossmann, N. J., Cruz, R. C., Santos, R. C. V., Dalmolin, T. V., Bianchini, B. V., Campos, M. M. A., & Bauermann, L. de F. (2018). *In vitro* antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.012>
  - Jorite, S. (2015). *La phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l’herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel* [Université Bordeaux 2]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01188820>
  - Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., & Stevens, P. (2002). *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. De Boeck université .
  - Julien, C. (2015). *Synthèse Totale d’Alcaloïdes Polyhydroxylés : la(–)-Swainsonine, la (+)-6-Épicastanospermine, la (+)-Castanospermine et la (–)-Détoxinine*. université Grenoble .
  - Kalili, K. M., & De Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, 34(8), 854–876. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000811>
  - Kalkhambkar, R. G., Kulkarni, G. M., Kamanavalli, C. M., Premkumar, N., Asdaq, S. M. B., & Sun, C. M. (2008). Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2178–2188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.08.007>
  - Karakas, F. P., Cingoz, G. S., & Turker, A. U. (2016). The effects of oxidative stress on phenolic composition and antioxidant metabolism in callus culture of common daisy. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), 34–41. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.6>

## Références bibliographiques

---

- Khaki, A., Nouri, M., Fathiazad, F., Ahmadi-Ashtiani, H. R., Rastgar, H., & Rezazadeh, S. (2009). Protective effects of Quercetin on spermatogenesis in streptozotocin- induced diabetic rat. *Journal of Medicinal Plants*, 8(SUPPL. 5), 57–64.
- Kherraze, M. E., Belhamra, M., & Grigore, M. N. (2018). Aspects of ecological anatomy of *Traganum nudatum* Del. (Amaranthaceae) from the northeast of the Algerian Sahara. *Acta Biologica Szegediensis*, 62(1), 25–36. <https://doi.org/10.14232/abs.2018.1.25-36>
- Kiehlbauch, J. A., Hannett, G. E., Salfinger, M., Archinal, W., Monserrat, C., & Carlyn, C. (2000). Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards gui Delines for disk diffusion susceptibility testing in New York State Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3341–3348. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3341-3348.2000>
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 229–245. <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X>
- Koek, M. M., Muilwijk, B., Van Der Werf, M. J., & Hankemeier, T. (2006). Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(4), 1272–1281. <https://doi.org/10.1021/ac051683+>
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 711–715. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- Koster, R., Anderson, M., & De Beer, E. J. (1959). Acetic Acid for Analgesic Screening. *Federation Proceedings*, 18, 412–417.
- Kouadio, J. Y., Koné, M., Djè, Y., D’Almeida, M. A., & Zouzou, M. (2004). L’étiolement est un facteur d’induction de l’embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d’Ivoire. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 8(3), 155–162.
- Kouakou, S., Kouakou, G., Dally Laba, I., & Brou, J. (2010). Evaluation de l’activité analgésique de l’extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiacées), une plante médicinale de Côte d’Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(2), 456–463. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v4i2.58153>
- Kougan, G. B., Tabopda, T., Kuete, V., & Verpoorte, R. (2013). Simple Phenols, Phenolic Acids, and Related Esters from the Medicinal Plants of Africa. In *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry* (pp. 225–249). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00006-0>
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Ab Delly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3–4), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.02.001>
- *La culture in vitro - Maxicours*. (n.d.). Retrieved May 14, 2021, from <https://www.maxicours.com/se/cours/la-culture-in-vitro/>
- *La science alimentaire de A à Z ADRIAN Jean, POTUS Jacques, FRANGNE Régine*. (n.d.). Retrieved May 9, 2021, from <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/la-science-alimentaire-de-a-a-z-3-ed/adrian/descriptif-9782743005689>
- Labeled, B., Gherraf, N., Hameurlaine, S., Ladjel, S., & Zellagui, A. (2010). The antibacterial activity of water extracts of *Traganum nudatum* Del (Chenopodiaceae) growing in Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 2(6), 142–145. <http://scholarsresearchlibrary.com/DPL-vol2-iss6/DPL-2010-2-6-142-145.pdf>
- Lachachi, S. (2010). *Organogénèse et embryogenèse somatique direct chez la tomate*. université

## Références bibliographiques

---

d'Oran.

- Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., & Boucher, M. (1967). Analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chemistry Analysis*, 49, 375–385.
- Legrand, P. (2009). Les acides gras. *Revue Litière Française*, 688, 14–19.
- Levy, L. (1969). Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sciences*, 8(11 PART 1), 601–606. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(69\)90021-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(69)90021-6)
- Li, R. W., Myers, S. P., Leach, D. N., Lin, G. D., & Leach, G. (2003). A cross-cultural study: Anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(1), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00336-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00336-7)
- Lima, L. A. R. dos S., Johann, S., Cisalpino, P. S., Pimenta, L. P. S., & Boaventura, M. A. D. (2011). *In vitro* antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona cornifolia* A.St.-Hil. (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6), 777–780. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000600024>
- Loredo-Carrillo, S. E., Santos-Díaz, M. de L., Leyva, E., & Santos-Díaz, M. D. S. (2013). Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), 312–318. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0161-y>
- Louisot, P. (1983). Lipide et dérivés isoprénique. In *Simep* (pp. 259–321). Simep. [https://www.lalibrairie.com/livres/biochimie-generale-et-medicale--introduction-chimique-a-la-biochimie-glucides-acides-nucleiques-vitamines-coenzymes-lipides-et-derives-isopreniques-amino-acides-peptides-proteines\\_0-791254\\_9782853343114.html](https://www.lalibrairie.com/livres/biochimie-generale-et-medicale--introduction-chimique-a-la-biochimie-glucides-acides-nucleiques-vitamines-coenzymes-lipides-et-derives-isopreniques-amino-acides-peptides-proteines_0-791254_9782853343114.html)
- Lozniewski, A., & Rabaud, C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. In *Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins CCLIN Sud-Est Nancy* (pp. 4-undefined).
- Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., & Biro, L. (2003). View of The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. 47(1), 119–125. <http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2358/2350>
- Lüttge, U., Kluge, M., & Bauer, G. (1992). *Botanique traité fondamental*. Techniques & Documentation Lavoisier .
- Macé, S., Truelstrup Hansen, L., & Rupasinghe, H. P. V. (2017). Anti-Bacterial Activity of Phenolic Compounds against *Streptococcus pyogenes*. *Medicines*, 4(2), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines4020025>
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes.
- Macheix, J. J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux: Quelles perspectives à la fin du XXème siècle? *Acta Botanica Gallica*, 143(6), 473–479. <https://doi.org/10.1080/12538078.1996.10515344>
- Magaji, M., Anuka, J., Abdu-Aguye, I., Yaro, A., & Hussaini, I. (2008). Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Securinega virosa* (Euphorbiaceae) in experimental animal models. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(2), 039–044. <https://www.menDeley.com/catalogue/be261bd9-724e-3f84-863a-13e0b69cb467/>
- Majouli, K., Hamdi, A., Msaada, K., & Kenani, A. (2017). A bioactivity guided study on the antibacterial activity of *Hertia cheirifolia* L. extracts. *Microbial Pathogenesis*, 106, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.015>

## Références bibliographiques

---

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Margara, J. (1984). *Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse*. INRA.
- Marmonier, A. (1990). Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In *Bactériologie Médicale Techniques Usuelles* (pp. 227–236).
- Marouf, A., & Reynaud, J. (2007). *La Botanique de A à Z*. Dunod .
- Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., & Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(4), 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(97\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00184-8)
- Meena, M., & Patni, V. (2008). Isolation and identification of flavonoid quercetin from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian Journal of Experimental Science*, 22, 137–142.
- Meher, B. R., Jena, J., & Rath, B. G. (2011). Evaluation of analgesic activity of ethanolic extract of *Sphaeranthus indicus*. *Der Pharmacia Lettre*, 3(3), 357–360.
- Mei, B., No, E. G., McWilliams, E. L., Gould, J. H., & Newton, R. J. (1997). *In vitro* regeneration of fourwing saltbush [*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.]. *Journal of Range Management*, 50(4), 413–418. <https://doi.org/10.2307/4003309>
- Meyer, S., Reeb, C., & Bosdeveix, R. (2008). *Botanique: Biologie et physiologie végétales* (2ème édition). Maloine.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 52, Issue 4, pp. 673–751).
- Morin, O. (2005). Trans fatty acids: New developments. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, 12(5–6), 414–421. <https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0414>
- Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 225, 115–121. <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7:115>
- Mouderas, F., El Hacı, I. A., & Lahfa, F. B. (2019). Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Traganum nudatum* Delile aerial parts organic extracts collected from Algerian Sahara's flora. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(3), 299–310. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00365-1>
- Moumou, Y., Trotin, F., Vasseur, J., Vermeersch, G., Guyon, R., Dubois, J., & Pinkas, M. (1992). Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus culture. *Planta Medica*, 58(6), 516–519. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961539>
- Moussaoui, F., Zellagui, A., Segueni, N., Touil, A., & Rhouati, S. (2010). Flavonoid Constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (OK) and Their Antimicrobial Activity. *Records of Natural Products*, 4(1), 91–95. [https://www.researchgate.net/publication/41391735\\_Flavonoid\\_Constituents\\_from\\_Algerian\\_Launaea\\_resedifolia\\_OK\\_and\\_Their\\_Antimicrobial\\_Activity](https://www.researchgate.net/publication/41391735_Flavonoid_Constituents_from_Algerian_Launaea_resedifolia_OK_and_Their_Antimicrobial_Activity)
- Moussard, C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique*. De Boeck Supérieur. <https://www.unitheque.com/biochimie-structurale-metabolique/lmd/de-boeck-superieur/Livre/1645>
- Mulas, M., & Mulas, G. (2004). *Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres Atriplex et opuntia dans la lutte contre la désertification*. Short And Medium - Term Priority Environmental Action Programme SMAP) Université Des Etudes De Sassari Groupe De Recherche Sur La Désertification.

## Références bibliographiques

---

- Multon, J. L. (1992). *Le sucre, les sucres, les edulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A.* Techniques et Documentation Lavoisier.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murray. (2011). *Biologie végétale amélioration structure fonctionnement écologie et biotechnologie*. Pearson éducation.
- Muwaffag, B., Jalal, A., Bandar, R. A., & Haytham, M. D. (2010). Antidiabetic effect of ethanolic extract of *Traganum nudatum* on alloxan induced diabetics wistar rats. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 6(5), 918–930. [https://www.researchgate.net/publication/316595089\\_Antidiabetic\\_effect\\_of\\_ethanolic\\_extract\\_of\\_Traganum\\_nudatum\\_on\\_alloxan\\_induced\\_diabetics\\_wistar\\_rats](https://www.researchgate.net/publication/316595089_Antidiabetic_effect_of_ethanolic_extract_of_Traganum_nudatum_on_alloxan_induced_diabetics_wistar_rats)
- Nabors, M. (2008). *Biologie végétale structure, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Pearson.
- Nabors, N. (2008). *Biologie végétale: structures fonctionnement écologie et biotechnologies*. Edition Pearson .
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 41, Issue 5, pp. 1523–1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. In *Indian Journal of Pharmacology* (Vol. 33, Issue 1, pp. 2–16).
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., & Scaccini, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79(1), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00213-3)
- Nisar, M., Shah, H., Khan, I., Fazal-Ur-Rehman, Khan, M. S., Marwat, S. K., Niazi, Z. R., & Ullah, A. (2013). Antimicrobial potential and phytochemical investigation of fixed oil of plant *Chenopodium ambrosioides* linn. *Asian Journal of Chemistry*, 25(2), 1069–1072. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.13439>
- Norreel, B. (1973). Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. *Bulletin de La Société Botanique de France*, 120, 71–97. <https://doi.org/10.1080/00378941.1973.10839194>
- Norris, S. (2005). *Les gras trans : Le fardeau pour la santé*. Library of Parliament PRB 05-21F.
- Oates, J. A., Wood, A. J. J., Brooks, P. M., & Day, R. O. (1991). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs — Differences and Similarities. *New England Journal of Medicine*, 324(24), 1716–1725. <https://doi.org/10.1056/nejm199106133242407>
- Ogbonnia, S., Adekunle, A. A., Bosa, M. K., & Enwuru, V. N. (2008). Evaluation of acute and subacute toxicity of *Alstonia congensis* Engler (Apocynaceae) bark and *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) fruits mixtures used in the treatment of diabetes. *African Journal of Biotechnology*, 7(6), 701–705. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i6.58499>
- Ogle, D. ., St. John, L., & Tilley, D. (2012). Plant Guide for fourwing saltbush (*Atriplex canescens*). In *USDANatural Resources Conservation Service, Aberdeen*, . ID Plant Materials Center 83210-0296.
- Ouafi, S. (2007). *Contribution à l'étude biochimique du Palmier dattier, analyse des polyphénols des folioles de palme de cultivars du Phoenix dactylifera L Dans un but chimiotaxonomique*. USTHB.

## Références bibliographiques

---

- Ouattara, K., Doumbia, I., Touré, A., Djaman, A. J., & Coulibaly, A. (2013). Activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (*Morinda*, Rubiaceae) sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytotherapie*, 11(3), 172–177. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0780-z>
- Ould El Hadj, M., Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional Est). *Courrier Du Savoir*, 3, 47–51.
- Oyvind M. Andersen, & Kenneth R. Markham. (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (Taylor & Francis gr...). <https://www.routledge.com/Flavonoids-Chemistry-Biochemistry-and-Applications/Andersen-Markham/p/book/9780849320217>
- Ozenda, P. (1958). *Flore du Sahara septentrionales et centre*. Centre National de la Recherche Scientifique .
- Ozenda, P. (1977). *Flore du Sahara*. Centre national de la recherche scientifique .
- Pandey, A. K., Singh, P., Palni, U. T., & Tripathi, N. N. (2013). Application of *Chenopodium ambrosioides* Linn. essential oil as botanical fungicide for the management of fungal deterioration in pulses. *Biological Agriculture and Horticulture*, 29(3), 197–208. <https://doi.org/10.1080/01448765.2013.822828>
- Pandey, S., & Gupta, R. K. (2014). Screening of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Chenopodium album* (Bathua). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(33), 1–9. <https://www.menDeley.com/catalogue/c034506c-aebb-3248-8a2a-1ba7c13af3fb/>
- Paolini, V., Bergeaud, J. P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 113(3–4), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00064-5)
- Patel, B. D., Shekhar, R., Sharma, P., Singh, A., Tyagi, S., Singh, R., & Shakya, Y. (2010). Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Scindapsus officinalis* (Roxb.) Schott. Fruit in Experimental Animal Mo Dels. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 158– 161.
- Paume, M. (2009). *Sauvages et toxiques: Plantes des bois des prés et des jardins*. EditionEdisud.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Perini, R., Fiorucci, S., & Wallace, J. L. (2004). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury and repair: A window of opportunity for cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 18(4), 229–236. <https://doi.org/10.1155/2004/890585>
- Porter, L. J. (1985). Number- and Weight-Average Molecular Weights for Some Proanthocyanidin Polymers (Condensed Tannins). *Australian Journal of Chemistry*, 39(4), 557–562. <https://doi.org/10.1071/CH9860557>
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and pro Delphinidins to cyanidin andDelphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- Proestos, C., & Komaitis, M. (2013). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by rp-hplc coupled to diode array detector (Dad) and gc-ms after silylation. *Foods*, 2(1), 90–99. <https://doi.org/10.3390/foods2010090>
- Raffeneau- Delile, A. (1813). Flore d’Egypte. Explication des planches. In *Description de l’Egypte ... Histoire Naturelle* (Vol. 2, pp. 145–320).

## Références bibliographiques

---

- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2000). *Biologie végétale* (6ème édition). De Boeck.
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J. M., & Mattila, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, *120*(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod.
- Richter, R. (1993). *Métabolisme des végétaux: Physiologie et biochimie*. Presses polytechnique et universitaires romandes.
- Roberts, M. ., & Wink, M. (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Press, 233 Spring Street.
- Rosidah, Yam, M. F., Sadikun, A., Ahmad, M., Akowuah, G. A., & Asmawi, M. Z. (2009). Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, *123*(2), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.011>
- Ruckebusch, Y. (1981). *Physiologie pharmacologie thérapeutique animale*. Edition Maloine.
- Russell, W., & Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, *70*(3), 389–396. <https://doi.org/10.1017/s0029665111000152>
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., & Said, O. (2006). Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *3*(4), 433–439. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel058>
- Saadi, A. (1991). *Régénération de plantes de pois *Pisum sativum L* par embryogenèse somatique*. Grignon.
- Samal, A. E., Simon, Z., Nyochembeng, L., Tambong, T., Nezana, X., & Wutah, J. (1998). Culture in-vitro et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Cameroune. *Cahier Agriculture*, *7*, 63–66.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y. K., Sagna, M., Trouslot, M. F., Duval, Y., & Borgel, A. (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, *98*(2), 301–308. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl104>
- Santarem, E. R., Pelissier, B., & Finer, J. J. (1997). Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *33*(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0034-6>
- Savary, S., Trompier, D., Andreoletti, P., Le Borgne, F., Demarquoy, J., & Lizard, G. (2012). Fatty Acids - Induced Lipotoxicity and Inflammation. *Current Drug Metabolism*, *13*(10), 1358–1370. <https://doi.org/10.2174/138920012803762729>
- Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *dicliptera verticillata*, 2 International Journal of Pharmacology 435 (2006). <https://doi.org/10.3923/ijp.2006.435.438>
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Schmid, J., & Keller, E. (1984). Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantesles cultures de tissus et de cellules. *Revue Suisse d'Agriculture*, *13*(6), 265–272.
- Sekkoum, K., Belboukhari, N., & Cheriti, A. (2014). New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launea arborescens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(4), 267–271. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C708>

## Références bibliographiques

---

- Semiria, L. (2013). *Contribution à l'amélioration de l'Atriplex halimus par la culture de tissus In vitro*. Université d'Oran.
- Silbemagi, S., & Lang, F. (2000). *Atlas de poche de physiopathologie* (1ere édition). Flammarion Médecine-Sciences.
- Sim, K. S., Sri Nurestri, A. M., Sinniah, S. K., Kim, K. H., & Norhanom, A. W. (2010). Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. *Pharmacognosy Magazine*, 6(21), 67–70. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.59969>
- Simonin, G. (2006). *La culture in vitro*. . Dossier de synthèse INRA.
- Simopoulos, A., & Robinson, J. (1998). *The Omega Plan The Medically Proven Diet That Gives You the Essential Nutrients You Need*. Harper Collins .
- Slade, D., Ferreira, D., & Marais, J. P. J. (2005). Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*, 66(18 SPEC. ISS.), 2177–2215. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.002>
- Sofic, E., Copra-Janicijevic, A., Salihovic, M., Tahirovic, I., & Kroyer, G. (2010). Screening of medicinal plant extracts for quercetin-3-rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 2(2), 97–102. <https://doi.org/10.5958/j.0975-4261.2.2.015>
- Soro, T., Néné-bi, A., Zahoui, O., Yapi, A., & Traore, F. (2015). Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). In *Journal of Animal & Plant Sciences* (Vol. 24). <http://www.m.elewa.org/JAPS;ISSN2071-7024>
- Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytotherapie*, 14(1), 44–57. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1024-9>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. In *Journal of Separation Science* (Vol. 30, Issue 18, pp. 3268–3295). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54(3), 237–256. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00091-1)
- Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., & Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 967, Issue 1, pp. 85–113). J Chromatogr A. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00037-7)
- Street, H. E. (1977). *Culture in-vitro cytologie organogénèse plant tissu and cell culture*(2ème édition). Oxford London.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 1965–1969. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1965>
- Talamali, A., Bajji, M., Le Thomas, A., Kinet, J. M., & Dutuit, P. (2003). Flower architecture and sex determination: How does *Atriplex halimus* play with floral morphogenesis and sex genes? *New Phytologist*, 157(1), 105–113. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00651.x>
- Tefiani, I., Lahbib Seddiki, S. M., & Mahdad, M. Y. (2021). *In vitro* activities of *Traganum nudatum* and *Mentha pulegium* extracts combined with amphotericin B against *Candida albicans* in production of hydrolytic enzymes. *Current Medical Mycology*, 6(3), 27–32. <https://doi.org/10.18502/CMM.6.3.4499>
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., & Khetani, V. (2002). A 90-day

## Références bibliographiques

---

- oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 179(3), 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00338-4)
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
  - Touil, Y. S., Auzeil, N., Boulinguez, F., Saighi, H., Regazzetti, A., Scherman, D., & Chabot, G. G. (2011). Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), 1731–1739. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.097>
  - Touitou, Y. (1993). *Pharmacologie Diplôme d'Etat d'Infirmier (e)* (7eme édition).
  - Tourte, Y. (1998). *Génie Génétique Et Biotechnologie concepts et méthodes Applications à l'agronomie et aux bio-industries*. Edition Dunod.
  - *Traganum-nudatum*. (n.d.). Retrieved May 14, 2021, from [http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2020/images/Traganum\\_nudatum4.jpg](http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2020/images/Traganum_nudatum4.jpg)
  - *Traganum nudatum* Delile. (n.d.). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset. Retrieved May 14, 2021, from <https://www.gbif.org/fr/species/3760351>
  - Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
  - Van Dijk, A. E., Olthof, M. R., Meeuse, J. C., Seebus, E., Heine, R. J., & Van Dam, R. M. (2009). Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care*, 32(6), 1023–1025. <https://doi.org/10.2337/dc09-0207>
  - Vane, J., & Ferreira, S. (1979). *Anti-Inflammatory Drugs* (1st ed., Vol. 50). Springer-Verlag Berlin Hei Delberg.
  - Vasilenko, A., McDaniel, J. K., & Conger, B. V. (2000). Ultrastructural analyses of somatic embryo initiation, development and polarity establishment from mesophyll cells of *Dactylis glomerata*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(1), 51–56. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0012-8>
  - Viala, A., & Botta, A. (2007). *Toxicologie* (2ème édition). Lavoisier .
  - Villas-Bôas, S. G., Smart, K. F., Sivakumaran, S., & Lane, G. A. (2011). Alkylation or silylation for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS? *Metabolites*, 1(1), 3–20. <https://doi.org/10.3390/metabo1010003>
  - Vinoth Prabhu, V., Nalini, G., Chidambaranathan, N., & Sudarshan Kisan, S. (2011). Evaluation of anti inflammatory and analgesic activity of *Tridax procumbens* Linn against formalin, acetic acid and CFA induced pain mo Dels. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 126–130.
  - Vivas De Gaulejac, N. (2001). *Vin et santé : les bases scientifiques du French Paradox (Les fondamentaux)*. Edition Féret.
  - Waffo Teguo, P., Decendit, A., Krisa, S., Deffieux, G., Vercauteren, J., & Mérillon, J. M. (1996). The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Natural Products*, 59(12), 1189–1191. <https://doi.org/10.1021/np9605450>
  - Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1666–1673. <https://doi.org/10.1021/jf00044a016>
  - Warren, S. (1997). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc .
  - Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y., & Saito, I. (2006).

## Références bibliographiques

---

- The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 28(5), 439–449. <https://doi.org/10.1080/10641960600798655>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
  - Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544–547. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849>
  - Wolfender, J. L., Wari Del, P., Ndjoko, K., Hobby, K. R., Major, H. J., & Hostettmann, K. (2000). Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis*, 28(10), 895–906. <https://doi.org/10.1051/analisis:2000280895>
  - Woodring, P. J., Edwards, P. A., & Chisholm, M. G. (1990). HPLC Determination of Non-Flavonoid Phenols in Vidal Blanc Wine Using Electrochemical Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 729–732. <https://doi.org/10.1021/jf00093a030>
  - World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniases. WHO technical report series, 949. In *World Health Organization technical report series* (Issue 949).
  - Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013). Structure-activity relationship of flavonoids on their anti- *Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185–8190. <https://doi.org/10.1021/jf402222v>
  - Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
  - Zerrouki, Z. (1996). *Contribution a l'inventaire des plantes spontanées et leur utilisation éventuelle en médecines traditionnelles par la population d'Ouargla*. Ingéniorat INF AS Ouargla .
  - Zrýd, J. P. (1988). *Cultures de cellules tissus et organes végétauxfondement théorique et utilisation pratique*. Edition Presses Polytechniques Romandes .

# *Annexes*

## Annexe 1: Milieux de culture

### 1. Milieu Murashig et Skoog (MS)

<b>Agar</b>	10-13 g/l
<b>Macroéléments</b>	100 ml/l
<b>Microéléments</b>	10 ml/l
<b>Fer</b>	10 ml
<b>Vitamine</b>	5 ml/l
<b>Hormone</b>	0.002 g
<b>Saccharose</b>	30 g
<b>pH</b>	5.7

#### - Macro et micro éléments

<b>Macroéléments</b> (Solution stock à X10/L)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g
	KNO <sub>3</sub>	19.5 g
	CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	4.4 g
	MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	3.7 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g
<b>Micro éléments</b> (solution stock à X100/L)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62 g
	MnSO <sub>4</sub>	2.23 g
	ZnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0.86 g
	KI	0.0083g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.025 g
	CuSO <sub>4</sub>	0.0025 g
	CoCl <sub>2</sub>	0.0025 g

#### - Vitamines

<b>Panhotenate de calcium</b>	0.2 mg/ml
<b>Acide nicotinique</b>	0.2 mg/ml
<b>Biotine</b>	0.02 mg/ml
<b>Thiamine-HCl</b>	0.2 mg/ml
<b>Pyridoxine</b>	0.2 mg/ml
<b>Mesoinositol</b>	20 mg/ml

## Annexes

---

### 2. Milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal)

Gélose (Bacto agar Diffco)	10 g
NaCl	6 g
Eau distillée stérile	100 ml
Sang du lapin	10 à 20 %

#### - Préparation

La gélose Bacto Agar est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80C°. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation ; après distribution dans des tubes à essais de 8 ml et stérilisation à l'autoclave à 120C° pendant 20 minutes, la conservation se fait à +4C°.

Le sang du lapin est obtenu par ponction cardiaque. Il est recueilli sur citrate de sodium à 10% après ajout de 250000 unités (U) de pénicilline, la conservation se fait à +4C°. Le mélange gélose sang : la gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain marie de 45°C, le sang est ensuite incorporé à la gélose (2ml de sang pour 8 ml de gélose). Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation de ce milieu est d'un mois à + 4C°.

### 3. Milieu RPMI 1640 +10% SVF

RPMI 1640	16.4 g
HEPES	2 g
bicarbonate de sodium	3 g
pénicilline	50 UI/ml
streptomycine	50µg /ml
Eau distillée stérile QSP	1000 ml

#### - Préparation

Ajouter le milieu sous forme de poudre à 900 ml d'eau distillée sous agitation magnétique, mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer, puis ajouter 2g de HEPES et 3 g bicarbonate de sodium et 50 UI/ml de pénicilline et 50µg /ml de streptomycine et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml. Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm et additionner aseptiquement du sérum de veau fœtal à 10%. Conserver le milieu à +4C° pendant 1 mois.

## Annexes

---

### 4. Milieu de culture Mueller-Hinton

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17.5 g
Extrait de viande	2.0 g
Amidon	1.5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12.5 mg
Agar	15.0 g
pH	7.4 +/- 0.2
Eau distillée QSP	1000 mL

### 5. Milieu de culture gélose nutritive

Relativement simplifiée, la formulation apporte les éléments nutritifs nécessaires à la croissance d'une grande variété de germes non exigeants. Il est recommandé par l'American Health Association pour la numération des bactéries dans les eaux. Le milieu est exempt de cystéine, ce qui entraîne l'absence de croissance de *Legionella* sur ce milieu et permet d'orienter l'identification. La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Tryptone	5.0 g
Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar agar bactériologique	12.0 g
Eau distillée QSP	1000 mL

### **6. Décongélation des cellules (Leishmania et THP1)**

La décongélation se fait rapidement, au bain-marie à 37°C:

- Nettoyer le cryotube avec de l'éthanol 70% avant de l'ouvrir.
- Vider le contenu du cryotube dans le milieu de culture RPMI +10 % SVF.
- Centrifugation à 2500 tr pendant 15 min, à fin d'éliminer le DMSO.
- Incubation 3 à 4 jours à 26°C.

### **Annexe 2 : La numération cellulaire**

La numérotation des cellules a été effectuée à l'aide de cellule Thomas, c'est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu ; c'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. Le volume de comptage est déterminé par la surface de quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

#### **Protocol de remplissage de la cellule de numération**

Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22x22 mm et faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux, pour cela il faut placer la lamelle sur ces plateaux, puis exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance. Placer la cellule de comptage sur une surface plane, homogénéiser les suspensions cellulaires, et prélever celles-ci à l'aide d'une pipette Pasteur.

Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de l'embout légèrement inclinée près de la lamelle sur la plateforme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulle d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération. Après utilisation, la lamelle est jetée et la cellule de numération est immergée dans un bain d'eau javel pendant 5 minutes, puis rincée avec de l'eau distillée et essuyée avec une gaze ou un papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

#### **Numération**

Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer) et observer par la suite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage. Compter parmi les 16 carreaux les cellules contenues dans 6 carreaux du quadrillage en Z.

#### **Calcul de la concentration cellulaire**

La concentration cellulaire de la suspension de cellules est calculée selon cette formule :

$$(\text{Nombre de cellules}/6) \times 16 \times (1/\text{dilution}) \times 10^4 \text{cellules /ml.}$$

## Annexe 3 : Paramètres des chromatographies

### 1. Paramètres UPLC-MS

L'analyse MS a été réalisée sur un spectromètre de masse quadripolaire tandem Waters ACQUITY XEVO TQS (Waters, Royaume-Uni), en utilisant une source d'électropulvérisation (ESI) en mode ion positif et négatif. Les paramètres ESI sont les suivants: tension capillaire de 3.0 kV et -2.5 kV en mode positif et négatif, respectivement; la source à 150°C; température de dé-solvatation 500 ° C; débit de gaz conique (azote) 150 L/h; débit de gaz de dé-solvatation 800 L/h. Des injections de flux de chaque standard ont été utilisées pour optimiser les paramètres de tension de cône et de surveillance de réactions multiples (MRM). La dissociation induite par collision a été réalisée en utilisant de l'argon à un débit de 0.15 mL/min dans la cellule de collision. Le logiciel Mass Lynx 4.1 (Waters, USA) a été utilisé pour l'acquisition de données.

Les polyphénols ont été identifiés sur la base de la comparaison des temps de rétention, des spectres UV et MS des pics inconnus avec ceux des étalons de référence.

### 2. Paramètres UPLC-PDA

L'analyse par chromatographie en phase liquide ultra-performante a été réalisée sur un système Waters ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, USA) consistant en un gestionnaire de solvant binaire ACQUITY UPLC™ et un gestionnaire d'échantillon ACQUITY UPLC™, couplés à un détecteur à réseau de photodiodes ACQUITY UPLC™ PDA. La séparation de composés a été réalisée par une colonne ACQUITY UPLC™ HSS T3 (1.8 µm; 2.1 mm x 150 mm) (Waters, Manchester, Royaume-Uni) ; en utilisant une phase mobile constituée du solvant A, H<sub>2</sub>O: ACN (95: 5) à 0.1% v/v acide acétique et solvant B, ACN 100% (0.1% v/v HAcO). Le débit est de 0.5 mL/min. Le gradient linéaire : 0-1.89 min, 1% de B (isocratique); 1.89 – 17.84 min, 30% B (gradient linéaire); 17.84 à 21.39 min, 5% B (gradient linéaire); 21.39 à 21.56 min, 1% B (gradient linéaire); 21.56 - 25 min, 1% B (isocratique). Le volume d'injection est de 10 µl en mode boucle complète ; la colonne a été maintenue à 45 ° C, la température du gestionnaire d'échantillon étant maintenue à 10°C.

### 3. Paramètres de GC-MS

L'analyse GC-MS a été réalisée sur un GC Agilent 7890A avec une colonne capillaire: DB 5-MS-UI; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à débit constant de 1 ml/min.

## *Annexes*

---

Le volume d'injection de l'échantillon est de 1  $\mu\text{l}$  en mode sans division. Les conditions chromatographiques sont les suivantes:

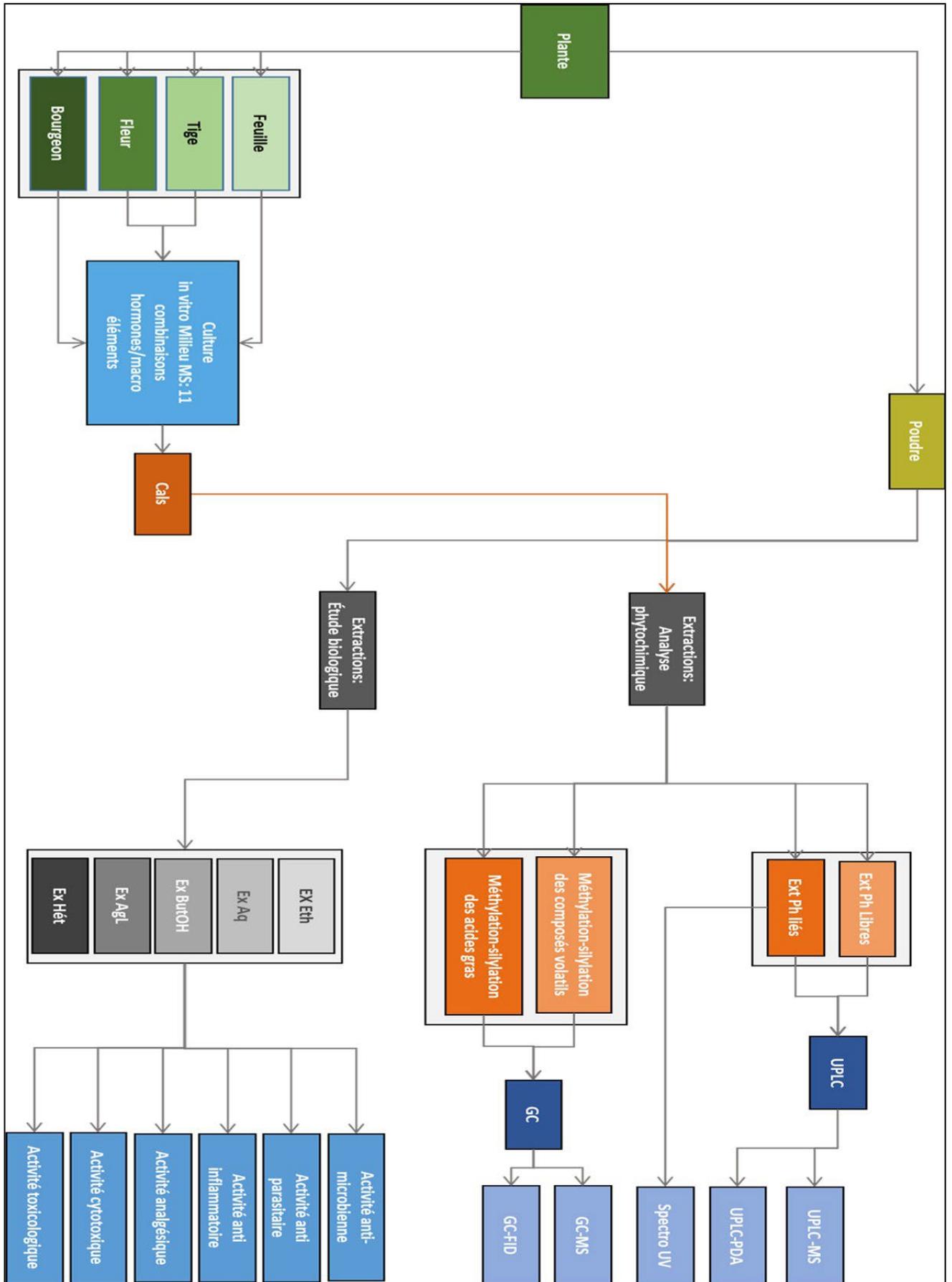
- Programme de température: température initiale de 80°C (isotherme pendant 2 min).
  - Une vitesse d'augmentation de température de 6°C/min, jusqu'à 310°C sans prise.
- Une pression de  $6.4 \cdot 10^4$  Pa.

Les composés ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux disponibles dans la bibliothèque informatique de GC-MS, NIST 17 et NIST MS Search 2.3.

#### **4. Paramètres de GC-FID**

Le programme de température (température du four) est identique à celui mentionné précédemment dans la technique de GC-MS, mais nous avons utilisé la colonne : DB-35-MS-UI (25 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ), avec une pression de  $8.1 \cdot 10^4$  Pa et un débit constant de 1 ml/min. Les composés ont été quantifiés en considérant le facteur de réponse, ainsi que la surface du pic de l'étalon interne.

Annexe 4 : Méthodologie expérimentale globale





## Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Phytochemical Study of *Traganum nudatum* Delile

Ikram Benhassine\*<sup>a, b</sup>, Saida Ouafi<sup>c</sup>, Jordi Eras<sup>d, e</sup>, Zoubir Harrat<sup>b</sup>, Zihad Bouslama<sup>a</sup>, Ramon Canela-Garayoa<sup>d</sup>

*Biology Department, ecology and terrestrial and aquatic system laboratory, University Badji Mokhtar, BP 12, Sidi Ammar, 23000 Annaba, Algeria, <sup>b</sup>Laboratory of Parasitic Eco-Epidemiology and populations genetics, Institut Pasteur of Algiers, Algiers, Algeria, <sup>c</sup>Department of Biology of populations and organisms, LRZA laboratory, USTHB, Bp 32 El-Alia, Babezouar 16111 Algiers, Algeria, <sup>d</sup>Department of Chemistry, DBA center, University of Lleida, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain, <sup>e</sup>Scientific Technical Services TCEM, University of Lleida, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.*

---

### Abstract

*Traganum nudatum* Delile is a North African endemic medicinal plant commonly used in traditional medicine to treat wounds, hemorrhoids, rheumatism, and ear infections. Nevertheless, there are no scientific reports on the anti-inflammatory and analgesic effects of this plant. The present study aims to assess the therapeutic effect of the aqueous extract of the aerial part of the plant at three doses (40, 80, and 120 mg/kg) on experimentally pain-induced animals. First, the anti-inflammatory activity was assessed by carrageenan-induced paw edema on Swiss albino mice. Secondly, the analgesic activity was assessed by the acetic acid-induced writhing test. In addition, UPLC-MS-PDA and GC-MS-FID analyses were performed to screen the possible therapeutic compounds. The anti-inflammatory effect of the aqueous extract at 120 mg/kg for 4 h experiment was significantly higher ( $89.97 \pm 0.17\%$ ) than those of the reference drug acetylsalicylic acid (ASA) ( $0 \pm 0.25\%$ ); In comparison, the analgesic test showed a remarkable reducing pain effect ( $69.8 \pm 1.7\%$ ) at the dose of 80 mg/kg, almost similar to those of Acetaminophen (Paracetamol) ( $72.54 \pm 2.26\%$ ). The phytochemical screening revealed the presence of therapeutic biomolecules such as flavonoids, mainly rutin ( $6440 \pm 3.0 \mu\text{g/g}$ ), flavonols (narcissoside  $115.1 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$ ) and phenolic acids (chlorogenic acid  $1480 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$ ). GC-MS-FID showed the presence of saturated acids such as behenic and palmitic acid with percentages of  $35.58 \pm 0.06\%$  and  $17.54 \pm 0.09\%$ , respectively. These were in a higher percentage than the unsaturated fatty acids. These results validated the use of *T. nudatum* Delile for treating inflammatory and analgesic disorders in folk medicine. The presence of bioactive compounds, including polyphenols and fatty acids, may explain the pharmacological effect of the medicinal plant.

**Keywords:** Analgesic, Anti-inflammatory, GC-MS-FID, Polyphenols, *Traganum nudatum* Delile, UPLC-MS-PDA.

---

Corresponding Authors: Ikram Benhassine, Biology Department, ecology and terrestrial and aquatic system laboratory, University Badji Mokhtar, BP 12, Sidi Ammar, 23000 Annaba, Algeria; Laboratory of Parasitic Eco-Epidemiology and populations genetics, Institut Pasteur of Algiers, Algiers, Algeria

Tel: (+213) 697404712

Email: ikram\_benhassine@yahoo.fr

Cite this article as Benhassine I, Ouafi S, Eras J, Harrat Z, Bouslama Z, Canela-Garayoa R, Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Phytochemical Study of *Traganum nudatum* Delile, 2021, 17 (3): 1-22.

## 1. Introduction

According to Farnsworth and Kass, around 80% of the world's population use medicinal plants to treat various health problems [1]. In North Africa, regional pharmacopoeias are mainly based on traditional Arabic medicine and the experience of herbalists. However, the rules of use of medicinal plants often lack the rigor of modern therapeutic techniques regarding their safety and effectiveness [2]. In North Africa, Algeria is known for the diversity of its vegetation and its privileged ecosystem between the Mediterranean Sea and sub-Saharan Africa. The Saharan region has a specific flora, which is characterized by a large floristic diversity highly adapted to the arid climate of this zone [3].

*T.nudatum* Delile is an endemic medicinal plant belonging to the family of Amaranthaceae. It is a 15-40 cm tall plant with drifting stems, white branches and alternating fleshy and oval leaves, with a small yellowish curved spine at the top (Figure 1). It is used by the local population as herbal tea, powder or balm to treat various diseases such as wounds, skin diseases, hemorrhoids, rheumatism,

exhaustion, and ear infections [4]. It is also a favored pastoral plant for sheep, camels, and fat sand rats *Psammomys obesus* [5]. Despite its therapeutic uses, there is a lack of scientific studies about the anti-inflammatory and analgesic effect of *T.nudatum* Del. Only one report is available on the phytochemical screening of this plant. The study revealed the presence of flavonoids, flavonols, tannins, alkaloids, and high amounts of polyphenols [5]. The present study aimed to assess pharmacological activities of the plant's aqueous extract, and use UPLC-MS-PDA and GC-MS-FID analysis to perform a phytochemical screening to detect and quantify bioactive compounds showing promising activities.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant Material

*Traganum nudatum* Delile synonym of *Traganum acuminatum* Maire & Weiller; *Traganum nudatum* var. *acuminatum* (Maire & Weiller); *Traganum nudatum* var. *microphyllum* Maire was collected in March 2017 in the Souara region (south-west of Algeria), and identified by the higher national agricultural school in Algiers. A voucher specimen of the plant was deposited in the herbarium of the laboratory. For this study, we used the aerial parts of the plant (leaves, stems, and flowers), shade-dried at room temperature, and ground them into a fine powder using an electric blender.

## 2.2. Animals

Studies were carried out using male and female Swiss albino mice weighing 18–22 g, obtained from the animal house, Institut Pasteur of Algeria, Algiers, under the grant agreement N°778298 signed by the Algerian Association of sciences in animal experimentation. The animals were grouped in polyacrylic cages, with six animals per cage, and maintained under standard laboratory conditions (temperature  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with dark and light cycles (14/10h) and free access to standard dry pellet diet and water.

## 2.3. Anti-Inflammatory Activity

The anti-inflammatory activity was evaluated using the protocol described by Winter *et al.* [6]. Albinos mice were divided randomly into five groups (n=6). Control mice were treated by oral administration of 0.9% sterile saline water (0.5 mL / 20 g), positive control with 150 mg/kg of acetylsalicylic acid (ASA) as a drug reference, while the remaining groups received the plant's aqueous extract at three different doses (40, 80 and 120 mg/kg). Edema was induced by injecting carrageenan suspension (50  $\mu\text{L}$ , 1 % w/v) into the sub-plantar tissues of the right paw 30 min after oral treatments. The evolution of paw edema was measured hourly by a caliper for 4 h after injection. The edema percentage was calculated using the mean diameter of the right paws after carrageenan injection and the mean diameter of the healthy left paws, according to the following equation:

% Edema

$\frac{\text{Mean diameter of left paw} - \text{Mean diameter of right paw}}{\text{Mean diameter of left paw}}$

$$= \frac{\text{Mean diameter of left paw} - \text{Mean diameter of right paw}}{\text{Mean diameter of left paw}} \times 100$$

The anti-inflammatory activity was calculated as the inhibition percentage of edema between the tested and control groups following the equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\% \text{ Edema of control group} - \% \text{ Edema of tested group}}{\% \text{ Edema of control group}} \times 100$$

## 2.4. Analgesic Activity

The analgesic effect was evaluated using the method described by Koster *et al.* [7], and Collier *et al.* [8] with a slight modification [9, 10]. Albinos mice were divided randomly into five groups (n=6). The control group received orally 0.9% sterile saline water (0.5 mL /20 g), positive control received Acetaminophen (Paracetamol) as a drug reference (100 mg/kg), while other groups of mice received the plant's aqueous extract at three different doses of 40, 80 and 120 mg/kg. To induce a positive response (stretching of the hind legs and cramps in the abdomen), acetic acid (0.6%; v/v) was injected intraperitoneally into mice (10 mL /kg) 30 min after the oral administration of drugs. The number of cramps of each mouse was counted 5 min after the injection during 15 min. The protection percentage was calculated according to the following equation:

% Pain inhibition

$\frac{\text{Cramps of control group} - \text{Cramps of tested group}}{\text{Cramps of control group}}$

$$= \frac{\text{Cramps of control group} - \text{Cramps of tested group}}{\text{Cramps of control group}} \times 100$$

## 2.5. Phytochemical Study

All the analyses of this study were carried out in triplicates and summarized in [Fig. 2](#).

### 2.5. 1. Reagents and Standards Used in Extractions for GC-MS and UPLC Analysis

2, 6-di-*t*-Butyl-4-methyl-hydroxybenzene (BHT) and heptadecanoic were purchased from Aldrich (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Chlorotrimethylsilane (CTMS) was obtained from Fluka (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Methanol, *i*-octane, hexane, and pyridine were acquired from J.T. Baker (J.T. Baker, Daventer, Holland). Anhydrous magnesium sulphate was purchased from Panreac (Panreac, Barcelona, Spain). A set of fatty acid methyl esters (FAMES) reference standards (10 mg/mL in dichloromethane) was obtained from Supelco (Sigma-Aldrich).

A methanol stock solution of the following 57 commercial phenolic standards was prepared and stored at -80°C.

(-)-Chlorogenic acid and gallic acid were purchased from Acros Organics (Fisher Scientific SL, Madrid). Arbutin, caffeic acid, (+)-catechin, *p*-coumarin acid, cyanidin chloride, 3,5-dicaffeoylquinic acid, daidzein, ellagic acid, epicatechin, epicatechingallate, (+)-eriodictin, eriodictyol, ferulic acid, galangin, genistein, gallo catechingallate, hesperidin, hydroxytyrosol, hyperoside, isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside, kaempferol, luteoloside, myricetin, narcissoside, naringindihydrochalcone, narirutin, orientin, 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose, phloretin, phloridzin, rutin,

procyanidin A2, procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin C1, quercetin, quercitrin, +(-) *p*-salicylic acid, taxifolin, theaflavin, theaflavindigallate, trangeretin, vanillic acid, vicenin II and vitexin were from Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Cymit Quimica, Barcelona). Cyanidin-3-glucoside chloride, delphinidin-3-*O*-rutinoside chloride, keracyanin chloride and quercetin-3-*O*-glucopyranoside were from Extrasynthese (Lyon, France). Fisetin and pelargonidin-3-rutinoside chloride were from Carbosynth Ltd (Berkshire, England).

### 2.5.2. Metabolite Analysis

UPLC and CG were used as chromatography techniques for the detection of phenolic and other compounds. UV-visible spectrometry was used for the detection of proanthocyanidin (condensed tannins). Extraction procedures used were according to the analytical techniques used.

#### 2.5.2.1. Extraction of Free Phenolic Compounds for UPLC Analysis

Plant powder (250 mg) was extracted with 5 mL of acidified (0.1% v/v acetic acid) methanol/water (50:50) solution and then twice with 5 mL of acetone: water (70:30) solution in an ultrasonic bath for 30 min. Extracted solutions were joined and diluted with 1:4 acidified Milli-Q-water (0.1% v/v of acetic acid) and filtered using 0.20  $\mu$ m PTFE filters (poly-tetrafluoroethylene). Solutions were kept at 6°C until UPLC analysis. All solvents contained ascorbic acid (0.2% w/v) [11].

### 2.5.2.2. Extraction of Bound Phenolic Compounds for UPLC Analysis

Bound phenolic compounds are covalently conjugated to cellulose, pectin, and polysaccharides by ester bonds and can be difficult to hydrolyze. Basic and acidic hydrolysis methods can be used to release bound phenolic compounds [12].

#### 2.5.2.2.1. Basic Hydrolysis of Bound Phenolic Compounds for UPLC Analysis

The residue of the previous extraction was lyophilized and 50 mg were mixed with 1.5 mL of 2M NaOH containing 10 mM EDTA and 1% ascorbic acid. The mixture was shaken in an Eppendorf® Thermomixer for 30 min at 45°C, acidified at pH 3 with 0.285 mL of 7.2 M HCl and centrifuged at 1400xg for 5 min [13][11]. Sample was extracted three times with ethyl acetate (x4 volumes), centrifuged at 1400 x g for 10 min and the supernatant was collected after each extraction. All the acetate extractions were joined and kept at the freezer until analysis. Prior to the UPLC analysis, samples were dried under nitrogen stream. The residue was dissolved in 0.5 mL MeOH, then diluted with running buffer (1.25% glacial acetic acid, 7% MeOH in water) and the sample analyzed by UPLC [14, 11].

#### 2.5.2.2.2. Acidic Hydrolysis of Bound Pro-Anthocyanidins for Spectrometry Analysis

The lyophilized sample obtained above (10 mg) was incubated with 5 mL of n-butanol/HCl (95:5) solution and 200 µL of ferric reagent (2% ferric ammonium sulphate in 2M HCl) for 60

min [15]. The mixture was cooled in ice water and centrifuged. Pro-anthocyanidins were measured at  $\lambda_{\max} = 550$  nm, using cyanidin chloride as a reference compound [11].

#### 2.5.2.3. Direct Methylation-Silylation for GC-MS Analysis

A combined derivatization method based on the methylation of carboxylic acids and silylation of hydroxyl groups was used to allow the identification of different metabolites by GC-MS [16]. Derivatization is typically performed to change the analyte properties for a better separation and enhance the method sensitivity, which may improve the capability of identifying compounds. In a 2 mL reaction vial fitted with a poly-tetrafluoroethylene lined cap (PTFE), 20 mg of plant powder, 60 µL of dry MeOH and 250 µL of chlorotrimethylsilane (CTMS) were mixed and vortexed for 2 min, the vial was heated in a digestion stirrer block at 75°C for 15 min. Dry isooctane (600 µL) was added to the cooled vial and vortexed for 1 min. Dry pyridine (180 µL) was added to the reaction vial and vortexed for 2 min. Finally, the vial was centrifuged at 1400 x g for 5 min and the upper phase was recovered and analyzed immediately by GC-MS.

#### 2.5.2.4. Methylation of Fatty Acids for GC-FID Analysis

In order to quantify the free fatty acids as methyl esters, a derivatization method based on acid catalysis was used [16]. To a 15 mL reaction vial fitted with a PTFE-lined cap (poly-tetrafluoroethylene) were added 50 mg of

sample, 0.5 mL of hexane containing 1 mg/mL of internal standard solution (heptadecanoic acid methyl ester), 1 mL of methanol (MeOH) saturated with dry nitrogen and 0.5 mL of chlorotrimethylsilane (CTMS). The vial was filled with nitrogen and placed in a digestion block at 80°C for 45 min. After cooling, 2 mL of hexane/diethyl ether solution (1:1) were added and the mixture was neutralized carefully by adding 0.2 g of powdered sodium bicarbonate and 2 mL of saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The upper phase was recovered, dried over anhydrous magnesium sulphate and analysed by GC-FID.

### 2.5.3. Chromatography Analysis

To identify and quantify the phenolic compounds in the plant's extracts, UPLC coupled with a photodiode array detector (PDA) in series with a mass spectrometry detector (MS) was used. The screening of bioactive constituents with low mass polar, semi polar and non-polar compounds present in the sample was carried out with GC-MS after derivatization [17]. The GC-FID was used to quantify the fatty acids as methyl esters by calibration with the internal standard method. The response factors of methyl esters of commercially available saturated and unsaturated fatty acids were calculated under the same chromatographic conditions.

### 2.5.4. Chromatography Parameters

#### 2.5.4.1. UPLC-PDA Parameters

Ultra-performance liquid chromatographic analysis was carried out on a Waters

ACQUITY UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) consisting of an ACQUITY UPLC™ binary solvent manager and ACQUITY UPLC™ sample manager, coupled to a photodiode array detector ACQUITY UPLC™ PDA. The separation of compounds were carried out by an ACQUITY UPLC™ HSS T3 column (1.8 µm; 2.1 mm x 150 mm) (Waters, Manchester, UK) using a mobile phase consisting of solvent A, H<sub>2</sub>O: ACN (95:5) with 0.1% v/v acetic acid, and solvent B, ACN 100% (0.1% v/v HAcO). The flow rate was 0.50 mL/min. The linear gradient : 0-1.89 min, 1% B, (isocratic); 1.89 – 17.84 min, 30% B, (linear gradient); 17.84 – 21.39 min, 5% B, ( linear gradient); 21.39 – 21.56 min, 1% B (linear gradient); 21.56 - 25 min, 1% B (isocratic). The injection volume was 10 µL in full loop mode; the column was kept at 45°C as the temperature in the sample manager was maintained at 10°C.

#### 2.5.4.2. UPLC-MS Parameters

MS analysis was performed on a Waters ACQUITY XEVO TQS tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, UK), using an electro-spray source (ESI) in positive and negative ion mode. The ESI parameters were as following: capillary voltage of 3.0 kV and -2.5 kV in positive and negative mode, respectively; the source at 150°C; desolvation temperature 500°C; cone gas (nitrogen) flow 150 L/h; and desolvation gas flow 800 L/h. Flow injections of each individual standard were used to optimize the cone voltage and Multiple Reaction Monitoring (MRM) parameters. Collision-induced dissociation was achieved

using argon at a flow rate of 0.15 mL /min in the collision cell. MassLynx 4.1 software (Waters, USA) was used for data acquisition. Polyphenols were identified on the basis of the comparison of retention times, the UV and MS spectra of unknown peaks with those of reference standards.

#### 2.5.4.3. GC-MS Parameters

GC-MS analysis was performed on an Agilent 7890A GC with a capillary column: DB 5-MS-UI; 30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m. The carrier gas used was helium with constant flow rate of 1 mL /min. The sample injection volume was 1  $\mu$ l in splitless mode. The chromatographic conditions were: a) temperature program: initial temperature 80°C (isothermal for 2 min), an increase rate of 6°C/min up to 310°C with no hold; pressure of 6.4 10<sup>4</sup> Pa. The compounds were identified based on GC retention time with those available in the GC-MS computer library's NIST 17 and NIST MS Search 2.3.

#### 2.5.4.4. GC-FID Parameters

GC-FID technique was used to quantify the individual components of the mixture. The temperature program (oven temperature) was the same as mentioned above but instead we used the column: DB-35-MS-UI (25 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m), with a pressure of 8.1 10<sup>4</sup> Pa and a constant flow rate of 1 mL /min. The compounds were quantified using response factors considering the peak area of internal standard.

#### 2.6. Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical differences among the treatment groups were assessed by two-way Anova analysis of variance, followed by Tukey test with GraphPad Prism 5.03 software and differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Anti-Inflammatory Activity

The anti-inflammatory effect of *T.nutadum* Del was evaluated during 4 h of experiment. We recorded an increase in inhibition effect in both ASA and aqueous extract until the second hour (57.47 $\pm$  0.21 %; 56.96 $\pm$  0.29 %) corresponding to a decrease of edema diameter (4.98 $\pm$  0.21%; 5.04 $\pm$  0.29 %) respectively. After the second hour, the inhibitory effect of ASA decreased until fading out (0 $\pm$  0.25%), corresponding to an increase in edema diameter (10.83 $\pm$  0.25%), while that of the aqueous extract kept increasing significantly until the end of the experiment (89.97 $\pm$  0.17%) corresponding to a decrease in edema diameter (1.00 $\pm$  0.17%). (Figure 3, Figure 4; Table 1, Table 2). Inflammation is a two-phase process; the initial phase is observed around the first hour after the injection of carrageenan, which is attributed to the release of chemical mediators such as histamine and serotonin. The second phase is due to the release of prostaglandins at the end of the second to the third hour [18, 19]. According to Abayomi *et al.* [20], aqueous extract of some medicinal plants of the *Chenopodiaceae* family has significant anti-

*inflammatory properties due to flavonoids, polyphenols, and saponins.* These compounds oppose the formation of prostaglandin, lysosomes, and proteases at the inflammatory site [21].

### 3.2. Analgesic Activity

The aqueous extract of *T. nudatum* Del at the dose of 80 mg/kg showed the strongest protection against abdominal cramps ( $69.8 \pm 1.7\%$ ) with a significant difference compared to Paracetamol ( $72.54 \pm 2.26\%$ ) (Figure 5, Table 3). Analgesic properties were evaluated using acetic acid, which involves the peripheral mechanisms of pain by inducing the release of chemical mediators such as histamine, prostaglandins, serotonin, and bradykinin [8, 22]. Paracetamol act on pain mechanisms by intervening in the biosynthesis of prostaglandins [23]. The results found in this study corroborate with those of Ibironke and Ajiboye, who demonstrated that some medicinal plants of *Chenopodiaceae* family have analgesic properties, which might be related to the presence of phenolic compounds, flavonoids and tannins [24].

### 3.3. Free Phenolic Compounds

Phytochemical study revealed high amounts in all families of polyphenols, including flavonoids, flavones, flavonols, flavan-3-ol and phenolic acids, corroborating with the results that *Chenopodiaceae* family plants contain high amounts of polyphenols [5, 25].

Free phenolic compounds were analyzed using UPLC-MS-PDA, identified and

quantified by comparison to 57 phenolic standard compounds (Figure 6, Figure 7; Table 4). Narcissoside (ishoramnetin 3-O-rutinoside) known for its therapeutic capacity for the treatment of severe vascular inflammatory diseases, was the main compound of all free polyphenols identified ( $115.1 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$ ). Vanillic acid ( $21.7 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ ), was identified in the medicinal plant *Clerodendrum petasites* and is considered a potential candidate for the anti-inflammatory effects [26, 27].

### 3.4. Bound Phenolic Compounds

Bound phenolic compounds were obtained by basic hydrolysis of the remaining solid material and identified by UPLC-PDA-MS-tQ (Figure 8, Table 5). Many compounds, such as flavonoids, flavonols, flavones, flavan-3-ols, phenolic acids and anthocyanin were detected. The main compound known for its anti-inflammatory and analgesic effects on Albinos mice was rutin ( $6440 \pm 3.0 \mu\text{g/g}$ ), followed by luteolin-7-O-glucoside ( $3250 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$ ), which has anti-inflammatory, anti-allergic and antioxidant potential [28, 29]. On the other hand, fisetin known for its anti-inflammatory and anti-cancer effect [30][31] was found at  $2660 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ . Delphinidin-3-o-rutinoside chloride found at  $2614 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$  is known for its many health benefits (antioxidant, antiplatelet, ophthalmic, and vasoprotective activities) [32]. Finally quercetin-o-glucopyranoside ( $1761 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ ) and chlorogenic acid ( $1480 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$ ) were identified as anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant agents [33, 34].

### 3.5. Bound Pro-anthocyanidins (Condensed Tannins)

Total condensed tannins of *T.nudatum* Del were measured by UV-vis spectrophotometry. We noticed their absence in the plant. These results proved the rare occurrence of the condensed tannins in *Amaranthaceae* family [35].

### 3.6. Identification of Compounds by GC-MS

The GC-MS allowed the identification of other compounds with potential therapeutic interest not previously detected in the sample (Figure 9, Table 6).

In general, these compounds included short alkyl carboxylic, dicarboxylic and aromatic acids, such as malic acid (Peak 3), 3,4-dimethoxycinnamic acid (Peak 15), citric acid (Peak 8), benzoic acid (Peak 1), ferulic acid (Peak 14) and nonanedioic acid (Peak 9).

Long-chain alcohols, hydroxy fatty acids, long chain fatty acids such as 1-hexacosanol (Peak 36), 1-octacosanol (Peak 39), 1-triacontanol (Peak 41), 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid (Peak 24), octacosanoic acid (Peak 40), linolenic acid (Peak 19), myristic acid (Peak 11), palmitic acid (Peak 13), margaric acid (Peak 12), arachidic acid (Peak 22), oleic acid (Peak 17), behenic acid (Peak 26), lignoceric acid (Peak 32) hexacosanoic acid (Peak 38) and finally linolenic acid (Peak 19) were also detected.

### 3.7. Fatty Acids Quantification

GC-FID revealed the presence of more saturated than unsaturated fatty acids in the plant. Three major fatty acids were quantified

(Figure 10, Table 7); the most abundant acid was behenic acid (C22:0) ,  $35.58 \pm 0.06$  % found in some *Chenopodiaceae* family plants and known for its antimicrobial and antioxidant activities, followed by palmitic acid (C16:0),  $17.54 \pm 0.09$  %, which possesses antioxidant and anti-inflammatory properties in the human body and finally oleic acid,  $8.57 \pm 0.03$  % presenting a pro-inflammatory effect in wound healing rats [36, 37, 38].

## 4. Conclusion

The pharmacological tests performed in the present study showed significant analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *T.nudatum* Del and scientifically validated the use of this plant for treating inflammatory and analgesic disorders in folk medicine. These pharmacological properties could be attributed to the presence of various bioactive compounds including polyphenols (narcissoside, rutin, fisetin, vanillic acid) and fatty acids (behenic, palmitic and oleic acid), which were identified and quantified by UPLC-MS-PDA and GC-MS-FID respectively. These results suggest that the chemical constitution of the plant could serve as a basis for the development of new analgesic and anti-inflammatory treatments; so further studies are necessary in order to identify and evaluate the mechanism of action of these therapeutic compounds.

## Funding

The research study was funded by Badji Mokhtar University-Annaba, Algeria.

## Acknowledgements

We thank Garni Rafik MD, Boussouar Fayçal PhD, Sophie Rousseaux MD, Kelly Matmati MD and Nabil Matmati PhD for helpful comments on the manuscript.

## References

- [1] Farnsworth NR and Kaas CJ. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *J. Ethnopharmacol.* (1981) 3 (1): 85–99.
- [2] Bellakhdar J. *Plantes médicinales au Maghreb et soins de base- Précis de phytothérapie moderne*, Le fennec. Casablanca (2006).
- [3] Duraffourd C and Lapraz JC CR. *La plante médicinale de la tradition à la science*. Jacques Grancher publishers, Paris (1997).
- [4] Telli A, Esnault M A and Ould El Hadj Khelil A. An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province). *J. Arid Environ.* (2016) 127: 82–92.
- [5] Mouderas F, El Hacı IA, and Lahfa FB. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Traganum nudatum* Delile aerial parts organic extracts collected from Algerian Sahara's flora. *Orient. Pharm. Exp. Med* (2019) 19: 299–310.
- [6] Winter CA, Risley EA and Nuss GW. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Exp. Biol. Med.* (1962) 111: 544–547.
- [7] Koster R, Anderson M and De Beer E. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* (1959) 18: 412–430.
- [8] Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA and Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* (1968) 32: 295–310.
- [9] Sawadogo WR, Boly R, Lompo M, Some N, Lamien CE, Guissou IP and Nacoulma OG. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *dicliptera verticillata*. *Int. J. Pharmacol.* (2006) 2 (4): 435–438.
- [10] Das B, Ferdous T, Mahmoud Q, Hannan JMA, Bhattacharjee R and Das BK. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activity of the Bark Extract of *Plumeria rubra* on Laboratory Animals. *European Med. Plants.* (2013) 3 (1): 114–126.
- [11] Delpino-Rius A, Eras J, Vilaró F, Cubero MÁ, Balcells M and Canela-Garayoa R. Characterization of phenolic compounds in processed fibers from the juice industry. *Food Chem.* (2015) 172: 575–584.
- [12] Su D, Zhang R, Hou F, Zhang M, Guo J, Huang F, Deng Y and Wei Z. Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. *BMC. Complement. Altern. Med.* (2014) 14: 9.
- [13] Nardini M, Cirillo E, Natella F, Mencarelli D, Comisso A and Scaccini C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chem.* (2002) 79 (1): 119–124.
- [14] Woodring PJ, Edwards PA and Chisholm MG. HPLC determination of non-flavonoid phenols in vidal blanc wine using electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* (1990) 38: 729–732.
- [15] Porter LJ. Number- and Weight-Average Molecular Weights for Some Proanthocyanidin Polymers (Condensed Tannins). *Aust. J. Chem.* (1986) 39 (4): 557–562.
- [16] Eras J, Ferran J, Perpiña B and Canela R. Chlorotrimethylsilane, a reagent for the direct quantitative analysis of fats and oils present in vegetable and meat samples. *J. Chromatogr. A.* (2004) 1047 (1): 157–161.
- [17] Balamurugan K, Nishanthini A and Mohan VR. GC–MS analysis of *Polycarpaea corymbosa* (L.) Lam whole plant. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2012) 2 (3): 1289–1292.
- [18] Brooks PM and Day RO. Nonsteroidal Anti-inflammatory- Drugs Differences and Similarities. *N. Engl. J. Med.* (1991) 324 (24): 1716–1725.

- [19] Morris JL, Rosen DA and Rosen KR. Nonsteroidal anti-inflammatory agents in neonates. *Pediatric Drugs*. (2003) 5: 385–405.
- [20] Ajayi AM, Tanayen JK, Magomere A and Ezeonwumelu JOC. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Chenopodium opulifolium* schrad leaves. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* (2017) 6 (1): 14–21.
- [21] Soro TY, Traore F and Sakande J. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Comptes Rendus. Biol.* (2009) 332 (4): 371–377.
- [22] Hasan SMR, Jamila M, Majumder MM, Akter R, Hossain MM, Mazumder MDEH, Alam MA, Jahangir R, Md. Rana MS, Arif M and Rahman S. Analgesic and antioxidant activity of the hydromethanolic extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. leaves. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* (2009) 4 (1): 1–7.
- [23] Ferreira SH, Moncada S and Vane JR. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br. J. Pharmacol.* (1997) 120 (1): 401–412.
- [24] Ibironke GF and Ajiboye KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *Int. J. Pharmacol.* (2007) 3: 111–115.
- [25] Repo CVR, Hellström JK, Pihlava JM and Mattila PH. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chem.* (2010) 120 (1): 128–133.
- [26] Kim TH, Ku S-K and Bae J-S. Anti-inflammatory activities of isorhamnetin-3-*O*-galactoside against HMGB1-induced inflammatory responses in both HUVECs and CLP-induced septic mice. *J. Cell. Biochem.* (2013) 114 (2): 336–345.
- [27] Brimson JM, Onlamoon N, Tencomnao T and Thitilertdech P. *Clerodendrum petasites* S. Moore: The therapeutic potential of phytochemicals, hispidulin, vanillic acid, verbascoside, and apigenin. *Biomed. Pharmacother.* (2019) 118: 109319.
- [28] Ganeshpurkar A and Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm. J.* (2017) 25 (2): 149–164.
- [29] Lin LC, Pai YF and Tsai TH. Isolation of Luteolin and Luteolin-7-*O*-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. *J. Agric. Food Chem.* (2015) 63 (35): 7700–7706.
- [30] Majouli K, Hamdi A, Msaada K and Kenani A. A bioactivity guided study on the antibacterial activity of *Hertia cheirifolia* L. extracts. *Microb. Pathog.* (2017) 106: 113–118.
- [31] Touil YS, Auzeil N, Boulinguez F, Saighi H, Regazzetti A, Scherman D, Chabot GG. Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite. *Biochem. Pharmacol.* (2011) 82 (11): 1731–1739.
- [32] Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M and Tsuda T. Orally Administered Delphinidin 3-Rutinoside and Cyanidin 3-Rutinoside Are Directly Absorbed in Rats and Humans and Appear in the Blood as the Intact Forms. *J. Agric. Food Chem.* (2001) 49 (3): 1546–1551.
- [33] Jesus RS, Piana M, Freitas RB, Brum TF, Alves CFS, Belke B V, Mossmann NJ, Cruz RC, Santos RCV, Dalmolin TV, Bianchini BV, Campos MAA and De Freitas Bauermann L. *In vitro* antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian J. Microbiol.* (2018) 49 (2): 296–302.
- [34] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L and XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* (2018) 97: 67–74.
- [35] Bittrich V and Amaral MDCE. Proanthocyanidins in the testa of centrosperous seeds. *Biochem. Syst. Ecol.* (1991) 19 (4): 319–321.
- [36] Nisar M, Shah H, Khan I, Fazal-ur-Rehman, Khan MS, Marwat SK, Niazi ZR and Ullah A. Antimicrobial Potential and Phytochemical

Investigation of Fixed Oil of Plant *Chenopodium ambrosioides* Linn. *Asian J. Chem.* (2013) 25 (2): 1069–1072.

[37] Mullen A, Loscher CE and Roche HM. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *J.*

*Nutr. Biochem.* (2010) 21 (5): 444–450.

[38] Pereira LM, Hatanaka E, Martins EF, Oliveira F, Liberti EA, Farsky SH, Curi R and Pithon-Curi TC. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochem. Funct.* (2008) 26 (2): 197–204.

Tables:

**Table 1.** Edema diameter percentage of paw injected by carrageenin 1%, treated with aqueous extract of *T.nudatum* Del. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*).

Groups	Doses (mg/kg)	Edema diameter of the right paw (%)			
		1st hour	2nd hour	3rd hour	4th hour
Control (Saline water)	-	7.78±0.31	11.71±0.18	15.11±0.17	9.97±0.10
Acetylsalicylic acid (ASA)	150	7.15± 0.32	4.98± 0.21	7.58± 0.18	10.83± 0.25
Aqueous extract	120	6.92± 0.09	5.04± 0.29	4.77± 0.20 **	1.00± 0.17 ***

**Table 2.** Edema inhibition percentage of aqueous extract of *T.nudatum* Del. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*).

Groups	Doses (mg/kg)	Edema inhibition (%)			
		1st hour	2nd hour	3rd hour	4th hour
Acetylsalicylic acid (ASA)	150	8.10± 0.32	57.47± 0.21	49.83± 0.18	0± 0.25
Aqueous extract	120	11.05± 0.09	56.96± 0.29	68.43± 0.20**	89.97± 0.17***

**Table 3.** Number of abdominal cramps of mice injected by acetic acid 0.6%, treated with aqueous extract of *T.nudatum* Del. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*).

Groups	Doses (mg/kg)	Pain inhibition (%)
Control (saline water)	-	0
		72.54±2.26
Acetaminophen (Paracetamol)	100	45.3±1.6
	40	69.8±1.7 ***
	80	
		66±2
Aqueous extract	120	

**Table 4.** Free phenolic compounds content in *T.nudatum* Del as determined by UPLC-PDA-MS-tQ. ND: Not determined.

N° Peak	Retention time (min)	Compound	Amount (µg/g; n=3)
2	5.06	Vanillic acid	21.7 ± 0.5

4	5.19	Salicylic acid	6.2 ± 0.3
5	5.31	Syringic acid	5.1 ± 0.2
6	5.57	Procyanidin B2	ND
7	5.69	Kaempferol	ND
11	6.72	Ferulic acid	7.2 ± 0.9
13	6.96	Narcissoside	115.1 ± 1.4
14	7.24	Isorhamnetin glucoside	3.8 ± 0.4
16	8.50	Theaflavindigallate	4.4 ± 0.4
18	8.74	Hydroxytyrosol	4.0 ± 0.1
19	8.95	Quercetin	3.7 ± 0.16

**Table 5.** Bound phenolic compound content in *T.nudatum* Del as determined by UPLC-PDA-MS-tQ. ND: Not determined.

N° Peak	Retention time (min)	Compound	Amount (µg/g; n=3)
1	4.25	Chlorogenic acid	1480±1.6
3	5.18	Catechin	940 ± 12.1
8	6.24	Delphinidin-3-o-rutinoside chloride	2614± 2.3
9	6.47	Hyperoside	26 ±0.3
10	6.56	Quercetin-o-glucopyranoside	1761 ± 0.4
12	6.81	Rutin	6440± 3.0
15	7.77	Luteolin-7-o-glucoside	3250± 2.7
17	8.63	Gallic acid	540 ± 1.1
20	9.16	Fisetin	2660 ±0.4

**Table 6.** Compounds identified in *T.nudatum* Del by GC-MS. The compounds with the hydroxyl groups were identified as trimethylsilylether derivatives and the compounds with carboxylic groups were identified as methyl esters previous derivatization.

N° Peak	Retention time (min)	Compound name
<b>1</b>	<b>8.15</b>	<b>Benzoic acid</b>
2	8.43	Glycerol
<b>3</b>	<b>10.92</b>	<b>Malic acid</b>

4	15.02	-
5	15.76	<b>Monosaccharides in furanose form (coelutions)</b>
6	15.91	Lauric acid
7	16.01-22.60	<b>Monosaccharides in pyranoside form (coelutions)</b>
8	17.32	<b>Citric acid</b>
9	17.91	<b>Nonanedioic acid</b>
10	19.55	-
11	19.73	<b>Myristic acid</b>
12	24.87	<b>Margaric acid</b>
13	25.05	<b>Palmitic acid</b>
14	25.40	<b>Ferulic acid</b>
15	25.73	<b>Cinnamic acid 3,4-dimethoxy</b>
16	25.80	2-Hydroxyhexadecanoic acid
17	26.30	<b>Oleic acid</b>
18	26.45	Linoleic and stearic acids (coelution)
19	26.77	<b>Linolenic acid</b>
20	28.42	1-Eicosanol
21	28.57	16-Hydroxyhexadecanoic acid
22	29.37	<b>Arachidic acid</b>
23	29.50	1,16-Hexadecanedioic acid
24	30.58	10,16-Dihydroxyhexadecanoic acid
25	31.12	Docoheptaenoic acid
26	32.10	<b>Behenic acid</b>
27	32.25	1,18-Octadecanedioic acid
28	33.39	Tricosanoic acid
29	33.60	1-Tetracosanol
30	33.96	2-Hydroxydocosanoic acid
31	34.01	<b>Docosadienoic acid</b>
32	34.64	<b>Lignoceric acid</b>
33	34.81	Eicosanedioic acid
34	34.91	Triacontanoic acid
35	35.01	-
36	35.99	1-Hexacosanol
37	36.20	2-Hydroxytetracosanoic acid and 22-hydroxydocosanoic acid (coelution)
38	37.01	<b>Hexacosanoic acid</b>
39	38.21	1-Octacosanol
40	39.23	Octacosanoic acid
41	40.29	1-Triacontanol
42	41.30	Stigmasterol
43	42.00	Beta-Sitosterol
44	42.12	Stigmastanol

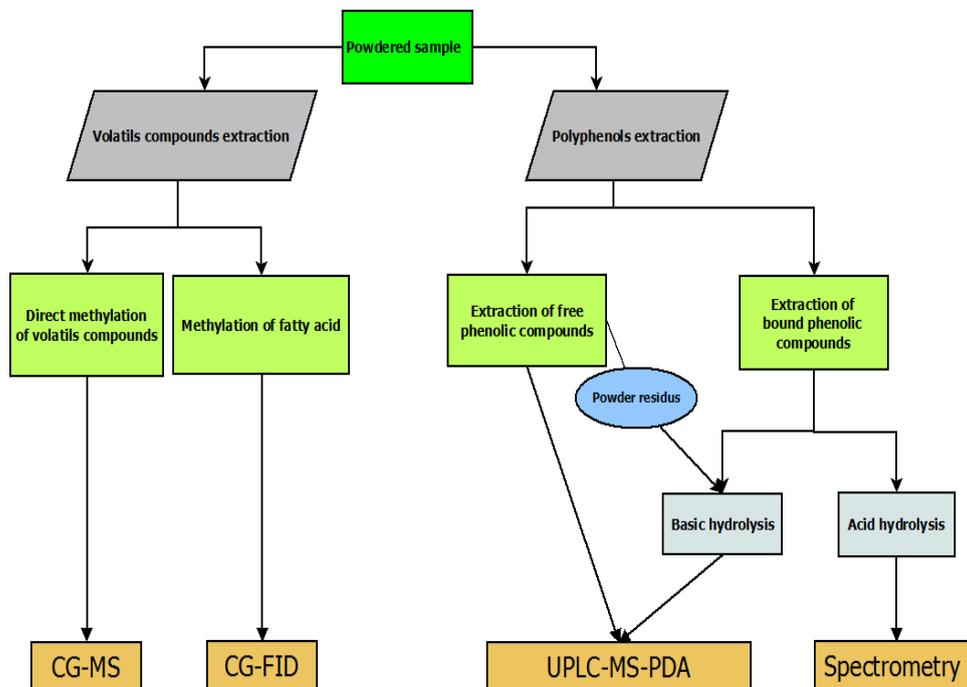
**Table 7.** Fatty acids quantification in *T.nudatum* Del as determined by GC-FID. To quantify the fatty acids in the plant by calibration method; Heptadecanoic acid methyl ester was used as an internal standard (IS).

Retention time (min)	Fatty acid name	Amount (% ww)
21.50	Myristic	4.25± 0.06
23.25	Pentadecanoic	0.33± 0.01
25.05	Palmitic	17.54± 0.09
27.98	Oleic	8.57± 0.03
28.08	Stearic	7.63± 0.09
28.13	Linolenic	1.26± 0.01
30.88	Arachidonic	6.29± 0.01
30.98	Arachidic	5.19± 0.02
31.12	Eicosapentaenoic (EPA)	1.03± 0.04
32.34	Henicosanoic	4.98± 0.02
32.10	Behenic	35.58± 0.06
33.82	Docosahexaenoic (DHA)	4.23± 0.04
34.93	Tricosanoic	1.20± 0.01
36.00	Nervonic	0.1± 0.26
36.16	Lignoceric	1.82± 0.02

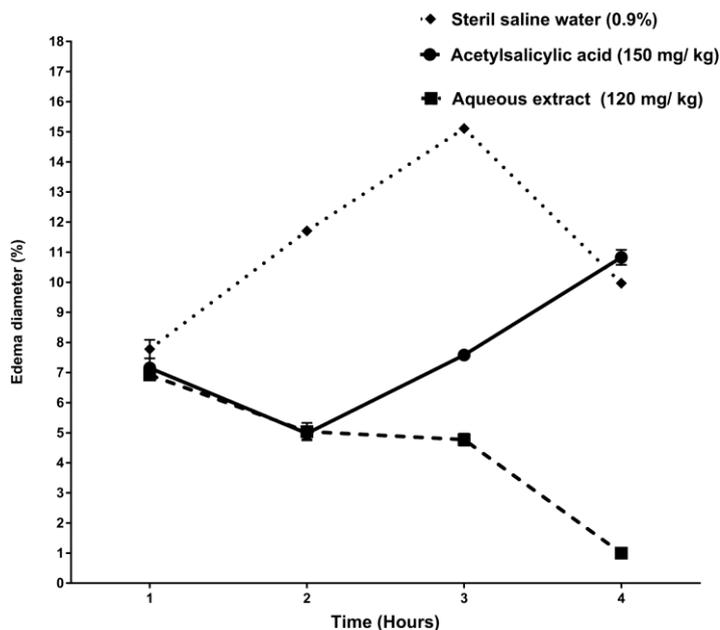
Figures:



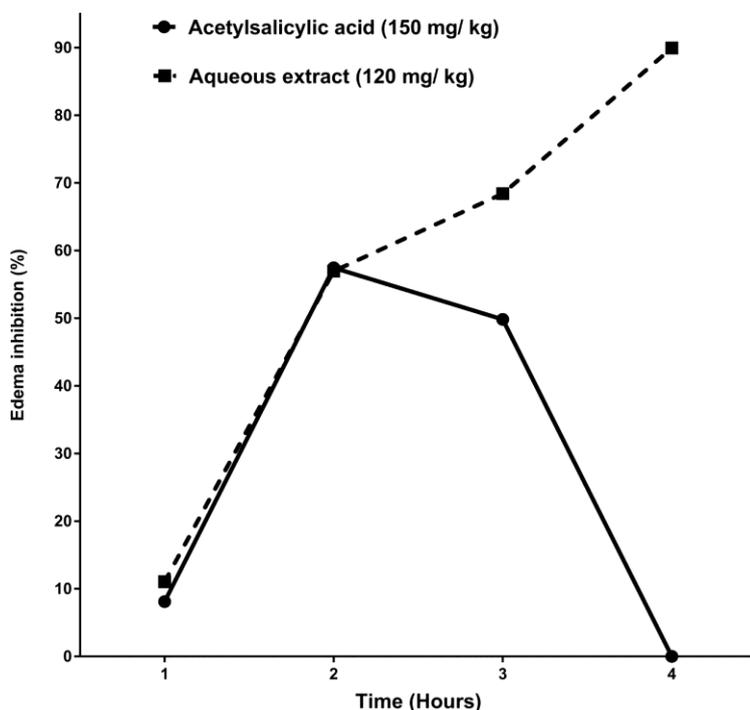
**Figure 1.** *Traganum nudatum* Delile. Morphological characteristics of the plant.



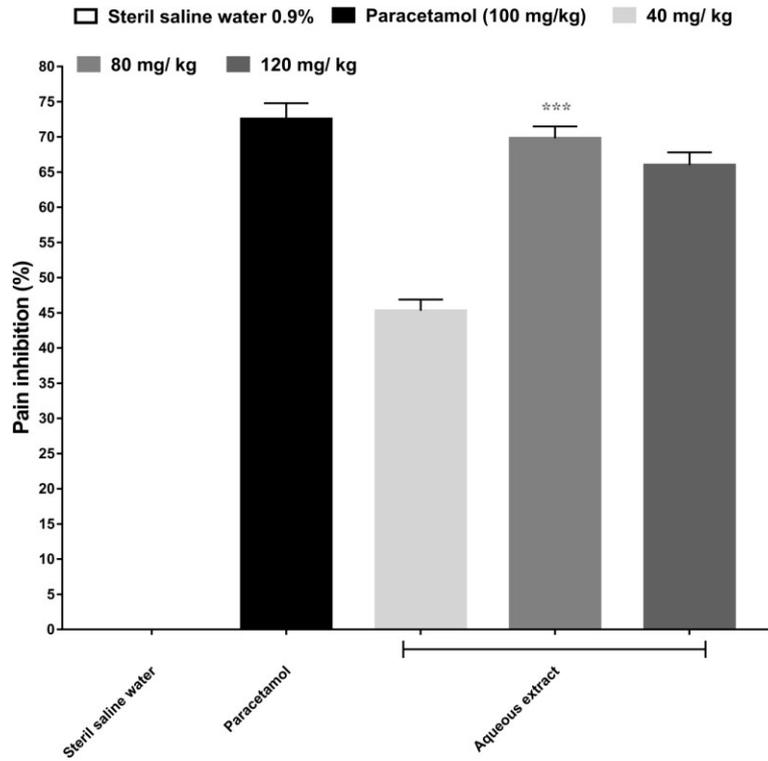
**Figure 2.** Methodological scheme of the phytochemistry study.



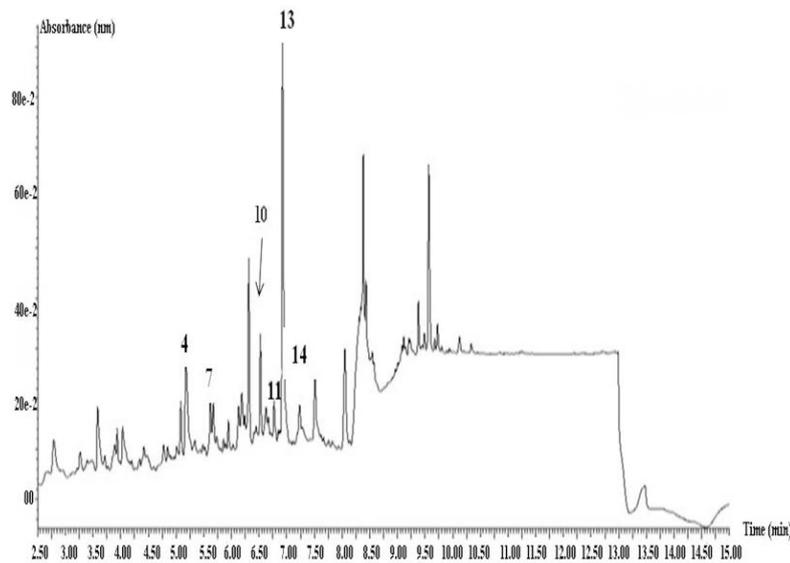
**Figure 3.** Edema diameter of paw injected by carrageenin 1% of mice treated with aqueous extract of *T.nudatum* Del and acetylsalicylic acid. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*), P> 0.05 NS: No significant.



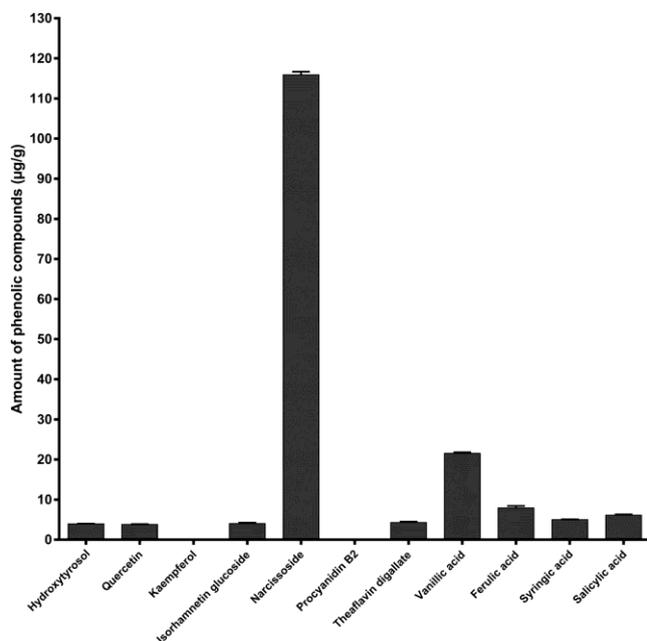
**Figure 4.** Edema inhibition of Albino mice treated with aqueous extract of *T.nudatum* Del and acetylsalicylic acid. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*), P> 0.05 NS: No significant.



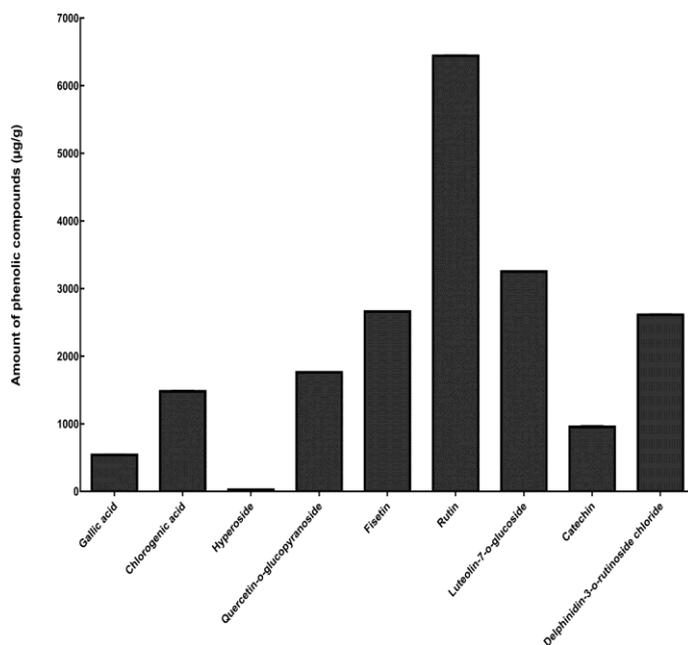
**Figure 5.** Pain inhibition of Albino mice treated with aqueous extract of *T.nudatum* Del and Paracetamol. P<0.05 significant (\*\*), P<0.05 highly significant (\*\*\*), P> 0.05 NS: No significant.



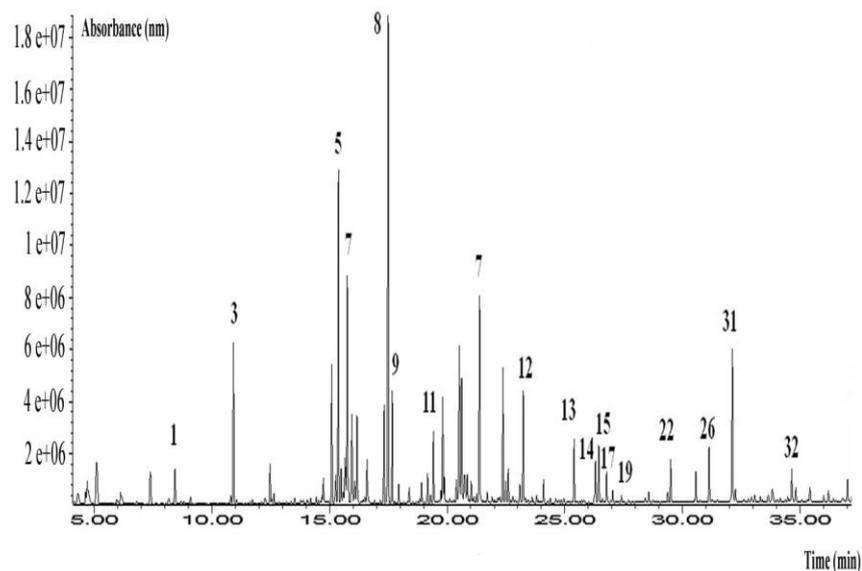
**Figure 6.** UPLC-PDA chromatograms of extract with MeOH/H<sub>2</sub>O and Acetone/H<sub>2</sub>O, UV at 240 nm. Numbered peaks correspond to the identified compounds: (4) Salicylic acid, (7) Kaempferol, (10) Quercetin-o-glucopyranoside, (11) Ferulic acid, (13) Narcissoside, (14) Isorhamnetin glucoside.



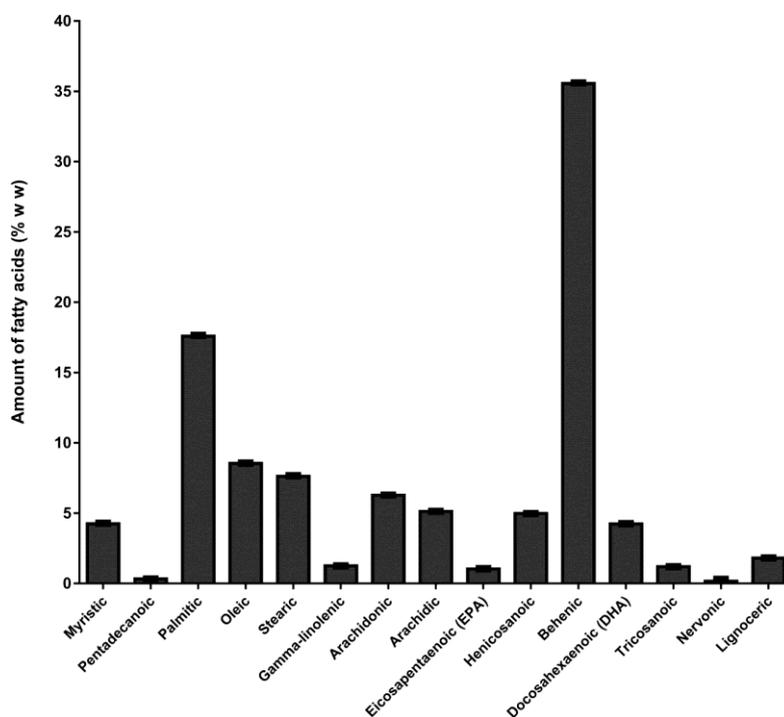
**Figure 7.** Free phenolic compounds content in the plant as determined by UPLC-PDA MS-tQ. Compounds were identified and quantified by comparison to 57 phenolic standard compounds available. All analyses were carried out in triplicates (n=3).



**Figure 8.** Bound phenolic acid content in the plant as determined by UPLC-PDA-MS-tQ. Compounds were identified and quantified by comparison to 57 phenolic standard compounds available. All analyses were carried out in triplicates (n=3).



**Figure 9.** GC-MS chromatograms of volatile compounds of the plant. Numbered peaks correspond to the respective identified compounds: (1) Benzoic acid, (3) Malic acid, (5)-(7) Monosaccharides, (8) Citric acid, (9) Nonanedioic acid, (11) Myristic acid, (12) Margaric acid, (13) Palmitic acid, (14) Ferulic acid, (15) Cinnamic acid, (17) Oleic acid, (19) Linoleic acid, (22) Arachidic acid, (26) Behenic acid, (31) Docosadienoic acid and (32) Lignoceric acid.



**Figure 10.** Fatty acids quantification in the plant as determined by GC-FID. Fatty acids were quantified (% ww) as methyl esters by calibration method using Heptadecanoic acid methyl ester as an internal standard. All analyses were carried out in triplicates (n=3).

**ONLINE SUBMISSION**

**[www.ijps.ir](http://www.ijps.ir)**