

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de : Biologie Animale

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : science biologique
Spécialité : toxicologie

Intitulé :

**Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de
deux plantes médicinales *Punica granatum* et *Cistus sp*, chez les rats
diabétiques**

Présenté par : ATMANI Roufaida

Le 28/06/2022

AYAIDIA Bisma

CHETIOUI Aya Serine

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mr LAID BAHRI (MAA – à l'UFM Constantine 1).

Examineur 1 : Mr MENED AHMED (Pr - à l'UFM Constantine 1).

Examineur 2 : Mr BENREBAI MOUAD (MCA – à l'UFM Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

*Nos profonds remerciements s'adressent en premier lieu au roi de l'animalerie **Monsieur BAHRI LAID**, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique et pour le bon déroulement de ce travail, son aide, sa rigueur, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience, sa disponibilité.*

*Nous exprimons tout le respect, l'appréciation, les remerciements, la gratitude aussi à **Monsieur BOULDJAJ REDOUANE** qui a été un bon superviseur tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'accordent à Dr **MOURI FOUZIA**, pour sa collaboration et son aide nécessaire à la réalisation de notre projet, et ceux qui nous ont aidés à incarner notre idée sur terrain.*

*Nos remerciements **Monsieur MENAD AHMED** professeur à l'université de Constantine à qui revient l'honneur de présider ce jury.*

*À **Monsieur BENREBAI MOUAD** qui a accepté examiner ce travail.*

Nos plus sincères remerciements à nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années de notre parcours.

Dédicaces

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Je dédie ce projet :

A ma très chère mère la tendresse, la sympathie et le sacrifice, qui m'a toujours orienté pour le meilleur.

Mon très cher père qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Toutes les lettres ne peuvent trouver les bons mots, tous les mots ne peuvent exprimer ma gratitude, mon amour et rien au monde ne vaut l'effort que vous avez déployé jour et nuit pour mon éducation. Ce travail est le fruit de vos sacrifices et de vos concessions tout au long de mon parcours. Vos conseils guident toujours mes pas vers le succès. Que Dieu vous préserve pour moi, vous comble d'amour, de bonheur et vous protège de tout mal.

*A mes chères sœurs : **Imen** et **Nour El-Houda** et mes chère frère : **Hamza** et **Mossaab** puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

*A mes chères et meilleurs trinômes : **Aya Serine** et **Besma**.*

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

A toute ma famille.

Roufaida

Dédicaces

Je dédie ce projet :

A ma très chère mère la tendresse, la sympathie et le sacrifice, qui m'a toujours orienté pour le meilleur.

Mon très cher père Merci pour ta patience, tes encouragements et tes orientations durant toutes mes années d'études.

Toutes les lettres ne peuvent trouver les bons mots, tous les mots ne peuvent exprimer ma gratitude, mon amour et rien au monde ne vaut l'effort que vous avez déployé jour et nuit pour mon éducation. Ce travail est le fruit de vos sacrifices et de vos concessions tout au long de mon parcours. Vos conseils guident toujours mes pas vers le succès. Que Dieu vous préserve pour moi, vous comble d'amour, de bonheur et vous protège de tout mal.

A mes chères sœurs : SAFA et RAHMA mes chers frères : ANES et AYOUB et puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.

A mes chères et meilleurs trinômes : ROUFAIDA et BESMA

A mes chères et meilleurs amies : INES et IKRAM qui a partagé toutes les bons et les Mauvais moments avec moi.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

A toute ma famille.

Aya Serine

Dédicaces

En guise de reconnaissance envers mon ALLAH, Le Tout Puissant .Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique Espérant qu'il lui sera utile.

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes chères parents, **Laaha Fouzia et Djamel.***

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte, je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, chaque ligne de ce mémoire chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents, Que dieu les protège.

*A ma grande sœur **Rayene**, merci pour m'encourager et me motiver d'aller plus loin*

*A mes chers meilleurs trinômes : **Aya et Roufaïda***

En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments, en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

A tous ceux que j'aime

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou loin pour que ce projet soit réalisable, je vous dis merci

Besma

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé	Pages
Introduction.....	1
Partie bibliographique	
I.Chapitre1:L'INFLAMMATION	2
I.1.Historique.....	2
I.2.Définition.....	2
I.3.Facteurs et causes de l'inflammation.....	3
I.4.Types de l'inflammation.....	3
I.4.1.Inflammation aiguë.....	3
I.4.2.Inflammation chronique.....	5
I.5.Les acteurs de la réaction inflammatoire.....	5
I.5.1. les médiateurs chimique de l'inflammation.....	5
I.5.2. les cellules de l'inflammation.....	7
I.5.2.2. Les médiateurs cellulaires.....	9
I.5.2.3.Cytokines et chimiokines.....	11
I.6.Stress oxydative et maladie inflammatoire.....	11
I.7.LesPathologies d'inflammation.....	12
I.8. Les anti-inflammatoires.....	13
I.8.1.Les anti-inflammatoires stéroïdiennes (AIS).....	13
I.8.2.Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS).....	14
I.8.3.Anti-inflammatoires naturels.....	14
II. Chapitre 2: LE DIABETE SUCRE ET SES COMPLICATIONS.....	16
II.1. Les principaux types de diabète.....	16
II.1.1. Diabète de type 1.....	17
II.1.2. Diabète de type 2.....	18

II.1.3. Diabète sucré gestationnel.....	18
I.1.4. Types spécifiques de diabète	18
II.1.5. Stress oxydatif et diabète.....	18
II.2. Les complications du diabète.....	19
II.2.1. Les complications aiguës.....	19
II.2.2. Les complications à long terme.....	19
II.2.2.1 Les complications microangiopathique.....	19
II.2.2.2 Les complications macroangiopathiques.....	20
II.2.2.2.1 Le pied diabétique.....	20
II.2.2.2.1.1 La cicatrisation des plaies diabétiques.....	20
II.3. Mécanismes d'action des antidiabétiques	22
II.3.1. L'insuline	22
II.3.2. Metformine	23
II.3.3. Sulfonylurées.....	23
II.3.4. Les thiazolidinediones	24
II.3.5. Les médicaments à effet incrétine.....	24
II.4. Diabète et les plantes médicinales.....	24
III. Chapitre 3 : LES PLANTES MEDICINALES ET LA PHYTOTHERAPIE.....	26
III.1. Les plantes médicinales.....	26
III.1.1. Généralité.....	26
III.1.2. Définition.....	26
III.1.3. Composante des plantes médicinales.....	26
III.1.3.1. Les métabolites primaires.....	26
III.1.3.2. Les métabolites secondaires.....	26
III.2. La phytothérapie.....	30
III.2.1. Définition.....	30

III.2.2. Les différents types de la phytothérapie.....	30
III.2.2.3. Gemmothérapie.....	31
III.2.3. Mode d'extraction et d'utilisation des plantes médicinales.....	31
III.2.3.1. Décoction.....	31
III.2.3.3. Macération.....	31
III.2.3.2. Infusion.....	32
III.2.3.4. Distillation.....	32
III.2.3.5. Poudre.....	32
III.2.3.6. Homogénéisation des tissus végétaux.....	32
III.2.3.7. Concoctions.....	32
III.2.3.8. Digestion.....	32
III.2.4. Les avantages des médicaments à base de plantes.....	32
III.2.5. Inconvénients des médicaments à base de plantes.....	33
IV .Chapitre 4 : PRESENTATION DES DEUX PLANTES ETUDIEES.....	34
IV.1. Présentation de la plante <i>P.granatum</i>	34
IV.1.1. Description de la plante.....	34
IV.1.2. Origine géographique et distribution de la grenade.....	34
IV.1.3. Classification botanique.....	35
IV.1.4. Utilisation traditionnelle.....	35
IV.1.6. Activités biologiques de <i>Punica granatum</i>	36
IV.1.7. Toxicité de <i>P.granatum</i>	38
IV.2.1. Description du Genre <i>Cistus sp</i>	38
IV.2.2. Classification botanique.....	39
IV.2.3. Utilisation thérapeutique et traditionnel.....	39
IV.2.4. Composition chimique.....	40
IV.2.5. Activités biologiques.....	40
IV.2.6. Toxicité de genre <i>Cistus sp</i>	40

Partie expérimentale

Matériel et méthodes.....	42
I. Matériel	42
I.2. Matériel végétal	42
I.1. Matériel animal.....	42
I.3. Réactifs	42
I.4. Appareillage.....	43
II. Méthodes.	43
II.1. Méthodes d'extraction.....	43
II.1.2. Rendement de l'extraction.....	43
II.1.1. Préparation des extraits aqueux infusés.....	43
II.2. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols et des flavonoïdes.....	44
II.2.1. Dosage des composés phénoliques :	44
II.2.1.1. Dosage des composés phénoliques totaux :	44
II.2.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux :	45
II.3. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	46
II.3.1. L'inhibition de la dénaturation de BSA :	46
II.4. La méthode de stabilisation des membranes (Test de l'innocuité et activité anti hémolytique) :	48
II.6. Méthodes de dosage des activités antioxydants in vitro.....	51
II.6.4. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power).....	51
II.6.2. Le test de piégeage du radical ABTS^{•+}.....	52
II.6.3. Le test CUPRAC.....	53
II.6.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	54
II.6.5. Le test Phénanthroline.....	55
II.7. Etude de la toxicité.....	56
8. Méthode de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo.....	57
II.8.1 Evaluation de l'activité antipyrétique.....	57
II.8.2 Evaluation de l'activité analgésique :	58

II.9 Induction de l'œdème inflammatoire aiguë de la patte de rat par le formol chez des rats diabétique et non diabétique :	60
A) Induction du diabète.....	60
B) Traitement des animaux.....	61
II.10. Détermination de l'activité cicatrisante	62
II.11. Evaluation statistique	63
Résultats et discussion	
I. Rendement de l'extraction.....	65
II. Caractérisation quantitative des extraits de plantes.....	66
II.1. Teneur des extraits en polyphénols :	66
II.2. Teneur des extraits en flavonoïdes :	68
III. Activité antioxydant in vitro :	70
III.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	70
III.2. Le test de piégeage du radical ABTS ^{•+}	72
III.3. Le test CUPRAC :.....	74
III.4. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	76
IV. Activité anti-inflammatoire in vitro :	78
III.5. Le test Phénanthroline	79
IV .1. Inhibition de la dénaturation thermique des protéines (BSA)	79
IV .2. Activité anti-hémolytique	81
IV .2.1. Innocuité des extraits vis-à-vis de la cellule érythrocytaire	81
IV .2.1. Test de stabilisation de la membrane des globules rouges.....	82
V. Les tests in vivo.....	84
V.1. Test de toxicité.....	84
V.3. Effet analgésique des extraits	86
V.2. Effet antipyrétique des extraits	88
V.5. Teste de cicatrisation.....	90
V.4. Effet anti-œdémateux des extraits.....	96

Chapitre 4 : Business plan.....	99
1) Forme légale de l'entreprise.....	100
2) Idée de l'entreprise.....	100
3) Etude du marché et segmentation.....	101
4) Plan marketing (PRODUIT)	101
4.1 Plan marketing, Prix.....	101
4.2 Plan marketing, place, Publicité.....	102
4.3 Plan de vente mensuelle.....	103
5) 1. Organigramme	103
2. Plan de produit.....	104
6) 1. Investissement et amortissement.....	104
2. Formulaire d'amortissement.....	105
3. Différents couts de l'entreprise.....	106
Conclusion	109
Référence bibliographie.....	112

Liste de figures

Figure 1 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire (**Ghalem, 2014**).

Figure 2 : le système du complément (**Kumar et al., 2014**).

Figure 3 : la cascade de l'Acide Arachidonique (**Lakhani et al., 2009**).

Figure 4 : Régulation du taux de sucre dans le sang au moment des repas (**Marieb et Hoehn, 2015**).

Figure 5 : dysrégulation des macrophage dans les plaies diabétiques (**Barman et Koh, 2020**).

Figure 6 : (a) structure de l'acide gallique ; (b) structure de l'acide ellagique (des tanins hydrosoluble) (**Kurek-Górecka et al., 2014**)

Figure 7 : unité d'isoprène (**Jouault, 2012**)

Figure 8 : (A) le grenadier, (B) la fleur de grenadier (C) la baie de grenadier (**Dossin, 2019**).

Figure 9 : la fleur de ciste (**original**).

Figure 10 : Méthode de préparation des extraits aqueux (**BIORENDER**).

Figure 11 : Protocole de dosage des composés phénoliques (**BIORENDER**).

Figure 12 : Protocole de dosage des flavonoïdes (**BIORENDER**).

Figure 13 : Protocole de l'inhibition de la dénaturation de BSA (**BIORENDER**).

Figure 14 : Protocole du test de l'innocuité (**BIORENDER**).

Figure 15 : Protocole de la stabilisation de la membrane des globules rouges (**BIORENDER**).

Figure 16 : Equation du radical DPPH transformé en DPPHH (**Massaro et al., 2016**).

Figure 17 : Formation d'un radical ABTS stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium (**Marc et al., 2004**).

Figure 18 : Formation de $\text{Cu}(\text{Nc})^+$ à partir de $\text{Cu}(\text{Nc})_{22}^+$ par antioxydant (**özyürek et al., 2011**).

Figure 19 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH) (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).

Figure 20 : Réaction de la 1,10-phénanthroline avec l'ion Fe^{+2} (complexe de Ferrand) (**Kumar, 2017**).

Figure 21 : Protocole général des tests antioxydants faite en CRBT (**BIORENDER**).

Figure 22 : Protocole d'étude de la toxicité. (**BIORENDER**).

Figure 23 : Protocol de l'activité antipyrétique (**BIORENDER**).

Figure 24 : Protocol de l'activité analgésique (**BIORENDER**).

Figure 25 : Protocole d'induction du diabète type1(**BIORENDER**).

Figure 26 : Induction de l'œdème inflammatoire aigue de la patte de rat par le formol(**BIORENDER**).

Figure 27 : Protocole de l'activité cicatrisante (**BIORENDER**).

Figure 29 : Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique (Moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'Acide Tannique (Moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 31 : Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits équivalant d'acide gallique.

Figure 32 : Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits équivalant d'acide Tannique.

Figure 33 : Droite d'étalonnage de la quercétine (Moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 34 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits aqueux équivalant quercétine.

Figure 35 : Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH^{*} des antioxydants de références et des extraits aqueux testés (Moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 36 : Pourcentages d'inhibition du radicale ABTS^{*} des antioxydants de références et des extraits testés (Moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 37 : Evaluation de l'activité antioxydant des extraits par la méthode CUPRAC (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Figure 38 : Evaluation de l'activité antioxydant des extraits par la méthode FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Figure 39 : Evaluation de l'activité antioxydant des extraits par la méthode Phénanthroline (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Figure 40 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation du BSA.

Figure 41 : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration des extraits testés.

Figure 42 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique et thermique en fonction des différentes concentrations des extraits testés.

Figure 43 : Observation du foie des souris mortes des extraits étudiés.

Figure 44 : Effet des différents extraits et du tramadol, aspirine et aspigique sur le nombre de contortion induit par l'administration de l'acide acétique (1%) (Effet analgésique).

Figure 45 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats normaux (Pourcentage d'inhibition de l'œdème).

Figure 46 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats rendus diabétique par streptozotocine (Pourcentage d'inhibition de l'œdème).

Figure 47 : Résultats souris traité avec l'extrait aqueux de *P. granatum* (A)/souris traité avec la Mycoside (B)

Figure 48 : Logo et Carte visite de la marque / forme du produit

Listes des tableaux

Tableau 1 : les facteurs déclenchant de la réaction inflammatoire (Mathieu et Guimezanes, 2011).

Tableau 2 : Caractéristiques spécifiques de l'inflammation dans divers tissus et maladies (Netea et al., 2017).

Tableau 3 : réaction des plantes sur le potentiel inflammatoire (Azab et al., 2016).

Tableau 4 : Rendement et caractéristiques des extraits aqueux des plantes.

Tableau 5 : Le pouvoir antioxydant (exprimé par IC_{50} (en $\mu g/ml$)) des antioxydants de références et des extraits testés.

Tableau 6 : le pouvoir antioxydant (exprimé par IC_{50} (en $\mu g/ml$)) des antioxydants de références et des extraits testés.

Tableau 7 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu g/ml$)) des antioxydants de références et des extraits testés.

Tableau 8 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu g/ml$)) des antioxydants de références et des extraits testés.

Tableau 9 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu g/ml$)) des antioxydants de références et des extraits testés.

Tableau 10 : Le pouvoir anti-inflammatoire *in vitro* (exprimé par IC_{50} (en $\mu g/ml$)) d'un anti-inflammatoire de références et des extraits testés.

Tableau 11 : différents comportements des souris dans le test de toxicité à dose 100 g/kg et 200 g/kg.

Tableau 12 : Variation de la température provoquée par les extraits sur l'hyperthermie induite chez le rat par la levure de bière : Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ; n = 6 pour chaque groupe.

Tableau 13 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats normaux et des rats rendus diabétique par streptozotocine : Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ; n = 5 pour chaque groupe.

Tableau 13 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats normaux et des rats rendus diabétique par streptozotocine : Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ; n = 5 pour chaque groupe.

Tableau 14 : Effet cicatrisant de l'extrait aqueux du *P. granatum* (les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=8)).

Tableau 15 : Forme légale de l'entreprise

Tableau 16 : Idée d'entreprise

Tableau 17 : Etude du marché et segmentation

Tableau 18 : Plan marketing (PRODUIT)

Tableau 19 : Plan marketing, prix

Tableau 20 : Plan marketing (place, Publicité)

Tableau 21 : Plan des ventes mensuelles

Tableau 22 : Organigramme

Tableau 23 : Plan de production produit pour les fabrications

Tableau 24 : Investissements et amortissement

Tableau 25 : Formulaire d'amortissement

Tableau 26 : Différents couts de l'entreprise

Tableau 27 : Tous les différents couts de l'entreprise

Listes des abréviations

ABTS : 2,2- azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6- sulphonate

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGE: Advanced glycation end-product

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AIS : Anti-Inflammatoire Stéroïdien

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

BSA : Albumine sérum bovi

CIS : *cistus sp*

CLR : Les récepteurs de lectine de type C

COX : Cyclo-Oxygénase

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

DAMP: Damage-associated molecular patterns

DPPH: 2,2-diphényle-1-picryl hydrazyl

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase 4

ECM : extracellular matrix

Ext aq : extrait aqueux

GLP-1 : glucagon-like peptide 1

GRE : grenade (*P. granatum*)

IFN γ : Interferon-gamma

IL-6, 8, 4,10 et 13 : Les interleukines 6, 8, 4, 10 et 13

LB : Lymphocytes B

LT : Lymphocytes T

LOX : Lipooxygénases

LXA4, LXB4 : Les lipoxines

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MMP : métalloprotéinase matricielle

NO : Oxyde Nitrique

NOS : Oxyde Nitrique Synthétase

$\cdot\text{OH}$: radical hydroxyle

O_2^- : Le radical anionique super oxyde

P. Granatum : Punica Granatum

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns

PBS: Tampon phosphate salin

PG : Prostaglandine

PH : Potentiel d'hydrogène

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptors

PRR : Pattern recognition receptor

PPT : Polyphénols totaux

ROS : Eréactives de l'oxygène

TNF- α : Le facteur de nécrose tumorale- α

UV : Ultra-violet

TLR : Les récepteurs de type Toll

$\mu\text{g} / \text{ml}$: Microgramme par millilitre

μl : Microlitre

Résumé

Le diabète est l'un des problèmes médicaux majeurs, qui peut endommager les cellules ou les organes de diverses parties du corps. L'objectif de ce travail vise à déterminer l'effet anti inflammatoire in vivo et in vitro des extraits aqueux en tant que molécules bioactives sur le diabète expérimental de type 1 de t induit par streptozotocine.

Premièrement, l'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin ciocalteu a montré que l'extrait aqueux de *Cistus sp* est plus riche en polyphénols ($101,73 \pm 6,62$ et $94,50 \pm 0,33$ EAG/g EXT respectivement) et en flavonoïdes ($45,08 \pm 1,13$ et $31,14 \pm 1,90$ mg EQU/g EXT) que l'extrait aqueux de écorce de *P.gratanum*, ces valeurs sont de bons indices du potentiel thérapeutique des extraits, car beaucoup d'activités biologiques sont intimement liées à l'aspect quantitatif mais aussi qualitatif de ces biomolécules.

La deuxième étape consiste l'évaluation de l'activité d'antioxydant qui a été déterminé par la méthode du DPPH, le test du ABTS et la méthode de FRAP, CUPRAC et phenanthroline, selon les résultats on a confirmé que les deux extraits sont de forts piègeurs de radicaux libres et peuvent être considérés comme une bonne source d'antioxydants naturels à des fins médicinales.

La troisième étape consiste en l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine et le test de protection de la membrane du globule rouge vis-à-vis du stress osmotique et thermique. Cette étude a montré que l'extrait aqueux de *Cistus sp* possède une excellente capacité à protéger l'albumine contre la dénaturation thermique ($IC_{50} = 56,28 \pm 6,61 \mu\text{g} / \text{ml}$) par rapport à l'extrait aqueux des écorces de *p.granatum* ($IC_{50} = 16,31 \pm 1,21 \mu\text{g} / \text{ml}$). De même, l'analyse de la protection de la membrane du globule rouge vis-à-vis du stress osmotique et thermique a montré que l'efficacité de l'extrait aqueux de *Cistus sp* est supérieure à celle des écorces de *P.granatum* ($80,31 \pm 4,99$ contre $77,50 \pm 2,49$ %).

Ainsi, il s'agissait au cours de ce travail, d'évaluer les effets de l'extrait aqueux sur la cicatrisation, la douleur, la fièvre, et l'inflammation. L'application locale de la pommade de l'extrait des écorces de *P.granatum* a réduit la surface des plaies de 88%. Le traitement des souris par 100 mg/kg d'extrait aqueux des deux plantes inhibe (83%) la douleur induite par l'acide acétique. L'étude de l'activité anti-inflammatoire chez les rats sains et diabétiques a révélé une bonne activité anti-œdémateuse des deux plantes. Le prétraitement des rats non diabétiques par l'extrait aqueux de *Cistus sp* à la dose de 100mg/kg a provoqué un effet inhibiteur maximal de l'œdème de la patte (97,89%) 3 heures après l'administration du formol, ce résultat est meilleur que celui de l'autre extrait. Tant dit que chez les rats diabétiques le meilleur effet inhibiteur maximal a été marqué dans l'extrait de *P.granatum* à la même dose (70,61%) et a été enregistré à la troisième heure.

Ces résultats confirment la validité de l'indication traditionnelle des deux plantes dans le traitement de plusieurs maladies. Toutefois, de nouvelles études sont nécessaires afin d'identifier les molécules biologiquement actives pour donner avec précision le/les mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de ces effets.

Mots clés : l'inflammation, *Cistus sp*, *Punica granatum*, diabète

Abstract

Diabetes is one of the major medical problems, which can damage cells of the body organs. The objective of this work is to determine the anti-inflammatory effect in vivo and in vitro of aqueous extracts as bioactive molecules on experimental type 1 diabetes induced by streptozotocin.

Quantitative evaluation of total polyphenols using the Folin ciocalteu method showed that the AQ EXT of *Cistus sp* richer in polyphenols (101.73 ± 6.62 and 94.50 ± 0.33 EAG/g EXT respectively) and flavonoids (45.08 ± 1.13 and 31.14 ± 1.90 mg EQU/g EXT) than the AQ EXT of *P. granatum*, these values are good indications of the therapeutic potential of both extracts.

The evaluation of antioxidant activity that was determined by the DPPH method, the ABTS test and the FRAP method, CUPRAC and phenanthroline, according to the results it was confirmed that both extracts have strong scavengers of free radicals. Evaluation of anti-inflammatory activity in vitro by the method of inhibition of thermal denaturation of albumin and the red blood cell membrane protection test. This study showed that *Cistus sp*'s AQ EXT has an excellent ability to protect albumin against thermal denaturation ($CI_{50} = 56.28 \pm 6.61 \mu\text{g/ml}$) compared to aqueous extract of *P. granatum* ($CI_{50} = 16.31 \pm 1.21 \mu\text{g/ml}$). In addition, analysis of the protection of the red blood cell membrane from osmotic and thermal stress showed that the efficiency of *cistus sp*'s AQ EXT is higher than that *P. granatum* (80.31 ± 4.99 versus $77.50 \pm 2.49\%$). Our study included evaluation of the impact of the aqueous extracts on pain, fever, Inflammation and wound healing. topical application of the *P. granatum* reduced the surface of wounds 88%. The treatment of mice by 100 mg/kg of AQ EXT of both plants inhibits acetic acid-induced pain by (83%). The study of anti-inflammatory activity in diabetic rats revealed good anti-edematous activity of both plants. Pre-treatment of non-diabetic rats with AQ EXT of *cistus* at a dose of 100mg/kg caused a maximum inhibitory effect of leg edema (97.89%) better than *P. granatum* extract after 3 hours of formalin administration. In diabetic rats the best inhibitory effect was marked at the third hour in *P. granatum* extract by (70.61%).

These results confirm the validity of the traditional indication of both plants in the treatment of several diseases. However, further studies are needed to identify biologically active molecules to accurately indicate the molecular mechanism(s) responsible for these effects.

Keywords : inflammation, *Cistus sp*, *Punica granatum*, diabetes.

المخلص :

مرض السكري هو واحد من المشاكل الطبية الرئيسية ، والتي يمكن أن تلحق الضرر بخلايا أعضاء الجسم. الهدف من هذا العمل هو تحديد تأثير مضادات للالتهاب في الجسم الحي وفي المخبر للمستخلصات المائية كجزيئات نشطة بيولوجيا على مرض السكري التجريبي من النوع 1 الناجم عن الستيروتوزوتوسين. أظهر التقييم الكمي للبوليفينولات الكلي بواسطة طريقة Folin ciocalteu أن المستخلص المائي *Cistus sp* أكثر ثراء في البوليفينولات (6.62 ± 101.73 و 0.33 ± 94.50 EAG / g EXT على التوالي) والفلافونويدات (1.13 ± 45.08 و 1.90 ± 31.14 mg EQU / EXt) من المستخلص المائي *P. gratunum* ، تعتبر هذه القيم مؤشرات جيدة على الإمكانيات العلاجية لكلا المستخلصين.

وفقا لنتائج تقييم النشاط المضاد للأكسدة الذي تم تحديده بواسطة طريقة DPPH ، واختبار ABTS وطريقة FRAP ، CUPRAC و phenanthroline ، تم التأكيد على أن كلا المستخلصين لهما قدرة قوية على محاصرة الجذور الحرة. تم تقييم النشاط المضاد للالتهاب في المختبر بطريقة تثبيط التمسح الحراري للألبومين واختبار حماية غشاء كريات الدم الحمراء مقابل الإجهاد الاسموزي و الحراري ، حيث أظهرت هذه الدراسة أن المستخلص المائي لـ *Cistus sp* لديه قدرة ممتازة على حماية الألبومين من التمسح الحراري ($CI_{50} = 56.28 \pm 6.61 \mu\text{g} / \text{ml}$) مقارنة بالمستخلص المائي لـ *P. granatum* ($CI_{50} = 16.31 \pm 1.21 \mu\text{g} / \text{ml}$) وبالمثل ، أظهر تحليل حماية غشاء خلايا الدم الحمراء من الإجهاد الاسموزي و الحراري أن المستخلص المائي لـ *cistus* أكثر كفاءة من مستخلص *P. granatum* (77.50 ± 2.49) مقابل $(80.31 \pm 4.99)\%$.

شملت دراستنا تقدير أثر المستخلصين على الألم ، الحمى ، الإلتهاب و إنتنام الجروح ، التطبيق الموضعي لمرهم مستخلص *P. granatum* قلل من سطح الجروح بـ 88 % ، كما أظهرت نتائج علاج الفئران بـ 100 ملغ / كغ من المستخلص المائي لكلا النباتين أن لهما مفعول مسكن للألم بنسبة أكبر من 83 % مع العلم بأن هذا الألم ناجم عن حقن حمض الخليك بتركيز 1%.

كشفت دراسة النشاط المضاد للالتهابات لكلا المستخلصين في الجرذان السليمة والجرذان المصابة بداء السكري عن نشاط جيد مضاد للوذمة ، حيث تسببت المعالجة المسبقة للجرذان السليمة بالمستخلص المائي *cistus* بجرعة 100 ملغم / كغم بأقصى تأثير مثبت لوذمة الساق (97.89%) بعد 3 ساعات من إعطاء الفورمالين مقارنة بمستخلص *P. granatum* . في الجرذان المصابة بالسكري ، كما سجل أفضل تأثير مثبت للوذمة (70.61%) عند الجرذان المصابة بداء السكري لمستخلص *P. granatum* .

تؤكد هذه النتائج صحة الإستخدام الطبي التقليدي لكلا النباتين في علاج العديد من الأمراض. ومع ذلك ، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتحديد الجزيئات النشطة بيولوجيا و معرفة الآلية (الآليات) الجزيئية المسؤولة عن هذه الآثار العلاجية .

الكلمات المفتاحية: الإلتهاب ، *Punica granatum* ، *Cistus sp* ، داء السكري.

INTRODUCTION

Introduction

Le diabète est une maladie du système endocrinien et un trouble métabolique chronique caractérisé par une glycémie élevée résultant d'une carence absolue ou relative en insuline, dans le contexte d'un dysfonctionnement des cellules β , d'une résistance à l'insuline ou des deux. Selon les prévisions, 693 millions d'adultes seront touchés d'ici 2045 soit une augmentation de plus de 50 % par rapport à 2017 (Cole & Florez, 2020).

Il est établi que le diabète du type 1 est une maladie auto-immune ; en outre, les mécanismes inflammatoires sont de plus en plus liés à la pathogenèse de la résistance à l'insuline (Yan et al., 2008). L'hyperglycémie non contrôlée chez les patients atteints de diabète peut endommager les cellules des organes de diverses parties du corps, Il s'agit des complications microangiopathiques et macroangiopathiques (La science pour la santé, 2019). En effet, le pied diabétique est une complication particulièrement fréquente et potentiellement dévastatrice de la maladie du diabète avec un taux d'amputation élevé de membres inférieurs (Nicodème et al., 2015).

Les niveaux de stress oxydatif et les ROS sont directement liés à l'inflammation et à l'augmentation de la résistance à l'insuline (Charlton, 2021 ; Yuan, 2019). Un nombre considérable d'études montrent que des concentrations élevées de biomarqueurs de l'inflammation, tels que la protéine chimique de la chimie des monocytes (MCP) 1, l'interleukine (IL) -8, la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), l'IL-6 et la nécrose tumorale les facteurs alpha (TNF- α) sont impliqués dans la progression des complications du diabète (Jin, 2018 ; Hotamisligil, 2006).

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (AINS et AINS, respectivement) sont actuellement les médicaments les plus utilisés dans le traitement des maladies aiguës à troubles inflammatoires, malgré leurs effets secondaires rénaux et gastriques négatifs. maintenant, il y a un besoin des nouveaux médicaments anti-inflammatoires sûrs, puissant, non toxique ou moins toxique (Verma, 2016).

Les produits naturels sont une source riche pour la découverte de nouveaux médicaments en raison de leur diversité chimique. Toutes les plantes produisent des composés chimiques dans le cadre de leurs activités métaboliques normales. Ceux-ci sont arbitrairement divisés en métabolites primaires, tels que les sucres et les lipides..., trouvés dans toutes les plantes et les métabolites secondaires ou phytochimiques tels que les flavonoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes... etc. (Hashemi et Davoodi, 2011). Ils jouent un rôle majeur dans

Introduction

la guérison de nombreuses maladies associées à l'inflammation. Par conséquent, les développements de puissants médicaments anti-inflammatoires à partir des produits naturels sont désormais à l'étude (**Kumar et al., 2013**).

L'objectif de cette étude vise à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des plantes médicinales *Punica granatum* et *Cistus sp*, comme source de molécules bioactives utilisables dans le domaine pharmaceutique, aussi bien pour vérifier l'efficacité que son innocuité pour les gens qui l'utilisent. Dans ce cadre, nous avons donc choisi de mener une étude scientifique sur ces plantes afin de contribuer à sa valorisation par la vérification de leurs activités anti-inflammatoires sur les rats diabétique, la confirmation de leurs indications thérapeutiques et aussi la recherche de nouvelles activités biologiques intéressantes sur ces deux plantes.

Ce travail vise à étudier l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux des plantes *Cistus sp* et l'écorce de *P.granatum* (in vitro, in vivo) Cette étude sera subdivisée en trois parties :

Une première est une synthèse bibliographique : Le premier chapitre est consacré à un rappel sur les différents types d'inflammation et les anti-inflammatoires. Nous avons ensuite abordé un deuxième chapitre sur le diabète et ces différents types. Dans le troisième chapitre, on a abordé les complications du diabète et la relation entre l'inflammation et le diabète dans le pied diabétique. Le quatrième chapitre est consacré à une synthèse sur la phytothérapie et les espèces végétales étudiées.

- La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées lors du travail expérimental. Elle traite 4 parties :

La première sert à l'extraction aqueuse de la partie aérienne de *Cistus sp* et de l'écorce de *P. granatum* ensuite l'étude quantitative des polyphénols par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

La deuxième sert à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro (Test de la dénaturation protéique, test d'hémolyse des globules rouges et test de la stabilisation membranaire).

- Tester le pouvoir antioxydant des extraits par plusieurs tests in vitro (DPPH, ABTS, test phenantroline, test CUPRAC et chélation du fer ferreux).

L'étude de l'effet anti-inflammatoire in vivo a été effectuée étudiées en utilisant :

Introduction

- Etudier le profil toxicologique des extraits aqueux d'écorce de *P.granatum* et de *Cistus sp*
- Tester l'effet analgésique et antipyrétique des deux plantes chez les souris.
- Test (anti-œdémateux) par mesure du volume de l'œdème chez des rats diabétiques et non diabétique traités par le formol 1% au niveau de la patte postérieure droite.
- Test de cicatrisation de l'extrait aqueux d'écorce de *P.granatum* sur les souris

La quatrième partie, est consacrée aux différents résultats obtenus au cours de cette expérimentation ainsi qu'aux des discussions.

Le quatrième chapitre contient un business plan d'un projet de fin d'étude réalisé que nous avons mis en place sur le terrain

Enfin, une conclusion globale et les perspectives envisagées pour la suite du projet seront décrites.

Etude Bibliographique

CHAPITRE I : L'INFLAMMATION

I.1. Historique :

L'inflammation est connue de l'humanité depuis au moins quelques milliers d'années, en partie parce qu'elle accompagnait deux fléaux majeurs du passé, les plaies et les infections, et en partie parce qu'elle est plutôt discrète. Bien que des références à l'inflammation puissent être trouvées dans les textes médicaux anciens comme les égyptiens 1650 avant JC (décrites sur papyrus égyptien). Apparemment le premier à définir ses symptômes cliniques était le médecin romain Cornelius Celsus au 1^{er} siècle après JC. Ces symptômes sont devenus connus sous le nom de quatre signes cardinaux de l'inflammation : rubor et tumor cum calore et dolore (rougeur et gonflement avec la chaleur et la douleur) (**Medzhitov, 2010**). Les bases physiologiques de ces signes cardinaux ont été révélées bien plus tard par Augustus Waller et Julius Cohnheim (milieu du XIXe siècle), qui découvrirent la migration des leucocytes hors des vaisseaux sanguins, ainsi que d'autres changements vasculaires caractéristiques d'une réponse inflammatoire aiguë. Quelques années plus tard (fin du XIXe siècle), Elie Metchnikoff découvrait la phagocytose (**Ketty, 2011**). Ce dernier a mis en particulier l'accent sur le rôle bénéfique de l'inflammation et a montré le rôle central de deux types cellulaires, les macrophages et les neutrophiles. À la fin du 19^{ème} siècle, il a été reconnu que l'évolution des populations cellulaires résultant de la prolifération locale était une caractéristique clé de nombreux modèles d'inflammation (**Mayer et Bhikha, 2013**).

Aujourd'hui, une bonne compréhension du phénomène de l'inflammation repose sur la découverte de différents médiateurs chimiques de l'inflammation et de leurs rôles dans les différentes étapes de celle-ci. Grâce à ces découvertes, la recherche médicamenteuse sur les anti-inflammatoires a ainsi pris toute son importance (**Kirassian, 2015**).

I.2. Définition :

L'inflammation est un processus biologique crucial pour maintenir l'homéostasie (**Sene et al., 2019**). Son but est d'identifier, de détruire et d'éliminer toutes les substances qui sont étrangères et la réparation du tissu lésé, parfois l'inflammation peut devenir néfaste lorsqu'elle est victime d'un dysfonctionnement (**Gaubert et Camille, 2018**).

IL est considérée comme le facteur moteur de nombreuses maladies, y compris l'athérosclérose, le cancer, l'auto-immunité et les infections chroniques et un contributeur majeur dans les conditions liées à l'âge (**Netea et al., 2017**).

I.3. Facteurs et causes de l'inflammation :

Les causes des réponses inflammatoires sont multifactorielles et représentent des agents pathogènes. Ces facteurs déterminent les dommages cellulaires et tissulaires qui déclenchent l'inflammation :

Tableau 1 : les facteurs déclenchant de la réaction inflammatoire (Mathieu et Guimezanes, 2011)

Les facteurs	Les causes
• Corps étranger	Exogène : -Microbiens (PAMP, Facteur de virulence) -Non microbiens (Allergènes, Irritants, Corps étrangers, Toxique) Endogène : Cellulaire, Plasmatique, Cristaux, Matrice cellulaire
• Infection	par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons)
• Facteurs physiques	traumatisme, chaleur, froid, rayonnement
• Agents chimiques	corrosifs, toxines, venins
• Attaque immunitaire anormale	réponse immunitaire anormale, allergie, auto-immunité
• Défaut de vascularisation	réponse inflammatoire secondaire à une nécrose ischémique

Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par :

- Augmentation du tissu de granulation.
- Augmentation de la perméabilité vasculaire.
- Perturbation de la structure des tissus.
- Augmentation de la dénaturation de protéines (Scott *et al.*, 2014).

I.4. Types de l'inflammation :

L'inflammation aiguë est différente de l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est la première réponse à l'agression. C'est instantané et rapide. Dès lors que l'inflammation est anormalement persistante, on dit inflammation chronique, puis on retrouve des manifestations pathologiques associées à ce mécanisme (Schwartz, 2011).

I.4.1. Inflammation aiguë :

C'est une procédure courte, dure de quelques minutes à quelques jours, et ses principales caractéristiques sont la fuite de protéines plasmatiques ou de liquide et le mouvement des leucocytes dans une zone extravasculaire (Markiewski et Lambris, 2007).

Ces réactions cellulaires et vasculaires sont intermédiées par des facteurs chimiques produits à partir des cellules ou du plasma et sont responsables des symptômes cliniques

classiques de l'inflammation, Il y a trois étapes principales dans les réponses inflammatoires aiguës qui comprennent l'augmentation du flux sanguin vers la zone enflammée, suivie d'une vasodilatation et d'une perméabilité vasculaire accrue avec fuite de plasma de la microcirculation et migration des leucocytes phagocytaires vers les tissus environnants. (Kobayashi *et al.*, 2014).

I.4.1.1. Phase vasculaire :

La phase est immédiate, de l'ordre de quelque minute et caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème et un dégagement de chaleur locale. Cette phase se produit une altération des micro-capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives : (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine et dérivés du complément) et l'exsudation des cellules et du plasma vers le tissu (Ibsen et Phelan, 2018).

I.4.1.2. Phase cellulaire (Amplification) :

La réponse cellulaire fait suite à la phase vasculaire. Se déroule en trois étapes essentielles, la première met en jeu les cellules de l'immunité innée (Les polynucléaires neutrophiles et monocyte/macrophage), la seconde comprend une réponse non adaptative précoce (lymphocytes porteurs des récepteurs pour l'antigène) et la dernière étape, le développement d'une réponse immunitaire adaptative (activation des lymphocytes T (LT) et B (LB) spécifique (Ibsen et Phelan, 2018)

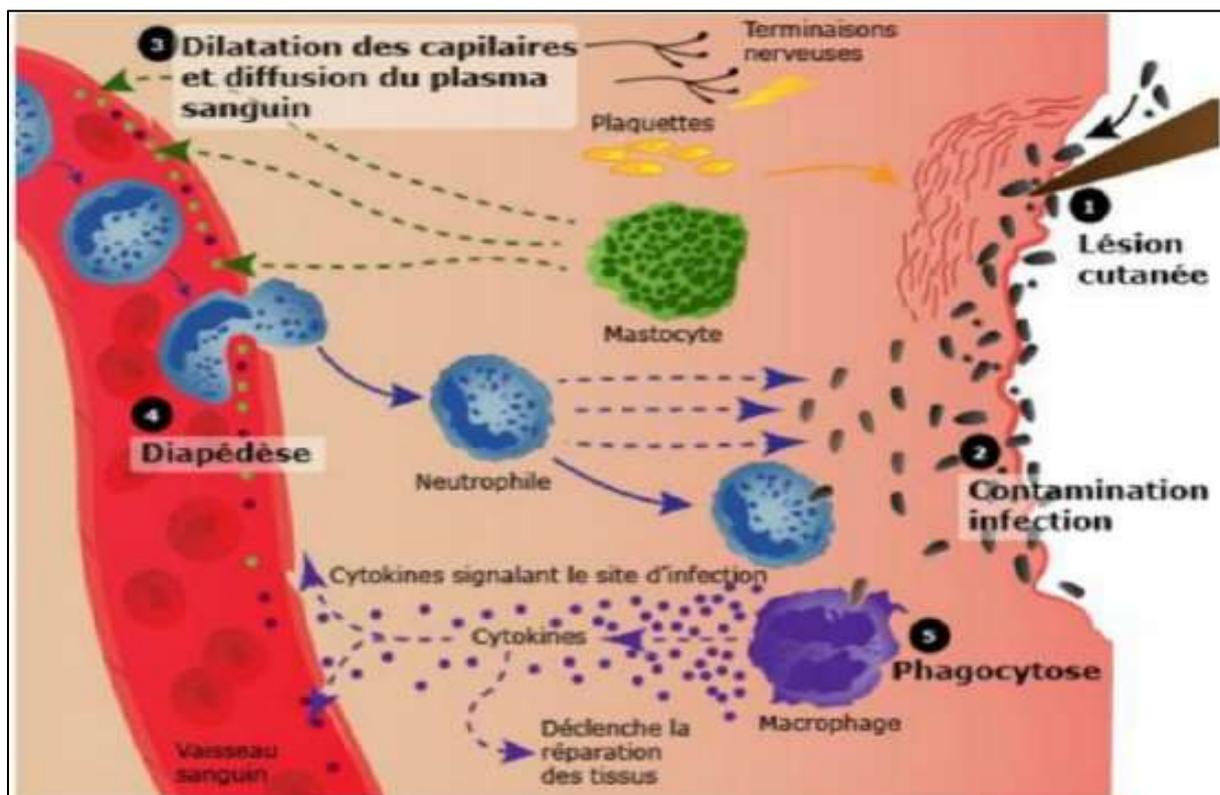


Figure 1 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire (**Ghalem, 2014**).

I.4.1.3. Phase de réparation (Effectrice) :

C'est la phase de résolution permettant la restauration du tissu lésé. En effet les conditions les plus favorables, les agents agresseurs et les débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages qui vont sécréter des médiateurs induisant ainsi la réparation tissulaire, les cellules fibroblastes et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation (**Ibsen et Phelan, 2018**).

I.4.2. Inflammation chronique :

L'inflammation chronique est également appelée inflammation lente et à long terme durent des périodes prolongées de plusieurs mois à plusieurs années. Généralement, l'étendue et les effets de l'inflammation chronique varient selon la cause de la blessure et la capacité du corps à réparer et à surmonter les dommages (**Pahwa, 2020**).

L'inflammation aiguë persistante devient chronique en raison de la mauvaise gestion de sa phase de résolution de l'inflammation. Cette activation persistante peut être due à une incapacité à éliminer le stimulus inflammatoire, à une procession continue de leucocytes qui joue le rôle de régulateur par la production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui endommagent et remodelent continuellement les tissus, ou à une situation qui maintient ces leucocytes au site de l'inflammation (**Roy, 2013**).

I.5. Les acteurs de la réaction inflammatoire :

I.5.1. les cellules de l'inflammation :

Ce sont des cellules du système immunitaire inné qui éliminent les microbes et qui représente le système de défenses de l'hôte contre les agents infectieux et les blessures (**Kantari et al., 2008**) par l'intermédiaire de récepteurs de reconnaissance de formes (Pattern recognition receptor PRR) codés par la lignée germinale pour détecter des modèles microbiens invariants. Les PRR sont principalement exprimés par les cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, mais aussi par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales (**Netea et al., 2017**). La stimulation cellulaire déclenche des processus inflammatoires par la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires ces cellules sont :

I.5.1.1. Les cellules phagocytaires :

A. Les macrophages :

Sont des cellules du système immunitaire inné qui libèrent à la fois des médiateurs pro-inflammatoires et antibactériens en plus des micro-organismes phagocytaires les macrophages ont la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T et de fonctionner comme effecteurs pour l'immunité à médiation cellulaire (**Hirayama et al., 2018**).

B. Les monocytes :

Les monocytes sont des leucocytes, des éléments nucléés du sang circulant, ils peuvent se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages qui interviennent dans les réponses immunitaires innées et adaptatives à la maladie intrinsèquement (**Yang et al., 2014**), les monocytes jouent un rôle central en interagissant avec les lymphocytes T, les neutrophiles, les fibroblastes, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (**Abdulkhaleq et al., 2018**).

C. Les neutrophiles :

Typiquement les premières cellules à extravaser en tissu en réponse à des stimuli nocifs, les neutrophiles sont très mobiles et réactifs à un large éventail de stimuli, en particulier les agents pathogènes et les modèles moléculaires associés aux dommages (**PAMP_s et DAMP_s, respectivement**) (**Jones et al., 2016**).

D. Les lymphocytes :

Les lymphocytes sont des leucocytes dont le rôle est la défense immunitaire de l'organisme face aux agressions infectieuses. Il existe plusieurs types de lymphocytes, dont deux principaux, les B et les T, le troisième étant représenté par les lymphocytes du groupe NK. Les lymphocytes B sécrètent des anticorps, des molécules capables de reconnaître spécifiquement un antigène, alors que les lymphocytes T détruisent directement les cellules contaminées (**Druzd et al., 2017**).

E. Les mastocytes :

Les mastocytes sont nécessaires au développement de réactions allergiques. Selon leur localisation ou leur stade de maturation, les mastocytes expriment différentes quantités d'antigènes de surface, dont certains sont impliqués dans l'activation et d'autres dans la reconnaissance cellulaire par réticulation de leurs récepteurs de surface pour les IgE conduisant à la granulation et à la libération de médiateurs vasoactifs, pro-inflammatoires et nociceptifs, y

compris l'histamine, l'IL-6, l'IL-8, le DPI2, la tryptase et le facteur de croissance endothélial (Theoharides et Kalogeromitros, 2006).

F. Les fibroblastes :

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses, abondamment distribuées dans les tissus conjonctifs de la plupart des organes (Shinde et Frangogiannis, 2014), ils sont capables de sécréter et de répondre aux cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, et de réguler le maintien des infiltrats inflammatoires, indiquant leur importance dans le développement, la différenciation, le remodelage et la réparation des tissus , Jusqu'à présent, aucun marqueur universel des fibroblastes n'a été identifié (Van Linthout et al., 2014).

G. Les plaquettes :

Au-delà de leur rôle traditionnel dans l'hémostase et la thrombose, les plaquettes sont de plus en plus reconnues comme cellules modulatrices (Morrell et al., 2014). Les plaquettes activées et les microparticules dérivées des plaquettes peuvent se lier aux leucocytes, ce qui stimule l'activation mutuelle et entraîne une libération rapide et locale de cytokines dérivées des plaquettes. Ainsi, les plaquettes modulent les fonctions effectrices des leucocytes et contribuent aux réponses inflammatoires et immunitaires à une blessure ou à une infection (Kral et al., 2016).

I.5.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation :

Un médiateur inclut toutes les molécules pouvant agir sur les acteurs de la réaction inflammatoire et pouvant moduler et réguler la réponse inflammatoire. Ils interviennent ainsi à toutes les étapes de cette réaction. On peut classer les médiateurs selon leur origine ; Ils peuvent être exogènes comme les endotoxines des bactéries essentiellement, ou endogènes d'origine cellulaire (histamine, eicosanoïdes, cytokines et chémokines) ou d'origine plasmatique (produits des systèmes du complément, de la coagulation et kinines).

I.5.2.1. Les médiateurs plasmatiques circulants :

A. Le système coagulation/fibrinolyse :

Ce système a trois fonctions principales dans inflammation : la formation de fibrine qui forme une barrière aux autres parties du corps, la fibrinolyse qui attire les globules blancs et l'activation de système kinines.

Dans le phénomène de la coagulation, l'activation du facteur XII (Hageman) par des éléments pathogènes entraînant la libération de thrombine, qui convertit le fibrinogène en fibrine. La fibrine ainsi formée vient consolider le clou hémostatique formé par l'agrégation

des plaquettes. C'est aussi un puissant agent chimiotactique des polynucléaires neutrophiles. La fibrine intervient aussi dans la perméabilité vasculaire en agissant sur le système des kinines (**Kerrou, 2020**). Le système fibrinolytique provoque la formation de plasmine détruit fibrine par protéolyse (**Abbal et al., 2013**).

B. Le système de kinines :

Les kinines sont un groupe de polypeptides formés à partir de kininogènes, précurseurs plasmatiques, par l'action d'enzymes : les kallibréines. Le système des kinines est activé par le facteur de Hageman, la prékallibréine permet la formation de kallibréine. Celle-ci active alors une kininogène pour former la bradykinine (**Tang et Kern, 2011**).

La bradykinine augmente la perméabilité vasculaire, permet la contraction de cellules musculaires lisses, entraîne une vasodilatation et joue un rôle majeur dans la douleur lors d'inflammation aiguë. Elle possède des effets chimiotactiques et peut convertir le C5 en C5a. Les kinines stimulent également la production d'histamine par les mastocytes et activent la cascade de l'Acide Arachidonique. Elles interviennent enfin dans la conversion du plasminogène en plasmine, permettant la fibrinolyse (**Wu, 2015**).

C. Système du complément :

Le système du complément est un ensemble complexe de protéines solubles et de récepteurs membranaires agissant en cascade en permettant la destruction d'un agent agresseur (**Ricklin et al., 2010**). Il existe une vingtaine de protéines, classées de C1 à C9. Synthétisées dans le foie, on les retrouve sous formes inactivées dans le plasma et le liquide interstitiel. Trois voies permettent l'activation du système :

- La voie classique, déclenchée par la fixation de C1 à un couple antigène/anticorps et une fois par le facteur XII
- La voie alterne, déclenchée par la reconnaissance de microorganismes ;
- La voie lectine, par laquelle C1 est directement activée par la fixation de la lectine liée au mannose sur le microbe (**Kumar et al., 2014**).
- L'importance de l'activation du système du complément par ces trois voies repose sur la formation de la C3 convertase qui sépare le fragment C3 en C3a et C3b. Le facteur clé de l'inflammation est le C3b qui se fixe alors sur la cible. Une réaction en cascade entraîne la formation des fragments C5a et C5b par la C5 convertase (**Rawal et al., 2008**).

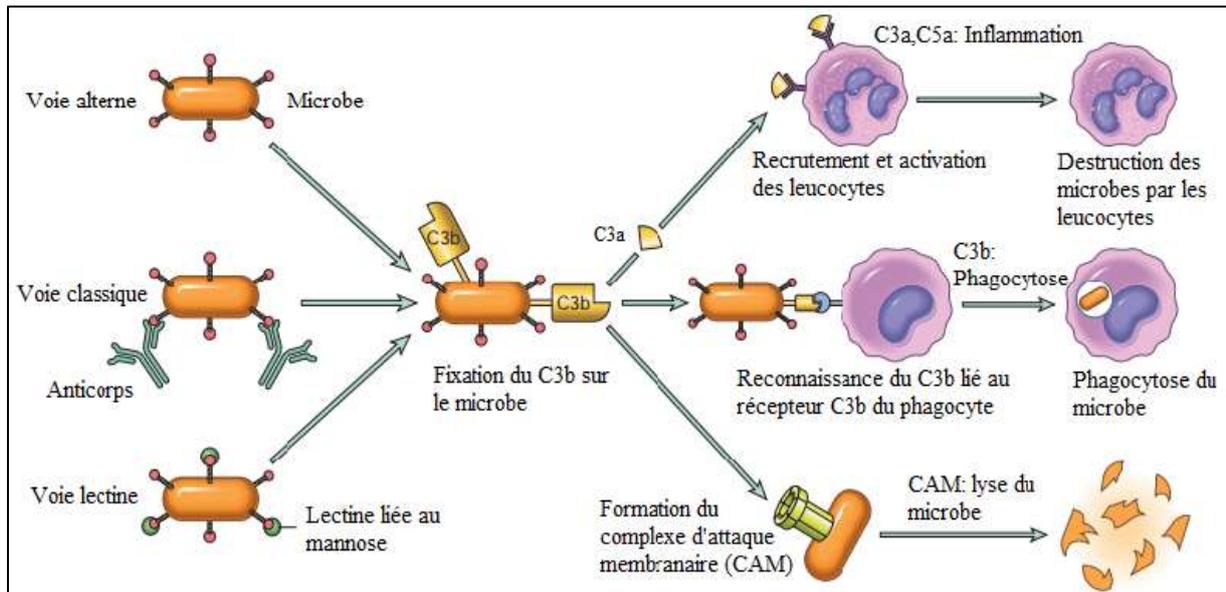


Figure 2 : le système du complément (Kumar *et al.*, 2014).

I.5.2.2. Les médiateurs cellulaires :

A. Amines vasoactives :

L'histamine et la sérotonine sont des médiateurs préformés faisant partie des premiers libérés lors d'inflammation.

L'histamine est retrouvée au niveau de l'épiderme de la muqueuse gastro-intestinale et du système nerveux. C'est un facteur principal d'augmentation immédiate de la perméabilité vasculaire au début de l'inflammation. Elle est impliquée dans le processus de la douleur en irritant les terminaisons nerveuses, libérée à partir des mastocytes et basophiles lors de la dégranulation des cellules phagocytaires et a des propriétés chimiotactiques pour les phagocytes (Tang et Kern, 2011).

La sérotonine est contenue dans les plaquettes et certaines cellules neuro-endocriniennes et les cellules chromaffines de la muqueuse intestinale libérée. Ses actions se rapprochent beaucoup de celles de l'histamine dans le rôle vasoconstricteur (Kumar *et al.*, 2014) et provoque une constriction veineuse et à une concentration plus élevée ralentit le flux capillaire et conduit à la stase (Patil *et al.*, 2019).

B. Les dérivés de l'acide arachidonique :

Lorsqu'une membrane cellulaire est endommagée, sous l'action de médiateurs tels que le C5a (facteurs du complément), l'activation de phospholipides membranaires entraîne le relargage d'acides gras polyinsaturés dans la cellule.

L'acide arachidonique est libéré à partir des phospholipides membranaires des cellules inflammatoires sous l'action des phospholipases A2. Deux grandes variétés d'enzyme interviennent sur le métabolisme de l'Acide Arachidonique :

- Les lipooxygénases induisent la formation des leucotriènes : LTB4, LTC4, LTD4 et LTE4 qui augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimio-attractivité sur les polynucléaires.
- Les cyclooxygénases génèrent la formation des prostaglandines (PGI2 ou prostacycline, PGE2, PGD2) et des thromboxanes (TXA2 et TXB2) qui produisent une vasodilatation locale, favorisent l'oedème et l'afflux leucocytaire, de plus, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets allogènes de la bradykinine (Murphy *et al.*, 2012).

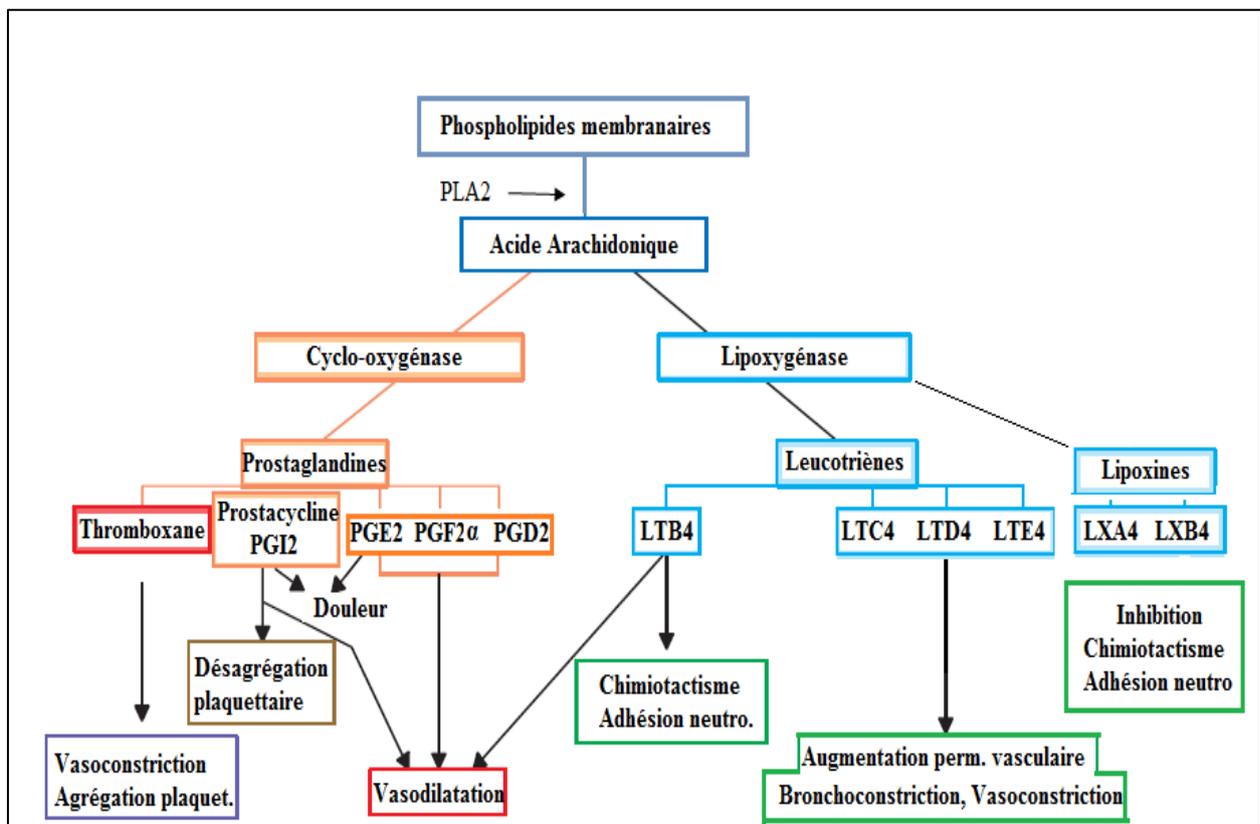


Figure 3 : la cascade de l'Acide Arachidonique (Lakhani *et al.*, 2009).

C. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'acide nitrique NO :

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz soluble produit par les macrophages, les cellules endothéliales et les neurones. L'oxyde nitrique synthétase (NOS) synthétise le NO à partir de L-arginine, après l'activation par le Ca²⁺ ou par les cytokines TNF-α et IFNγ.

NO est un important vasodilatateur, il régule le recrutement des leucocytes et réduit l'agrégation plaquettaire. Il présente également une activité antimicrobienne par les métabolites qu'il forme avec l'oxygène (Sayah *et al.*, 2017)

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont produits dans les leucocytes et peuvent être libérés et combinés avec NO. A faible dose, ils augmentent alors l'expression des chémokines, des cytokines et des molécules d'adhésion des leucocytes. A forte dose, ils peuvent être oxydatifs et dégradent les tissus de l'hôte (Scott, 2014).

I.5.2.3. Cytokines et chimiokines :

Les cytokines sont des facteurs solubles peptidiques synthétisés et libérés par les lymphocytes et les macrophages nommées respectivement lymphokines et monokines. Ce sont des médiateurs de la communication intercellulaire, qui agissent à faible concentration, généralement localement par action autocrine et paracrine grâce à la fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité (Murphy *et al.*, 2012).

Certaines cytokines sont pro-inflammatoires (interleukine 1 ou IL1, IL6 et tumeur TNF-alpha jouent un rôle prépondérant dans la régulation des cellules phagocytaires. Elles interviennent en particulier dans les phénomènes d'adhérence à l'endothélium, de déplacement orienté vers le site de l'agression, de phagocytose et d'activation des systèmes lytiques, d'autres au contraire sont anti-inflammatoires (IL4, IL10, et IL13) (Kerrou, 2020).

Les chimiokines sont un groupe d'environ 40 petites protéines structurellement apparentées qui jouent un rôle dans la chimiotaxie et l'activation des leucocytes. Ils sont sécrétés par les macrophages activés et les cellules endothéliales. On citera plus particulièrement l'interleukine 8 (IL-8), un puissant agent chimiotactique des neutrophiles qui stimule leur dégranulation (Lakhani *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2014).

I.6. Stress oxydatif et maladies inflammatoires

Des corrélations entre inflammation chronique et stress oxydatif ont été mises en évidence : un déséquilibre entre l'activité des espèces oxydantes, promoteur des agressions oxydatives, et la défense antioxydante, est impliqué dans l'asthme et la rhinite allergique (Sequeira *et al.*, 2012, Ercan *et al.*, 2006). La présence accrue de radicaux hydroxyles, d'anions de radicaux superoxydes et de peroxydes, peut entraîner une série d'altérations des muqueuses nasales et des voies respiratoires : peroxydation des lipides, réactivité marquée des voies respiratoires, sensibilité et sécrétions des muqueuses nasales et de haute perméabilité vasculaire (Sequeira *et al.*, 2012). Fondamentalement, les substances actives et les antioxydants affectent le système

immunitaire. Le stress oxydatif perturbe la signalisation cellulaire et altère le métabolisme de l'acide arachidonique, ce qui augmente l'inflammation des voies respiratoires (Moreno-Macias et Romieu, 2014). Le métabolisme de l'oxygène et la production accrue de ROS entraînent des lésions tissulaires et, associés à l'inflammation, jouent un rôle important dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (Mirshafiey et Mohsenzadegan, 2008).

I.7. Les Pathologies d'inflammation :

La maladie inflammatoire est définie comme une inflammation chronique persistante d'un ou plusieurs organes. Les maladies inflammatoires peuvent toucher la plupart des organes et tissus du corps : système digestif, système nerveux, épiderme, articulations (Aleth, 2020).

Cette inflammation contribue au développement de diverses maladies humaines telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer et les maladies inflammatoires de l'intestin (Kada, 2018).

Tableau 2 : Caractéristiques spécifiques de l'inflammation dans divers tissus et maladies (Netea et al., 2017).

Maladie	tissu Principales caractéristiques de l'inflammation	Voies principales	complications spécifiques
Diabète	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltration d'îlots pancréatiques avec des cellules immunitaires innées et adaptatives et apoptose des cellules β dans le DT1 • Inflammation innée de « Low-grade » dans le tissu adipeux, le foie et les îlots, résistance à l'insuline et apoptose des cellules β dans le DT2 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF • Dans le DT1, également la destruction des cellules β médiée par les lymphocytes T 	<ul style="list-style-type: none"> • Complications macrovasculaires (IM, accident vasculaire cérébral, claudication) • Complications microvasculaires (rénale, oculaire, neuronale)
Les maladies pulmonaires	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation et hyper-réactivité • Fibrose 	<ul style="list-style-type: none"> • Réponses allergiques Th2 et IL-4/IL-5/IL-13 (asthme) • Infiltrat de PMN et de macrophages, cytokines (BPCO) -Intégrine TGF $\alpha\beta$6, PDGFβ (IPF) 	<ul style="list-style-type: none"> • Asthme • Maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) • Fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

Maladie du foie	<ul style="list-style-type: none"> • insuffisance hépatique aiguë • réponse de phase aiguë hépatique • stéatose 	<ul style="list-style-type: none"> • IL-1α et autres cytokines pro-inflammatoires • TGFβ pour la sclérose 	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite aiguë et chronique • Stéatose hépatique non alcoolique • cirrhose
Maladie rénale chronique	Inflammation « Low-grade »	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammasome NLRP3, IL1β, IL-6, PGE2, TGFβ 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuffisance rénale

I.8. Les anti-inflammatoires :

I.8.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiennes (AIS) :

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes dérivés du cortisone, sécrété par la glande surrénales, ont la capacité d'inhibition toutes les phases de l'inflammation (**Muster, 2005**). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies auto-immune et les maladies inflammatoires de l'intestin (**Sadia, 2015**).

Les AIS diminuent la production des médiateurs inflammatoire tel que, la sérotonine, l'histamine, les cytokines ... et aussi diminuent la migration des monocytes et les polynucléaire vers le site d'inflammation (**Kada, 2018**).

Dans les tissus cibles, les AIS se fixent à leurs récepteurs situés dans le cytoplasme de la cellule. Le complexe récepteur-ligand formé, pénètre dans le noyau de la cellule. Il se fixe sur des nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes. La transcription de l'ADN en ARNm, permet la synthèse de protéines spécifique dont la lipocortine qui a une action inhibitrice sur la phospholipase A2 membranaire, bloque la formation d'acide arachidonique. Le mécanisme opposé est appelé transrépression, où le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles (**Adepo Apie, 2018**).

Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant interleukine 2 (IL-2). Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires.

Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes qui agissent sélectivement sans réprimer le système immunitaire (Adepo Apie, 2018).

I.8.2. Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) :

Les AINS ont des propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques. Certains AINS, ont des propriétés inhibitrices de l'agrégation plaquettaire (Blain et al., 2000).

Leur mécanisme principal est l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la production des prostaglandines à partir de l'Acide Arachidonique. Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout générées dans des conditions inflammatoires (Nozha, 2019).

I.8.3. Anti-inflammatoires naturels :

Les plantes médicinales sont beaucoup plus utilisées pour soulager les malades atteints de certaines affections inflammatoires telles que l'arthrose, l'asthme, la goutte, les ulcères gastro-duodénaux, la rhinite allergique et l'arthrite rhumatoïde (Kherbache, 2018).

L'activité anti-inflammatoire des plantes repose sur leur contenu en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les saponines, les alcaloïdes, ...etc. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs étapes de la réaction inflammatoire par l'intermédiaire de kinases telles que la protéine kinase C et la protéine kinase activée par le mitogène.

Il existe plusieurs mécanismes d'action sur lesquelles les plantes médicinales donnent un effet inhibiteur sur les voies d'inflammation dont certains sont résumés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : réaction des plantes sur le potentiel inflammatoire (Azab et al., 2016).

Les voies sur laquelle les plantes médicinales agissent	Mécanisme d'action
Inhibition des 15-lipoxygénases (LOX)	Certaines plantes médicinales comme Curcumin qui inhibent la synthèse des leucotriènes par interaction sur la 15-LOX.
Inhibition de NOS	Les flavonoïdes inhiberaient la production d'oxyde nitrique (NO), diminuant ainsi l'expression d'iNOS tel que l'huile d'olive vierge
Inhibition de COX	Les flavonoïdes inhibent la biosynthèse des prostaglandines spécialement l'inhibition de la COX-1 et de la COX-2 (les plantes de mangrove)
Inhibition de la phospholipase A2	Les plantes médicinales bloquent les voies COX et LOX dans la cascade arachidonique.

	Inhibition des A2 par la quercétine. , incluent <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuna longa</i> , <i>A. cepa</i> , <i>Xylopiya frutescens</i>
Inhibition des cytokines pro-inflammatoires	Inhibition par des extraits de plantes riches en flavonoïdes comme plantes naturels marins: d'origine algale
Modulation de l'expression génique pro-inflammatoire	Effet inhibiteur sur les diverses protéines kinases impliquées dans la transduction du signal (la protéine kinase C et la protéine kinase activée par un mitogène) et contrôlant le taux d'expression du gène cible (régulation de la liaison d'ADN de facteurs de transcription) tel que les plantes ethnobotaniques

CHAPITRE II : LE DIABETE SUCRE EST SES COMPLICATIONS CAUSE PAR L'INFLAMMATION

Le diabète sucré est un trouble métabolique chronique avec une prévalence élevée dans le monde entier, se produit lorsqu'il y a des niveaux élevés de glucose dans le sang parce que le corps ne peut pas produire une ou une quantité suffisante de l'hormone insuline ou utiliser efficacement l'insuline (**Shamim et Rahman, 2021**).

L'homéostasie est un processus par lequel un facteur clé (par exemple, température, acidité, tension, glycémie, ...) est maintenu autour d'une valeur stable bénéfique pour un système considéré, grâce à un système de régulation (**Bruce, 2006**).

Lors d'un repas, le taux de sucre dans le sang augmente (la glycémie est supérieure à 1g/l), Le pancréas détecte l'augmentation de la glycémie et produit l'insuline afin de réguler la glycémie et de la maintenir à un taux normal. Ce sont les îlots de Langerhans plus particulièrement les cellules bêta contenues dans ces îlots du pancréas, qui secrètent l'insuline, permettant au glucose de pénétrer dans les cellules de l'organisme (muscles, tissus adipeux et le foie) pour qu'il soit utilisé comme source d'énergie ou stocké sous forme d'unités répétées de glucose (le glycogène), par glycogénogenèse (**Hartemann et al., 2013**).

En revanche, lorsque la glycémie est trop basse (inférieure à 1g/l), surtout après l'effort, une hormone de l'hyperglycémie (glucagon) agit en se liant aux récepteurs localisés spécifiquement au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles, situé dans le foie et les muscles va permettre de déstocker les réserves de glycogène grâce à la glycogénolyse (**Letudiant, 2021**).

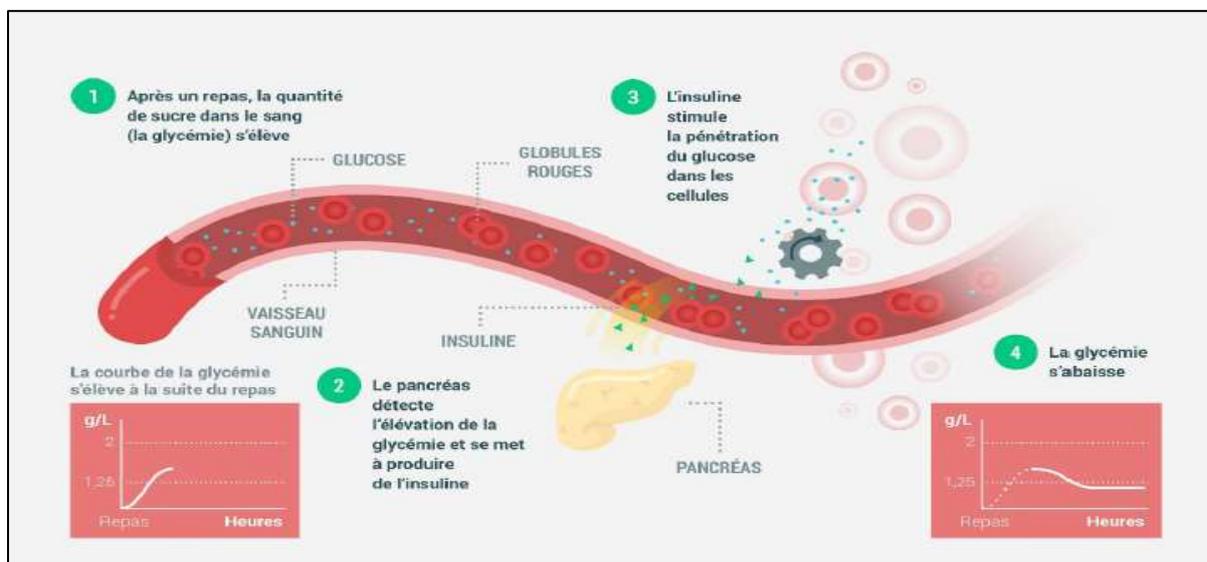


Figure 4 : Régulation du taux de sucre dans le sang au moment des repas (**Marieb et Hoehn, 2015**).

II.1. Les principaux types de diabète :

Deux formes majeures de diabète sont généralement identifiées, à savoir le diabète de type 1, également connu sous le nom de diabète juvénile et le diabète de type 2, anciennement appelé diabète de l'adulte.

II.1.1. Diabète de type 1 :

Est le résultat de la destruction progressive plus ou moins rapide des cellules bêta par un processus auto-immun qui induit habituellement une carence absolue en insuline (**Valensi et al., 2005**). Elle est classiquement décrite en trois phases :

- Une phase de latence, définie par la prédisposition génétique.
- Une phase préclinique, caractérisée par une activation du système immunitaire contre les cellules d'îlots, au cours de laquelle des autoanticorps et des lymphocytes T autoréactifs sont détectables.
- Une phase clinique, hyperglycémique, survenant lorsqu'environ 80 % des cellules B ont été détruites (**Dubois-Laforgue, 2007**).

Le développement du diabète de type 1 est initié par la présentation de peptides de la cellule β par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPAs porteuses de ces autoantigènes migrent vers les ganglions lymphatiques pancréatiques où ils interagissent avec les lymphocytes T ($CD4^+$) autoréactifs, qui à leur tour interviennent dans l'activation des lymphocytes T ($CD8^+$) autoréactifs. Ces cellules T $CD8^+$ activées reviennent dans l'îlot et lysent les cellules β exprimant des auto-antigènes immunogènes sur les molécules de surface du complexe majeur d'histocompatibilité (classe I) (**Dimeglio et al., 2018**).

La destruction des cellules β est encore exacerbée par la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules immunitaires innées (macrophages, cellules tueuses naturelles et neutrophiles) (**Dimeglio et al., 2018**).

L'ensemble de ce processus est amplifié par les défauts des lymphocytes T régulateurs, qui ne suppriment pas efficacement l'auto-immunité. Les cellules T activées dans le ganglion lymphatique pancréatique stimulent également les lymphocytes B pour produire des auto-anticorps contre les protéines des cellules β . Ces auto-anticorps peuvent être mesurés dans la circulation et sont considérés comme un biomarqueur déterminant du diabète de type 1 (**Dimeglio et al., 2018**).

II.1.2. Diabète de type 2 :

Est la forme la plus répandue dans le monde près de 90 % des diabètes (**Racine, 2015**). En raison d'une perte progressive de sécrétion adéquate d'insuline à cellules B fréquemment sur le fond de la résistance à l'insuline (**Classification and Diagnosis of Diabetes, 2021**).

La résistance à l'insuline se caractérise par une réponse diminuée à la stimulation de l'insuline, entraînant l'incapacité des tissus cibles à éliminer adéquatement la glycémie, à inhiber la lipolyse, à stimuler la synthèse du glycogène et à inhiber la production hépatique de glucose la réduction de la synthèse du glycogène musculaire stimulé par l'insuline et l'oxydation du glucose peuvent entraîner une résistance chronique à l'insuline (**Da Silva Rosa et al., 2020**).

II.1.3. Diabète sucré gestationnel :

Ce type de diabète est défini par une intolérance au glucose apparaissant au cours de la grossesse. Il se caractérise par une hyperglycémie aux valeurs supérieures à la normale, mais inférieures à celles posant le diagnostic de diabète (**Tenenbaum et al., 2018**). Les changements qui en résultent dans le métabolisme des glucides et des lipides chez la mère garantissent qu'une nutrition adéquate atteint le fœtus. L'administration du glucose au fœtus, médiée par le placenta, est facilitée par une augmentation de 30% de la production endogène hépatique de glucose basal maternel. Les femmes qui sont incapables de s'adapter suffisamment à ces changements physiologiques induits par la grossesse développent un diabète gestationnel (**McIntyre et al., 2019**)

II.1.4. Types spécifiques de diabète :

Dus à d'autres causes, par exemple les syndromes de diabète monogénique (tels que le diabète néonatal et le diabète de maturité des jeunes) (**Fehaima, 2017**), les maladies du pancréas exocrine (telles que la fibrose kystique et la pancréatite) et le diabète induit par des médicaments ou des produits chimiques (comme l'utilisation de glucocorticoïdes, dans le traitement du VIH / SIDA ou après une transplantation d'organe).

II.1.5. Stress oxydatif et diabète

En présence d'un stress oxydatif accru, les dommages cellulaires affectent la fonction des cellules bêta pancréatiques, qui sont hypersensibles aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote en raison de l'expression altérée des enzymes antioxydantes (**Bandeira et al., 2012; Valko et al., 2007**). Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'interagir avec des

substrats impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'insuline (Evans *et al.*, 2005) La charge énergétique élevée des cellules, principalement causée par de grandes quantités de sucre (glucose), augmente le flux de coenzymes réduites (NADH et FADH₂) dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Lorsque le gradient de tension à travers la membrane mitochondriale atteint un seuil critique pour bloquer le complexe III, il permet à la coenzyme Q d'être réduite par les électrons. Le CoQH₂ peut alors réduire l'oxygène moléculaire, produisant éventuellement un anion radical superoxyde (Brownlee, 2005). Il s'agit d'une voie couramment suivie dans les complications du diabète de type 2 impliquant un flux accru dans les voies des polyols et des hexosamines

II.2. Les complications du diabète :

Les deux types de diabète peuvent entraîner des complications dans plusieurs parties du corps et peuvent augmenter le risque de décès prématuré. Les complications possibles comprennent l'infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral, une insuffisance rénale, une amputation des jambes, une perte de vision et des lésions nerveuses. Pendant la grossesse, un diabète mal contrôlé augmente le risque de mort fœtale et d'autres complications (OMS, 2016).

Les complications du diabète sucré peuvent être aiguës ou chroniques (Alves *et al.*, 2012).

II.2.1. Les complications aiguës :

Les principales complications diabétiques aiguës est hypo- et hyperglycémie liée à l'ajustement du traitement et acidocétose chez les diabétiques non traités ou ne faisant pas leurs injections d'insuline)

II.2.2. Les complications à long terme

Celles-ci sont liées aux effets néfastes d'une glycémie trop élevée sur le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles se traduisent par des troubles rénaux, visuels, cardiovasculaires, cérébraux et artériels.

Les complications chroniques du diabète, comprennent deux composantes :

II.2.2.1. Les complications microangiopathiques : sont des complications spécifiques du diabète, neuropathie, néphropathie et rétinopathie dont le facteur de risque majeur est l'hyperglycémie chronique (Michael *et Fowler*, 2008). Leur apparition va dépendre de la durée du diabète et de l'intensité de l'hyperglycémie. L'hypertension artérielle, et plus globalement

les facteurs de risque cardiovasculaire (surpoids, augmentation des taux de lipides sanguins, tabagisme) peuvent aussi constituer des facteurs d'aggravation des microangiopathies (Lermusiaux et al., 2006).

II.2.2.2 Les complications macroangiopathiques : maladies cardiovasculaires dont les facteurs de risque sont l'hyperglycémie, l'insulinorésistance, des carences en insuline, une dyslipidémie, l'hypertension, l'hyperlipidémie et l'inflammation (Monnier et Thuan, 2007).

II.2.2.2.1 Le pied diabétique :

Le syndrome du pied diabétique est compris comme tous les changements pathologiques dans le pied d'une personne atteinte de diabète sucré. Ceux-ci incluent des lésions pré-ulcéreuses telles que des callosités cornéennes anormales (Morbach et al., 2020).

Au niveau international, Le syndrome du pied diabétique est défini comme "une infection, une ulcération ou une destruction des tissus du pied chez une personne souffrant de diabète sucré, associée à des troubles neurologiques et/ou à une artériopathie périphérique ". Les signes avant-coureurs d'un ulcère, tels que les callosités ou la peau sèche et squameuse, en font également partie (Riedel et al., 2020).

Dans l'ulcère du pied diabétique, la cicatrisation des plaies est gravement altérée, dans toutes les phases. Les cellules de l'immunité innée ne peuvent remplir leurs tâches concernant la chimiotaxie et la phagocytose que lorsqu'elles sont réduites. Les perturbations de la synthèse de la matrice extracellulaire de la part des fibroblastes et une prolifération et migration réduites des kératinocytes expliquent en partie la fermeture très retardée de la plaie. due à l'augmentation de la concentration de glucose par une glycation avancée, Les mécanismes induits par les produits finaux (AGE) entraînent une modification des profils de cytokines qui libèrent les facteurs pro-inflammatoires et régénératifs (Lechleitner et al., 2019).

II.2.2.2.1.1 La cicatrisation des plaies diabétiques

Dans le diabète, les preuves expérimentales et cliniques suggèrent que la progression de la cicatrisation des plaies peut déréguler la différenciation des myofibroblastes des cellules précurseurs et conduire par la suite à un manque de prolifération cellulaire, à un dépôt insuffisant de l'ECM, à une augmentation de l'activité protéolytique et à une diminution de la contraction de la plaie (Salazar et al., 2016).

- le processus de guérison est interrompu et bloqué en différentes phases (Baltzis et al., 2014).

_ **La phase inflammatoire** : Pendant cette phase les neutrophiles sont remplacés par des macrophages après avoir initié la guérison et les cellules apoptotiques sont également phagocytosées par les macrophages. Ces macrophages nouvellement arrivés ont un continuum de phénotypes. Le phénotype M1 classique induit par T helper 1 et le phénotype M2 alternatif induit par les cytokines T-helper 2.

Les macrophages du phénotype M2 aident à déplacer le processus de cicatrisation des plaies vers la phase proliférative. Ils produisent des facteurs de croissance, qui stimulent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Contrairement aux phénotypes M2, les macrophages M1 sont impliqués dans des rôles bactéricides, phagocytaires et pro-inflammatoires.

Il a été démontré que le diabète dissuade le passage du phénotype M1 au phénotype M2. L'analyse des plaies diabétiques révèle des niveaux élevés de stress oxydatif, une charge cellulaire apoptotique et un passage à l'expression M1 des macrophages. Cet état inflammatoire chronique altère gravement la formation de tissu de granulation, l'angiogenèse et le processus d'épithélialisation de la cicatrisation des plaies (**Barman et Koh, 2020**).

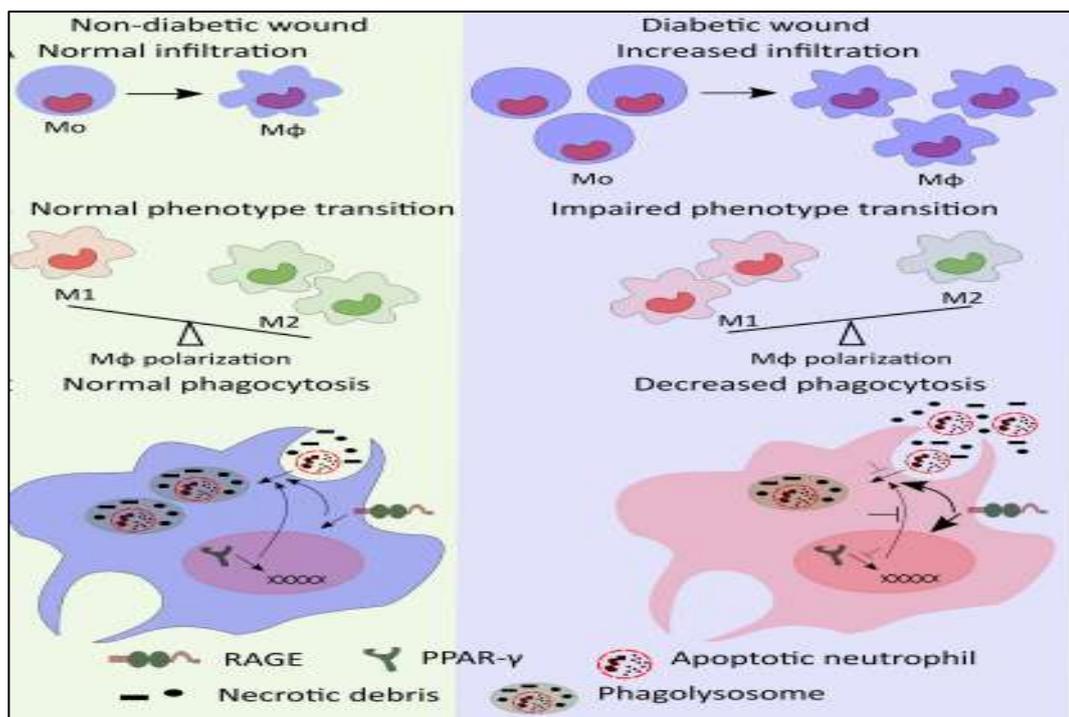


Figure 5 : dysrégulation des macrophage dans les plaies diabétiques (**Barman et Koh, 2020**).

– **La phase proliférative** : Au cours de cette phase la différenciation des fibroblastes dérégulés en myofibroblastes entraîne une altération de l'angiogenèse, une diminution de la sécrétion d'ECM et un affaiblissement de la contraction de la plaie.

L'absence de changement de phénotype M1 à M2 peut entraîner une altération de l'angiogenèse qui complique davantage les plaies chroniques dans la phase proliférative. Une épithélialisation significativement retardée dans le diabète est également observée dans les plaies non cicatrisantes. En règle générale, les cellules basales prolifèrent à partir des bords de la plaie et interagissent avec le cadre de l'ECM créé par les myofibroblastes.

Sans intermédiaires de signalisation appropriés et sans fonctionnalité des myofibroblastes, les kératinocytes sont incapables de migrer et d'épithélialiser formellement les plaies. En effet, les kératinocytes ont besoin d'une lame basale contenant du collagène de type IV sur la membrane basale sur laquelle migrer. Ils ne migreront pas sur un ECM de caillot de fibrine. Cela entraîne des retards dans la maturation des tissus, ce qui contribue finalement aux plaies chroniques non cicatrisantes et à l'altération de la barrière cutanée (Wan et al., 2021).

– **La phase de remodelage et de maturation** : Pendant cette phase les myofibroblastes synthétisent et accumulent la métalloprotéinase matricielle (MMP) pour reconstituer l'ECM, et le collagène III est remplacé par un collagène I plus fort pour assurer un remodelage complet. Les myofibroblastes produisent également des inhibiteurs tissulaires des MMP qui agissent pour bloquer les MMP et équilibrer la dégradation de l'ECM. Les conditions hyperglycémiques trouvées dans le diabète sont rapportées pour induire des niveaux plus élevés de MMP et des TIMPs réduits, entraînant une modification anormale de l'ECM et une cicatrisation chronique des plaies (Wan et al., 2021).

II.3. Mécanismes d'action des antidiabétiques :

Outre l'insuline et les analogues de l'insuline, les thérapies pour le diabète comprennent celles qui améliorent la sécrétion d'insuline, celles qui stimulent l'action de l'insuline, celles qui réduisent la production hépatique et endogène de glucose et celles qui ont un impact sur la glycémie par d'autres mécanismes (Skyler et al., 2017).

II.3.1. L'insuline :

L'insuline joue un rôle important dans le métabolisme du glucose, la synthèse des protéines, la prolifération et la différenciation de différents types de cellules, ce qui suggère

que l'hormone est capable d'affecter différents processus impliqués dans la cicatrisation des plaies (Ilias *et al.*, 2020).

Les actions cellulaires de l'insuline commencent par la liaison de la molécule d'insuline aux récepteurs hétéro-tétramériques de l'insuline sur les membranes cellulaires cibles. Il existe une relation inverse entre la concentration ambiante d'insuline et la densité des récepteurs à la surface de la cellule. Par conséquent, à des concentrations plasmatiques d'insuline plus élevées, une régulation négative des récepteurs de l'insuline sur les membranes cellulaires se produit. Une proportion plus faible de récepteurs par unité de surface de membrane cellulaire nécessite des niveaux d'insuline plus élevés pour une action adéquate de l'insuline dans cette situation, un mécanisme d'hyperinsulinémie dans les états résistants à l'insuline (Pappachan *et al.*, 2019).

II.3.2. Metformine :

La metformine, un biguanide, est actuellement le médicament de première ligne pour le traitement initial du diabète et agit en supprimant la production de glucose par le foie via l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Salazar *et al.*, 2016), la metformine peut améliorer l'hyperglycémie des patients grâce à une suppression significative de la production hépatique de glucose (He, 2020), améliore la sensibilité des tissus périphériques et stimule la sécrétion de GLP-1. En outre, la metformine abaisse efficacement la concentration d'HbA1c d'environ 1 à 2 %, est neutre en poids, ne provoque pas d'hypoglycémie et peut avoir des effets bénéfiques modestes sur la pression artérielle et les lipides. Les effets latéraux gastro-intestinaux sont réduits avec un titrage progressif de la dose, et le risque d'acidose lactique avec la metformine est rare (Chatterjee *et al.*, 2017).

II.3.3. Sulfonylurées :

Cette classe de médicaments stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en inhibant l'efflux de potassium et dans une étape suivante, diminue la clairance hépatique de l'insuline telle que le gliclazide et le glimépiride. Cependant ces médicaments sont associés à hyperinsulinémie, à l'activation du système nerveux sympathique et à l'inhibition du canal adénosine triphosphate dépendant du potassium, ce qui séparément ou en association, peut augmenter le tonus vasculaire, réduire l'activité vasodilatatrice et augmenter les niveaux de la pression artérielle (Ilias *et al.*, 2020).

En monothérapie, ces médicaments n'offrent pas de contrôle durable par rapport à la metformine et aux thiazolidinediones (Chatterjee *et al.*, 2017).

II.3.4. Les thiazolidinediones :

Également connus sous le nom d'agonistes de la γ PPAR (rosiglitazone, pioglitazone), Le principal mécanisme d'action de la série de médicaments thiazolidinedione est qu'il se lie aux récepteurs PPAR dans les cellules adipeuses, rendant les cellules progressivement réceptives à l'insuline et améliorent la sensibilité à l'insuline dans les organes cibles. L'utilisation de ces médicaments a été controversée, la troglitazone, la première de sa catégorie, ayant été retirée en raison de sa toxicité hépatique (Dowarah et Singh, 2020).

II.3.5. Les médicaments à effet incrétine :

Les traitements à base d'incrétine comprennent des agonistes des récepteurs du GLP-1 injectables par voie sous-cutanée et des inhibiteurs oraux de la DPP-4 (Chatterjee et al., 2017).

L'hormone incrétine GLP-1 est sécrétée par les cellules entéro-endocriniennes après l'apport en nutriments qui stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β de manière dépendante du glucose. Le GLP-1 contrôle également l'homéostasie du glucose par ses actions sur les cellules des îlots pancréatiques et de nombreux autres tissus, notamment le tractus gastro-intestinal, le foie et le cerveau (Chia et Egan, 2020). Le récepteur GLP-1 (GLP-1R) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) et sa stimulation entraîne la libération d'insuline par la cellule bêta pancréatique et la suppression de la libération de glucagon par les cellules alpha. Le GLP-1 est dégradé par une enzyme appelée dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (Pappachan et al., 2019).

Une autre stratégie pour le traitement du diabète à base d'incrétine consiste à inhiber la DPP-4. Comme cette enzyme est responsable de la dégradation du GIP et du GLP-1, l'inhibition de cette enzyme entraîne une augmentation des niveaux endogènes circulants de GIP et de GLP-1. La vildagliptine et la sitagliptine sont des exemples d'inhibiteurs oraux de la DPP-4 approuvés pour le traitement. Il a été démontré que les deux améliorent la fonction des cellules β chez les patients atteints de Diabète de type 2 (Boer et Holst, 2020).

II.4. Diabète et les plantes médicinales :

Les plantes possèdent plusieurs principes actifs qui leurs permettent d'avoir une action sur l'organisme. Dans le cas du diabète, elles ont une action hypoglycémiant, dont le mécanisme diffère ainsi que le principe actif responsable. Parmi les constituants des plantes ayant une activité hypoglycémiant, on trouve les polysaccharides, les peptides, les alcaloïdes, les glycopeptides, les triterpenoïdes, les acides aminés, les stéroïdes, les flavonoïdes, les phénols, les coumarines, les ions inorganiques et les guanidines (Jarald et al., 2008).

L'activité antidiabétique des plantes peut dépendre de plusieurs mécanismes (**Khalil et al., 2016 ; Singh, 2011 ; Jarald et al., 2008**).

Réduction de la résistance à l'insuline

- Stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β ou/et inhibition du processus de dégradation de l'insuline
- Apport de quelques éléments nécessaires comme le Calcium, le Zinc, le Magnésium, le Manganèse et le Cuivre pour les cellules β
- Régénération ou/et réparation des cellules pancréatiques β lésées
- Effet protecteur de la destruction des cellules β
- Augmentation du nombre de cellules β dans les îlots de Langerhans
- Inhibition de la réabsorption rénale du glucose
- Inhibition des β -galactosidase, α -glucosidase et α -amylase
- Prévention du stress oxydatif, qui peut être impliqué dans le dysfonctionnement des cellules β
- Diminution des activités du cortisol.

III.1. Les plantes médicinales :

III.1.1. Généralité :

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales constituent source de traitement pour de nombreuses maladies humaines dans le monde (Khasmi et Farh, 2022). Ils ont été largement utilisés dans de nombreux systèmes de médecine indigène pour le traitement thérapeutique des maladies (Kharchoufa et al., 2018), prévenir les épidémies, ajouter de la saveur et conserver les aliments (Dar et al., 2017).

Actuellement, cette médecine botanique devient de plus en plus populaire dans le monde entier, en particulier dans les pays en développement, où les plantes médicinales sont disponibles et peu coûteuses et que les utilisateurs pensent que les plantes médicinales ont moins d'effets secondaires que les médicaments synthétiques (Kharchoufa et al., 2018).

Les plantes médicinales sont considérées comme de riches ressources en matière de médecine traditionnelle et de nombreux médicaments modernes sont produits à partir de ces plantes (Dar et al., 2017).

III.1.2. Définition :

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit les plantes médicinales traditionnelles comme des matières végétales naturelles qui sont utilisées au moins ou en l'absence de traitement industriel pour le traitement de maladies à l'échelle locale ou régionale (Jamshidi-Kia et al., 2018). Aussi ils sont des sources précieuses de nouveaux médicaments à l'échelle mondiale (Chen et al., 2016).

III.1.3. Composante des plantes médicinales :

III.1.3.1. Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie.

Ils sont classés en quatre grandes catégories : Les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques (Kon, 2018).

III.1.3.2. Les métabolites secondaires :

Dans la nature, une variété de voies de métabolisme secondaire a donné naissance à un ensemble de composés défensifs des plantes appelés métabolites secondaires. Ils sont défini comme un terme désignant la voie et les produits du métabolisme sous forme de petites molécules qui ne sont pas essentiels à la survie de l'organisme (Yang et al., 2018). Ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents

rôles. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante (Kon, 2018). Ils sont des indicateurs importants pour l'évaluation de la qualité des matières médicinales (Li et al., 2020).

Les métabolites secondaires produits par les plantes sont généralement responsables des caractéristiques biologiques des espèces végétales utilisées dans le monde entier (Dar et al., 2017). En effet, les métabolites secondaires participent à la protection contre les herbivores, les bactéries, les champignons, les virus et même d'autres plantes concurrentes. En outre, certaines plantes utilisent ces composés comme signaux pour la communication entre les plantes et les micro-organismes symbiotiques, ainsi que pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graines (Yang et al., 2018).

Ces composés diffèrent en fonction des espèces (Krief, 2004). Et généralement sont classés selon leur structure chimique à des composés phénolique, les terpènes et des alcaloïdes (Yang et al., 2018).

A) Les composés phénoliques :

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plusieurs substituants hydroxylés. Ces derniers permettent aux composés phénoliques simples de se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés (Aicha, 2017). Ce sont des composés chimiques contenant un groupe hydroxyle directement attaché à un hydrocarbure aromatique (Mera et al., 2019).

- **Les flavonoïdes :**

Les flavonoïdes font partie des composés polyphénoliques et constituent une grande famille de métabolites secondaires des plantes avec 10000 structures connues. Ils sont des agents physiologiquement actifs dans les plantes et deviennent d'un grand intérêt scientifique pour leurs bienfaits sur la santé (Greenwell et Rahman, 2015).

Il y a un contenu élevé de composés flavonoïdes tels que les anthocyanines, les flavones, les flavonols, les chalcones et bien d'autres encore, que l'on peut trouver dans une seule structure de la plante, comme sa graine (Greenwell et Rahman, 2015).

- **Coumarines :**

Ce sont des composés phénoliques simples, répandus dans les plantes vasculaires. Un groupe de molécules très actives, présentant un large éventail d'activités antimicrobiennes contre les champignons et les bactéries (Jamwal et al., 2018).

Les coumarines (2H-benzopyran-2-one), une classe de composés phénoliques simples consistant en d'une grande substance phénolique produite par la fusion d'un cycle benzénique et de cycles α -pyrone. Sont répandues dans les plantes vasculaires (Jan *et al.*, 2021).

- **Tannins :**

Les tanins sont les métabolites secondaires les plus abondants produits par les plantes, allant généralement de 5% à 10% du poids sec des feuilles des arbres (Jamwal *et al.*, 2018). Ils sont riches en oligos et de polymères et peuvent former des complexes avec les protéines, les minéraux, la cellulose et l'amidon. Les tanins peuvent être divisés en deux sous-groupes, les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Jan *et al.*, 2021).

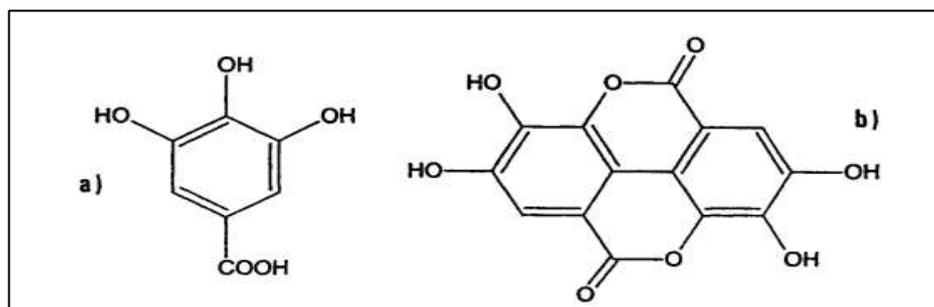


Figure 6 : (a) structure de l'acide gallique ; (b) structure de l'acide ellagique (des tanins hydrosoluble) (Kurek-Górecka *et al.*, 2014)

B) Terpénoïdes :

Ils constituent le plus grand groupe de métabolites secondaires des plantes auquel sont attribuées plus de 40 000 molécules différentes. Du point de vue chimique, ce sont des lipides non saponifiables car les acides gras n'interviennent pas dans leur formation. Également ils sont appelés isoprénoïdes, parce que l'unité structurale de base qui les forme est la molécule d'isoprène. Ils sont classés selon le nombre d'unités d'isoprène qu'ils contiennent (Mera *et al.*, 2019).

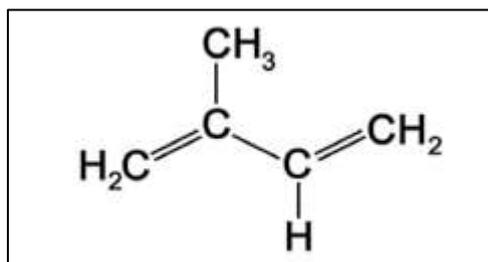


Figure 8: unité d'isoprène (Jouault, 2012)

Selon le nombre d'unités constitutives les terpènes se divisent en différents groupes qui sont ; Monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), Diterpènes ($C_{20}H_{32}$), Triterpènes ($C_{30}H_{48}$), Tétraterpènes ($C_{40}H_{64}$) et Sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (Jan et al., 2021; Jamwal et al., 2018).

Les monoterpènes existent dans les huiles essentielles qui possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles employées comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. (Mohammedi, 2013).

C) Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes constituent un groupe important et structurellement diversifié de métabolites secondaires d'origine microbienne, végétale ou animale. On les trouve dans environ 300 familles de plantes (Othman et al., 2019).

Les alcaloïdes sont des structures hétérocycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote. Ils sont classés en fonction de leur structure chimique ou de leur origine naturelle.

Il existe deux grandes divisions dans la classification en fonction de la structure chimique (Othman et al., 2019) :

- **La première division ;** comprend les alcaloïdes non hétérocycliques ou atypiques, également appelés protoalcaloïdes ou amines biologiques, comme l'hordénine ou la N-méthyltyramine, la colchicine et l'érythromycine (Othman et al., 2019).
- **La deuxième division ;** comprend les alcaloïdes hétérocycliques ou typiques tels que les hygrines appartenant au groupe des pyrroles et des pyrrolidines, et la quinine appartenant au groupe des quinolines. La deuxième division peut être divisée en 14 groupes sur la base de la structure du cycle (Othman et al., 2019).

Les alcaloïdes végétaux bien connus comprennent les analgésiques narcotiques, la morphine et la codéine, l'apomorphine (un dérivé de la morphine) utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, la papavérine, un relaxant musculaire, et les agents antimicrobiens sanguinaire et berbérine. Plusieurs médicaments anticancéreux puissants ont également été mis au point à partir de plantes composés végétaux (Noureddine, 2018).

III.2. La phytothérapie :

III.2.1. Définition :

Le terme « phytothérapie » se divise étiologiquement en deux termes qui sont « phuton » et « therapia » en grecque et cela signifie « plante » et « traitement » (Limonier, 2018). La phytothérapie a d'abord été définie comme une discipline allopathique, basée sur l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales qui s'appuie sur la connaissance de la tradition (Bellamine, 2017). Elle est destinée à traiter certains dysfonctionnements et certains cas pathologiques à partir des plantes, ou partie spécifique de plantes, ou bien une préparation à base de plantes (Limonier, 2018).

On distingue deux types de phytothérapies :

- **La phytothérapie traditionnelle :** C'est une thérapie de substitution destinée à traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent être parfois très antiques, elle est basée sur l'utilisation des plantes selon leurs vertus découvertes de manière expérimentale (Chabrier, 2018).

- **La phytothérapie clinique :** C'est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie (Chabrier, 2018).

III.2.2. Les différents types de la phytothérapie :

III.2.2.1. Homéopathie :

Homéopathie est un système mis au point par Samuel Hahnemann à Leipzig entre 1811 et 1820. Le mot homéopathie est dérivé du grec « homois » (comme) et « pathie », un suffixe désignant curatifs du grec au traitement pathia (souffrance) (Wyk et Wink, 2017). Elle est basée sur l'étude des symptômes provoqués par chaque substance administrée à un sujet normal, puis appliquée à chaque patient qui présente des symptômes similaires. Toutefois, un doute subsiste quant à l'origine exacte de ces symptômes et à la manière dont les médicaments agissent du point de vue énergétique (Wei Ling, 2020).

La théorie est basée sur l'hypothèse que les plantes peuvent être utilisés sous une forme très diluée de maladie traitent associées aux symptômes produits par des doses élevées de la même végétaux (Wyk et Wink, 2017).

III.2.2.2. Aromathérapie :

L'aromathérapie semble être une ancienne pratique africaine, le terme a été utilisé pour la première fois par le chimiste français René Gattefossé en 1928 (Wyk et Wink, 2017).

C'est un système de guérison qui utilise des huiles essentielles sous forme d'inhalation de massages, des bains et des parfums à la maladie à traiter et à maintenir la santé. Le pouvoir

de guérison des substances aromatiques est connu depuis les temps anciens et les plantes médicinales aromatique se trouvent dans toutes les cultures de guérison à travers le monde (Wyk et Wink, 2017).

III.2.2.3. Gemmothérapie :

La gemmothérapie, également appelée phyto-embryo-thérapie, est une méthode homéopathique moderne de drainage biothérapeutique utilisant des extraits de divers arbres et arbustes. La matière première que constituent les bourgeons, les pousses émergentes, les graines, les radicules et la sève est prélevée au moment de la germination annuelle de la plante (Raiciu, 2019).

III.2.3. Mode d'extraction et d'utilisation des plantes médicinales :

III.2.3.1. Décoction :

Les décoctions sont des préparations aqueuses de parties de plantes bouillies dans de l'eau pendant 15-20 minutes jusqu'à ce que le volume de l'eau soit réduit de moitié.

Elles sont préparées en brisant les parties de la plante en petits morceaux avant de les faire tremper dans une certaine quantité d'eau dans un récipient en terre cuite. L'eau doit recouvrir les parties de la plante. Préparation est bouillie jusqu'à ce que le volume d'eau soit réduit de moitié. La préparation bouillie est filtrée, refroidie et réfrigérée, elle peut être conservée pendant 2 ou 3 jours (Nafiu *et al.*, 2017).

III.2.3.2. Infusion :

Les infusions sont préparées à partir d'herbes séchées ou fraîches comme la préparation de thé. Les matières végétales sont trempées dans de l'eau chaude et laissées reposer pendant 10 minutes. On filtre ensuite l'infusion et on la boit chaud ou glacé. C'est juste pour une utilisation d'une journée (Nafiu *et al.*, 2017).

C'est une méthode simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales (Benzeggouta, 2015).

III.2.3.3. Macération :

Dans ce procédé, la drogue brute entière ou grossièrement pulvérisée est placée dans un récipient bouché avec le solvant et laissée au repos à température ambiante pendant une période d'au moins 3 jours avec une agitation fréquente jusqu'à ce que la matière soluble soit dissoute. Le mélange est ensuite filtré, le marc (la matière solide humide) est pressé, et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos. Cette méthode est la plus appropriée dans le cas des médicaments thermolabiles (Nafiu *et al.*, 2017).

III.2.3.4. Distillation :

C'est une ancienne méthode dont lequel on utilise la vapeur d'eau pour récupérer les principes volatils. Les eaux distillées ou hydrolats, sont obtenues par distillation de la plante (feuilles, tiges...), alors que les eaux florales sont obtenues de la même manière mais à partir des fleurs. C'est une technique traditionnelle encore utilisée à Constantine pour l'extraction de certaines plantes aromatiques (Benzeggouta, 2015).

III.2.3.5. Poudre :

C'est la manière la plus courante et la plus simple de préparer les produits à base de plantes. Avec un mortier et un pilon, les plantes bien séchées sont écrasées et broyées en une poudre fine et uniforme. La poudre est conservée dans des flacons propres et doit être aussi fine que possible pour assurer une solubilité plus rapide (Nafiu et al., 2017).

III.2.3.6. Homogénéisation des tissus végétaux :

L'homogénéisation des tissus végétaux dans un solvant a été largement utilisée par les chercheurs. Des parties de plantes fraîches, séchées ou humides, les parties de plantes fraîches sont broyées dans un mixeur jusqu'à obtenir de fines particules, mises dans une certaine quantité de solvant, et secouées vigoureusement pendant 5 à 10 minutes ou laissées pendant 24 heures, après l'extrait est filtré. Le filtrat peut ensuite être séché sous pression réduite et redissous dans le solvant pour déterminer la concentration. Certains chercheurs, cependant, centrifugent le filtrat pour clarifier l'extrait (Nafiu et al., 2017).

III.2.3.7. Concoctions :

Il s'agit de préparations aqueuses de différentes parties de plantes trempées ou bouillies dans l'eau pendant une période donnée. Si l'on fait bouillir, on le fait pendant 15-20 minutes, mais si l'on fait tremper, on le fait pendant 3 jours avant de le consommer pour assurer une extraction complète (Nafiu et al., 2017).

III.2.3.8. Digestion :

Il s'agit d'un type de macération dans lequel une chaleur douce est appliquée pendant le processus de macération. Il est utilisé lorsque la température modérément élevée n'est pas inacceptable et que l'efficacité du solvant du menstruum s'en trouve augmentée (Nafiu et al., 2017).

III.2.4. Les avantages des médicaments à base de plantes :

L'utilisation d'extraits de plantes peut avoir de plus grands avantages pour le traitement des maladies que l'utilisation d'un composé isolé.

L'un des avantages des médicaments à base de plantes est leur composition complexe, étant donné que l'activité biologique peut être le résultat de la combinaison de plusieurs composés (Amparo *et al.*, 2020).

Un autre avantage de la composition complexe des médicaments à base de plantes est la synergie. Les avantages des effets synergiques sont basés sur quatre mécanismes :

- Une action multi-cibles (enzymes, récepteurs, transporteurs biomolécules, etc.).
- Des effets pharmacocinétiques ou physicochimiques (qui augmentent la solubilité, les niveaux de réabsorption et la biodisponibilité des substances).
- L'antagonisme aux mécanismes de résistance des micro-organismes.
- L'élimination ou la neutralisation des effets indésirables d'une substance par une autre présente dans l'organisme, d'une substance par une autre présente dans le même extrait (Amparo *et al.*, 2020).

III.2.5. Inconvénients des médicaments à base de plantes :

Les médicaments à base de plantes ne peuvent pas être utilisés pour soigner des blessures graves. Parfois, l'auto-dosage de diverses herbes peut entraîner de graves conséquences chez les utilisateurs. Si les herbes nécessaires ne sont pas identifiées correctement, elles peuvent même conduire à un empoisonnement. Comme on peut le constater, les médicaments à base de plantes ne sont pas efficaces pour traiter les urgences et toute maladie aiguë (Maqbool *et al.*, 2019).

Comme la plupart des médicaments sont conçus pour agir au niveau moléculaire de la physiologie, le médicament prend son temps pour donner des résultats. Cependant il existe quelques médicaments à base de plantes qui agissent instantanément dans des conditions aiguës comme la diarrhée, ...etc. (Maqbool *et al.*, 2019).

IV. PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES :

IV.1. Présentation de la plante *P.granatum* :

La grenade (*Punica granatum*), l'un des fruits comestibles les plus anciens, aujourd'hui elle est largement consommée dans le monde entier. Ses fruits et ses graines, ainsi que d'autres compartiments anatomiques (par exemple, les fleurs et les feuilles) sont riches en nombreux composés bioactifs. Par conséquent, l'intérêt scientifique pour cette plante n'a cessé de croître ces dernières années Il a été démontré que la grenade et ses extraits présentent de puissants effets antioxydants, des propriétés antimicrobiennes et anticarcinogènes (Wang et al., 2018).

IV.1.1. Description de la plante :

Le grenadier est un arbuste fruitier dont le hauteur moyen entre 3m et 4m, les rameaux sont grêle et parfois épineux (Dossin, 2019). Le grenadier est monoïque, il porte sur la même plante des fleurs male qui produisent le pollen, et des fleurs femelles qui produisent le fruit, elles sont solitaires, rouge vif, à 3-7 pétales épaisses et grandes. Les fleurs femelles sont plus grandes, en forme de cruche et longistylées, contrairement aux fleurs males sont plus petites, campanulées et brévistyles (Dossin, 2019).

Le fruit du grenadier nommé grenade, est une baie ronde à écorce dure et coriace, de couleur rouge contiennent des grains pulpeux, il renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge, ses pépins sont comestibles (Sanaa, 2013).



Figure 7 : (A) le grenadier, (B) la fleur de grenadier (C) la baie de grenadier (DOSSIN, 2019)

IV.1.2. Origine géographique et distribution de la grenade :

La grenade est parmi les premiers fruits domestiqués qui a cultivé depuis longs temps. Elle est apparue en Iran et dans les pays voisins, et graduellement développé dans les régions

d'Asie centrale, dans l'Eyalet d'Anatolie, l'Himalaya, au Moyen-Orient et dans la région méditerranéenne, également en Arizona et Californie (Shaygannia et al., 2016).

IV.1.3. Classification botanique :

Nom botanique - *Punica granatum*

Règne : Plantae (Angiospermes)

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones vraies

Sous Classe : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* (Kumari et al., 2018 ; Ali et Habib, 2017)

IV.1.4. Utilisation traditionnelle :

Punica granatum est une plante qui a utilisé traditionnellement dans plusieurs pays. En Iran, les fleurs de grenade sont utilisées comme astrigent, antibactérien, antivirale, antifongique, également utilisé comme remède contre la bronchite, la diarrhée, les plaies infectées par le derme et le diabète ... etc. En Turquie, au sud d'Anatolie, plusieurs personnes utilisent l'écorce pour la protection contre les infections cutanées. En médecine chinoise, les fleurs sont utilisées pour le traitement des blessures causées par les chutes des cheveux et les cheveux gris de jeune homme. Elle est considérée comme une pharmacie part entière dans la médecine ayurvédique, aussi utilisé comme agent antiparasitaire, tonique sanguin et pour guérir les ulcères (Dipak et al., 2012). En Algérie, la grenade est utilisée dans le traitement du diabète sucré, les maladies urinaires et le cancer de prostate (Sekkoum et al., 2011).

IV.1.5. Composition chimique de *Punica Granatum* :

Selon les récentes recherches, les composants chimiques de *P.granatum* sont principalement des tanins hydrosoluble (gallotannins et ellagitannins), des acides organiques, l'acide ellagique et ses dérivés, les anthocyanes/anthocyanidines, proanthocyanidines, l'acide gallique, des flavonoïdes, des alcaloïdes, terpènes et terpénoïdes, vitamines ainsi que les stérols, lignanes, saccharides, acides gras. Les compositions chimique de la grenade sont

différents selon les parties de la grenade (les fruits, les graines, les feuilles et les écorces) (Ge et al., 2021 ; Wang et al., 2018).

L'écorce de *P. granatum* est une source importante de composés bioactifs comme les acides phénoliques (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques), les tanins hydrolysables (ellagitannins, gallotannins et esters de gallagyle) et les flavonoïdes y compris des flavonols, du flavan-3-ol et des anthocyanines. Aussi il contient jusqu'à 0,2 % de dérivé de l'acide ellagique, de précurseurs d'acide hexa-hydroxy biptalique et de leurs glycosides et une teneur relativement faible en alcaloïdes (de pipéridine et de pyrrolidine) (Ge et al., 2021; Singh et al., 2018).

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que l'apigénine et la lutéoline qui possèdent des propriétés anxiolytiques (Wald, 2018).

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique et des triterpènes comme l'acide ursolique (Wald, 2018).

La peau du fruit renferme deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Également elle renferme des dérivés de flavones, des acides hydroxycinnamiques, molécules de coloration jaune, et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades (Wald, 2018).

Il y a aussi de nombreux ellagitannins, comme la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B. Ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit. Pourrait aussi trouver La pelletière dans la peau de la grenade (Wald, 2018).

IV.1.6. Activités biologiques de *Punica granatum* :

L'extrait aqueux de l'écorce de *P. granatum* est beaucoup plus utilisé pour traiter des troubles et maladies, tel que les troubles inflammatoires, l'ulcère, les infections microbiennes et certains cancers (Neyrinck et al., 2012; Bachoual et al., 2011).

Des études récentes ont montré des effets antioxydants de la grenade dont sa capacité à réduire le fer, à piéger le radical anionique super oxyde ($O_2^{\cdot -}$) le radical hydroxyle ($\cdot OH$), et le radical DPPH (DPPH) et d'inhiber la peroxydation lipidique (Ge et al., 2021).

Les extraits de *P. granatum* quel que soit la nature de l'extrait (écorce, fleur, feuilles,...) ont un effet inhibiteur sur plusieurs types de cancer, notamment le cancer des seins, de la prostate, la vessie et du colon, ainsi que le carcinome hépatocellulaire, le gliome cérébrale, la leucémie et d'autres maladies (Ge et al., 2021).

Des études préliminaires ont montré que l'extrait d'écorce de *P. granatum* possédait une activité réductrice de la glycémie. Au cours de traitement d'un groupe diabétique avec l'extrait aqueux de l'écorce de *P. granatum*, il y a une amélioration de leurs poids corporel, contrairement au groupe diabétique qui ne sont pas traité par l'extrait, une perte de poids a été observée (**Khalil, 2004**). L'extrait de l'écorce de *P. granatum* réduit de manière significative la glycémie en augmentant le taux d'insuline.

Des nouvelles études ont montré que la peau de grenade et ses extraits ont une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries à Gram⁻ et Gram⁺, avec une concentration minimale inhibitrice de 0,2-0,78 mg/ml. Il a une importance dans la conservation des aliments parce qu'il est un agent antibactérien naturel (**Ge et al., 2021**).

Des résultats ultérieurs ont indiqué que parmi les compositions de grenade, c'est la fleur qui montre le meilleur effet anti-athérosclérotique en réduisant de manière significative la surface des lésions athéro-sclérotiques de 70% et réduisant les taux de lipides sériques et de glucose de 18% à 25% (**Ge et al., 2021**).

Des études récentes ont comparé l'utilisation d'un gel à base de miconazole, antifongique imidazole, à celle d'un gel contenant de la poudre de péricarpe de grenades, sur l'adhésion de microorganismes responsables d'infections bucco-dentaires, telles que caries, parodontites ou stomatites (**Wald, 2018**). Il apparaît donc qu'un gel à base de péricarpe de grenade puisse éviter, *in vitro*, l'adhésion de bactéries et de levures responsables d'infections bucco-dentaires telles que caries, infections parodontales, stomatites ou candidoses (**Wald, 2018**).

La peau de grenade renferme une activité fongistatique. Elle est capable de bloquer la croissance, pendant des périodes variées, de divers organismes fongiques telle que celle de *Penicillium citrinum* durant 8 jours, *Penicillium patulum* durant 4 jours, *Penicillium roquefortii* et *Aspergillus ochraceus* durant 3 jours. Grâce à la présence de punicalagine, la peau de grenade se montre très efficace contre *Candida albicans* (**Wald, 2018**).

Les études de Gil et ses collaborateurs montrent que parmi les principaux composés bioactifs ayant une activité antifongique dans les écorces de grenade sont les ellagitanines et les punicalagines (**Gil, 2000**).

Glazer et al., 2012 ont examiné l'effet des extraits aqueux de l'écorce sur les taux de croissance de six champignons filamenteux pourris, *A. alternata*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *S. botryosum*, *B. cinerea* et *Fusarium spp.* Il s'est avéré que, considérant que les taux de croissance de *P.*

expansum et *B. cinerea* étaient améliorées comme prévu, aucun effet n'a été observé sur la croissance de *P. digitatum*, tandis que les taux de croissance de *A. alternata*, *S. botryosum* et *Fusarium spp* ont été inhibés par la présence de l'extrait aqueux de l'écorce

Grace à ces études on aimerai bien présenter un business plan 2022 pour notre projet, ce business plan proposer et validé par **Mme Mouri Fouzia**, enseignante professionnelle dans le domaine de l'entrepreneuriat, sachant que ce projet a eu une mention très bien 17/20 avec une observation positive disant que c'est une idée très réussie et qu'elle peut être concrétisée dans la vie réelle.

IV.1.7. Toxicité de *Pgranatum* :

Il a été démontré que les effets toxiques de l'extrait de fruit de *Punica granatum* se produisaient à des doses plus élevées que celles efficaces dans les modèles où son activité antivirale a été étudiée ou que celles utilisées dans la médecine traditionnelle cubaine (**Wald, 2018**).

IV.2. Présentation du Genre *Cistus* sp :

IV.2.1. Description du Genre *Cistus*

Le genre *Cistus* (famille des Cistaceae) sont des arbustes à fleurs dicotylédones, vivaces, de couleur blanche ou rose selon les espèces (**Stepień, 2017**), en coupe à 5 pétales chiffonnés ne durent qu'un jour, mais sont aussitôt remplacées par d'autres. Ils forment de petits buissons de 0,30 à 1,50 m environ de haut. Leur feuillage, qui varie selon les variétés du vert foncé au vert argenté en passant par le jaune ou le panaché, est persistant et leurs feuilles souvent velues sont poisseuses au toucher (**Laraoui, 2016**).

Poussant naturellement en Europe principalement dans la région méditerranéenne et en Afrique occidentale et Asie (**Stepień, 2017**), aussi ils poussent spontanément dans les garrigues et talus du Midi aux sols secs, bien ensoleillés, que le sol soit caillouteux, pauvre, acide ou calcaire (**Laraoui, 2016**).



Figure 9 : la fleur et les feuilles de genre *Cistus sp* (original)

IV.2.2. Classification botanique :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Tracheobionta ou Angiospermes

Classe : Magnoliopsida ou Dicotylédones

Sous-classe : Dilleniidae

Ordre : Malvales

Famille : Cistaceae

Genre : *Cistus* (Laraoui, 2016).

IV.2.3. Utilisation thérapeutique et traditionnel :

Toutes les espèces de *Cistus* sont fréquemment utilisées dans des nombreux médicaments traditionnels pour leurs propriétés anti-microbiennes, anti-virales, anti-tumorales et anti-inflammatoires (Bouamama et al., 2006).

Traditionnellement, de nombreuses espèces de *Cistus* sont utilisées dans la médecine populaire méditerranéenne, sous forme d'infusions pour traiter les problèmes digestifs et les rhumes, et sous forme d'extraits pour le traitement des maladies et de parfums (Papaefthimiou et al., 2014).

En Italie, Grèce, Espagne et Turquie diverses espèces de genre *Cistus* sont utilisées pour le traitement de la diarrhée et des ulcères gastro-duodénaux, pour plusieurs maladies de la peau et comme des agents anti-inflammatoires, elles sont utilisées également pour leurs propriétés antidiabétiques, antimicrobiennes et cytotoxiques.

IV.2.4. Composition chimique :

Les espèces de *Cistus* sont riches en composés polyphénoliques (les principaux composants sont des composés polyphénoliques, communément appelés catéchines). Cette caractéristique rend ces plantes capables de résister à des conditions extrêmes. Le métabolisme des polyphénols protège les plantes contre différents stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques (Zalegh et al., 2021). Également reconnues pour contenir de multiples composés de différentes classes chimiques telles que les flavonoïdes, les coumarines, les dérivés terpéniques, les hydrocarbures (Zalegh et al., 2021).

IV.2.5. Activités biologiques :

La littérature scientifique confirme leurs précieuses propriétés phytothérapeutiques comme agents anti-inflammatoires, antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiallergiques, antimicrobiens et analgésiques. Leur activité biologique est principalement due aux composés polyphénoliques antioxydants qui sont présents et qui sont considérés comme des agents thérapeutiques potentiels dans un large éventail de maladies telles que l'hypertension, le diabète et la maladie d'Alzheimer, et autres (Stepień, 2017).

IV.2.6. Toxicité de genre *Cistus sp* :

Certains métabolites secondaires produits par *Cistus sp* exercent des effets toxiques sur les mammifères. Des convulsions et une lipofuscinose dans le système nerveux central ont été signalées chez les moutons comme étant directement liées à la pâture de *Cistus sp* (Papaefthimiou et al., 2014). Les composés les plus toxiques sont l'acide gallique et les tannins, qui sont néfastes pour le foie et les reins (Papaefthimiou et al., 2014).

En outre, l'extrait de *C. laurifolius* riche en flavonoïdes était responsable d'effets dégénératifs sur le système nerveux périphérique provoquant un syndrome convulsif chez les souris (Papaefthimiou et al., 2014).

La consommation directe des plantes ou de leurs extraits (sous forme d'infusions de thé) en grandes quantités peut devenir nocive, dangereuse et même mortelle (Papaefthimiou et al., 2014).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes :

I. Matériel :

I.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des écorces de *P.granatum*, les fruits des grenades ont été achetées du marché on mois d'novembre et la deuxième plante *Cistus sp*, ont provient de la Wilaya de Khenchela en avril 2022.

Le fruit *P.granatum* (l'écorce) et la partie aérienne de la plante *Cistus sp* (feuilles, fleurs et tiges) ont été lavés avec de l'eau, (les écorces de grenade et les feuilles de cistus sp) ont été séchées à l'ombre pendant 21jour, à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante. Après séchage, les écorces et feuilles ont été broyées dans un moulin à café, stockée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation.

I.2. Matériel animal :

Les rats et les souris qu'ont été utilisés pour les études sont des rats mâles et des souris femelle à l'espèce Wistar albinos, qui présent entre 150 g et 300 g pour les rats, entre 20g-35g pour les souris, les animaux sont placés dans des cages (50 x 60 x 53cm³). L'adaptation effectuer au niveau de l'animalerie de l'université de frères Mentouri Constantine, sous des conditions naturelles de température égale à 24 et d'humidité 72%. La photopériode est de 12/24 heures. Les animaux reçoivent la nourriture « type d'aliment standard, fournies par l'Office National des Animaux du Bétail de Ain M'Lila (ONAB) » et l'eau à volonté.

L'identification individuelle des rats se fait par numérotation au niveau de la queue à l'aide d'un marqueur permanent.

I.3. Réactifs :

- Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de grade analytique (Le méthanol, l'éthanol, le formol) ont été fournis par Sigma- Aldrich.
- Les différents acides sont : L'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide Tannique de Sigma.
- Les réactifs chimiques sont : L'albumine sérique bovine (BSA) et le trichlorure d'aluminium (AlCl₃), le phosphate de sodium (Na₃PO₄) ont été fournis par Sigma-Aldrich, le Folin-Ciocalteu (FCR) par Biochem.
- Les sels sont : Bicarbonate de sodium (Na₂CO₃), Chlorure de Sodium (NaCl), Sodium phosphate dibasique (Na₂HPO₄), potassium phosphate dibasique (K₂HPO₄), potassium

dihydrogène phosphate (KH_2PO_4) de Sigma, sodium dihydrogène phosphate (NaH_2PO_4) de Labosi.

- D'autres produits chimiques utilisés : le DPPH, le BHA, le Trolox, Acide ascorbique, FeCl_3 , la quercétine ont été fournis par Sigma-Aldrich, le Folin-Ciocalteu (FCR) par Biochem, tris base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH}_3)$) par Sigma- Aldrich, le diclofénac, l'aspigique sodique et tramadoil fournis par SAIDAL, la Streptozotocine par sigma.

I.4. Appareillage:

- pH mètre (*Meter Lab –PHM210*)
- Centrifugeuse (*Sigma 3K30*)
- Spectrophotomètre (*Perkin Elmer- UV/Vis Lambda 25*)
- Bain-marie (*MEMMERT*)
- Etuve (*MEMMERT*)
- Balance de précision (*Explorer OHAUS*)
- Agitateur avec plaque chauffante (*Kika werk- RCT basic*)
- Glucomètre (*Diagno-Ckeck ® Smart*)

II. Méthode :

II.1. Méthodes d'extraction :

II.1.1. Préparation des extraits aqueux infusés :

L'extraction des substances bioactives contenues dans les plantes (**l'écorce de *Punica granatum* et *Cistus sp***) est réalisée par infusion dans l'eau distillée.

Après broyage des plantes par un moulin à café et chauffage de l'eau distillée à 45°C par une plaque chauffante les poudres (50g) des plantes (**l'écorce de *P.granatum L* et *Cistus sp***) sont additionnés à 500ml d'eau distillée bouillon puis laissé 3h pour infusion avec agitation de temps en temps. L'infusion obtenu est ensuite filtrée plusieurs fois sur un passoire, un filtre, du coton hydrophile, centrifugé à 3000 tours/min pendant 12 minutes pour se débarrasser des débris puis filtré sous vide à l'aide du papier Wattman N°1.

Le filtrat récupéré est versé dans des boîte de pétri en verre et séché à l'étuve à 45 °C afin de protéger les molécules des extraites. La poudre obtenue constitue l'extrait aqueux de la plante et stockée à -20°C.

L'extraction est faite au niveau du laboratoire de l'animalerie de l'université des Frères Mentouri Constantine1.

II.1.2. Rendement de l'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après séchage, et exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction.

Il est calculé suivant la formule présentée ci-dessous :

$$R (\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

- **R : (%) :** Rendement exprimé en %
- **M :** Masse en gramme de l'extrait sec obtenu
- **M₀ :** Masse en gramme de la poudre végétale utilisée (50g pour chaque plante)

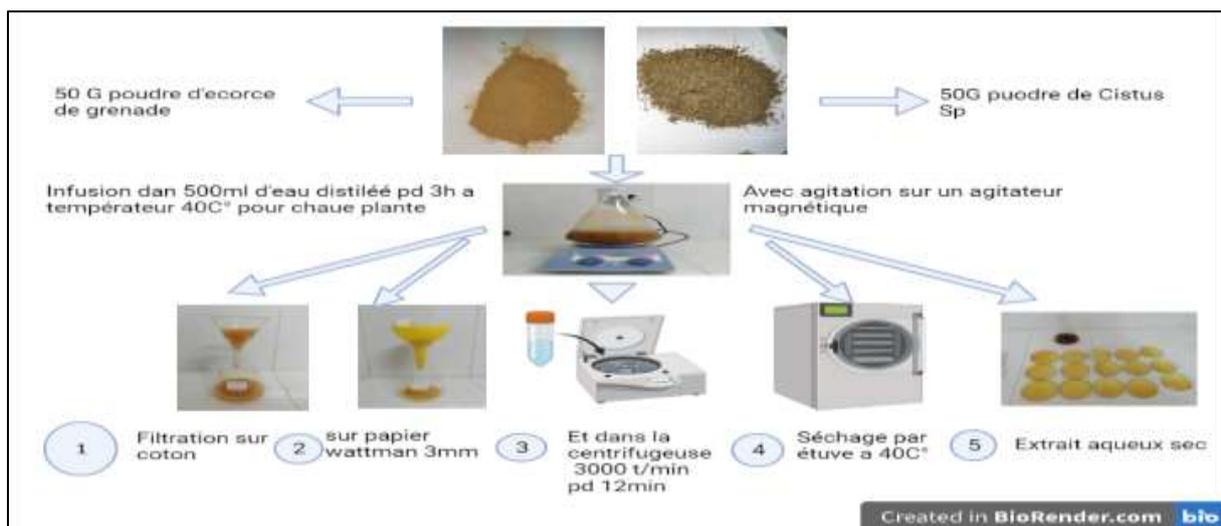


Figure 10 : Méthode de préparation des extraits aqueux (BIORENDER)

II.2. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols et des flavonoïdes :

Les tests phytochimiques sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal par des réactifs chimiques spécifiques. La caractérisation quantitative des extraits aqueux des deux plantes a été réalisée de la manière suivante :

II.2.1. Dosage des composés phénoliques :

II.2.1.1. Dosage des composés phénoliques totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait (Ali-Rachedi et al., 2018)

A) Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PW_{12}O_{40}$). En présence d'un phénol, ce réactif est réduit dans un milieu alcalin en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 760 et 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

B) Méthode de dosage :

Dans des Tubes à essai 125UL de chaque extrait ou standard dissous dans le méthanol sont mélangés avec 500UL D'eau distillée et 125UL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 min, 125 μ L Na_2CO_3 2 % et 1000 μ L eau distillée sont ajoutés à la solution précédente, mélangés et incubés à une température ambiante et à l'obscurité pendant 90 min. lecture de la D.O. à 760nm.

Une courbe d'étalonnage standard a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires avec différentes concentrations (0-800 μ g/ml) d'acide gallique ainsi que l'acide tannique. La teneur en phénols totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'extrait brut. Les analyses ont été effectuées 3 fois et la valeur moyenne a été calculée.

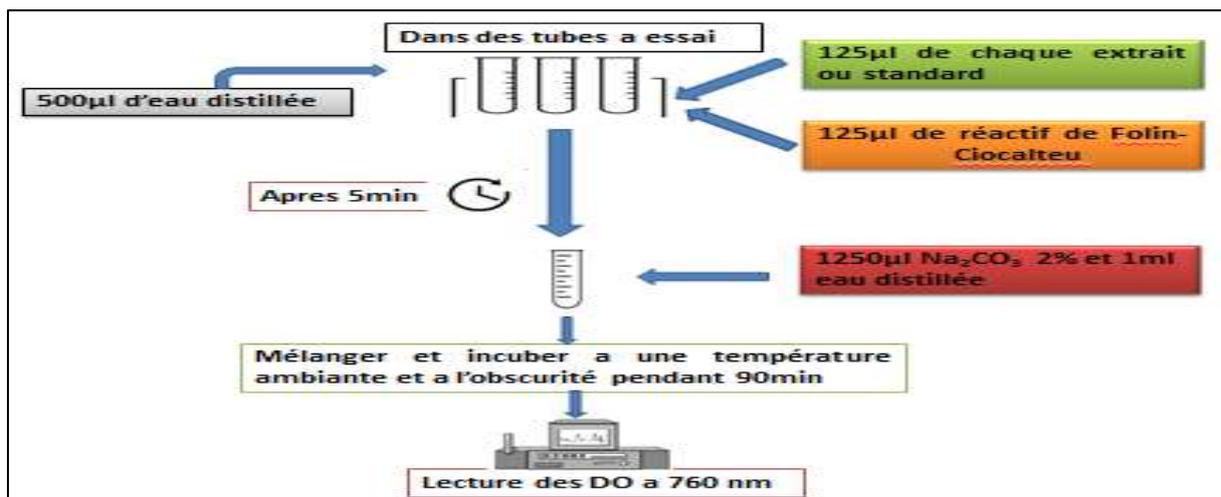


Figure 11 : Protocol de dosage des composés phénoliques (BIORENDER)

II..2.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de coloration jaune, orange et rouge de différents organes de végétaux (Ghedira, 2005).

A) Principe :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes, qui donnent une couleur jaunâtre par chélation des métaux(Lagnika *et al.*, 2005)

B) Méthode de dosage :

Dans des tubes à essais ,1 ml de chaque extrait (préparer avec des dilutions convenables dans le méthanol ou l'eau distillée) a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2 % dans le méthanol). Après 60 minutes d'incubation, l'absorbance est effectuée à 415 nm.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine/g d'extrait brut en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires avec différentes concentrations de quercétine (0-800 μ g/ml). Les analyses ont été effectuées 3 fois et la valeur moyenne a été calculée.

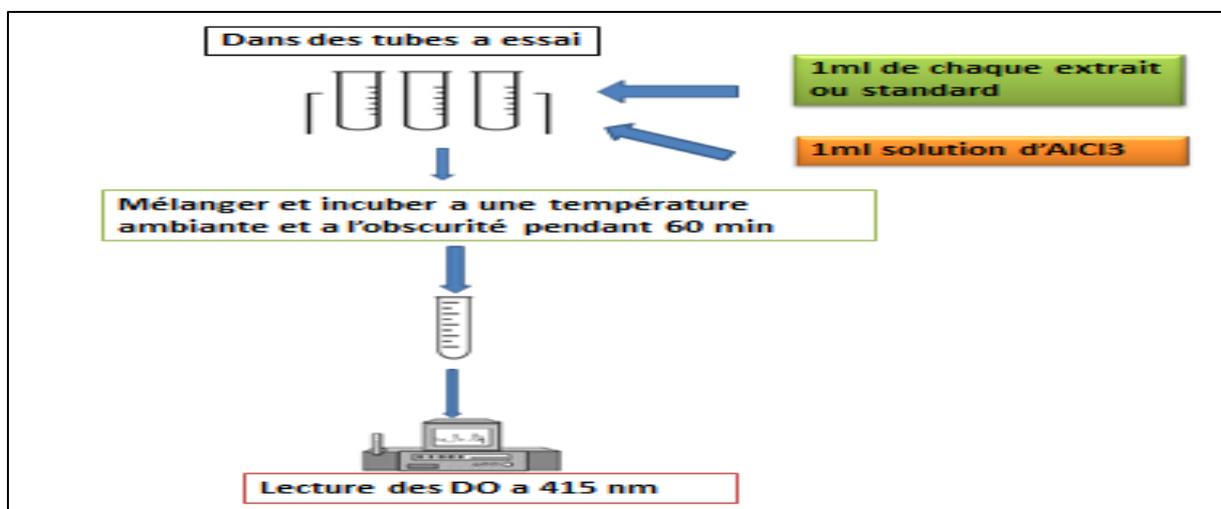


Figure 12 : Protocol de dosage des flavonoïdes (BIORENDER)

II.3. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro :

II.3.1. L'inhibition de la dénaturation de BSA :

La dénaturation des protéines est l'une des causes bien documentées de l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire (Osman *et al.*, 2016 ; Rahman *et al.*, 2015).

A) Principe :

L'effet anti-inflammatoire in vitro des extraits *P.granatum et Cistus Sp* est déterminé en utilisant le test d'inhibition de la dénaturation du BSA selon le protocole de (Kandikattu, 2013) avec de légères modifications. Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par les extraits.

a) Préparations des solutions :

- Préparation du Tris-HCl 0.05 M PH 6,6.
- Préparation des Différentes concentrations de l'extrait de plante à partir d'une solution mère de 10 000 ppm.
- Préparation du standard (Différente concentration de Diclofénac sodique).
- Préparation des blancs :
 - Pour chaque concentration d'extrait, un blanc constitué de 1ml d'extrait et de 1ml de Tris-HCl (0,05 M à pH 6,6) est préparé Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et du Tris-HCl des résultats obtenus.
- Préparation de la solution BSA 0,2%.

B) Mode opératoire :

Pour d'évaluer l'activité anti-inflammatoire, une gamme de concentrations de chaque extrait végétal, allant de 0 à 10 mg/ml, est réalisée. 1ml de chaque dilution est ajouté à 1 ml de la solution de BSA à 0,2 % préparée dans le Tris-HCl (0,05 M à pH 6,6). Le mélange est ensuite incubé à 37 C ° pendant 15 min puis à 72°C pendant 5 min. A la fin de l'incubation, et après l'avoir vortexé, le mélange est refroidi rapidement, puis la turbidité est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans ce test, le Diclofénac a été utilisée comme anti-inflammatoire de référence. L'évaluation de son activité anti-inflammatoire a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles appliquées aux échantillons.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Protection (\%)} = \frac{[DO \text{ Control} - DO \text{ blanc}] - (DO \text{ échantillon} - DO \text{ blanc})}{(DO \text{ controle} - DO \text{ blanc})} \times 100$$

- **DO Blanc** : Absorbance de l'extrait sans BSA.
- **DO Echantillon** : Absorbance de l'échantillon ou standard (test).
- **DO Contrôle** : Absorbance solvant utilisé pour les extraits et du BSA.

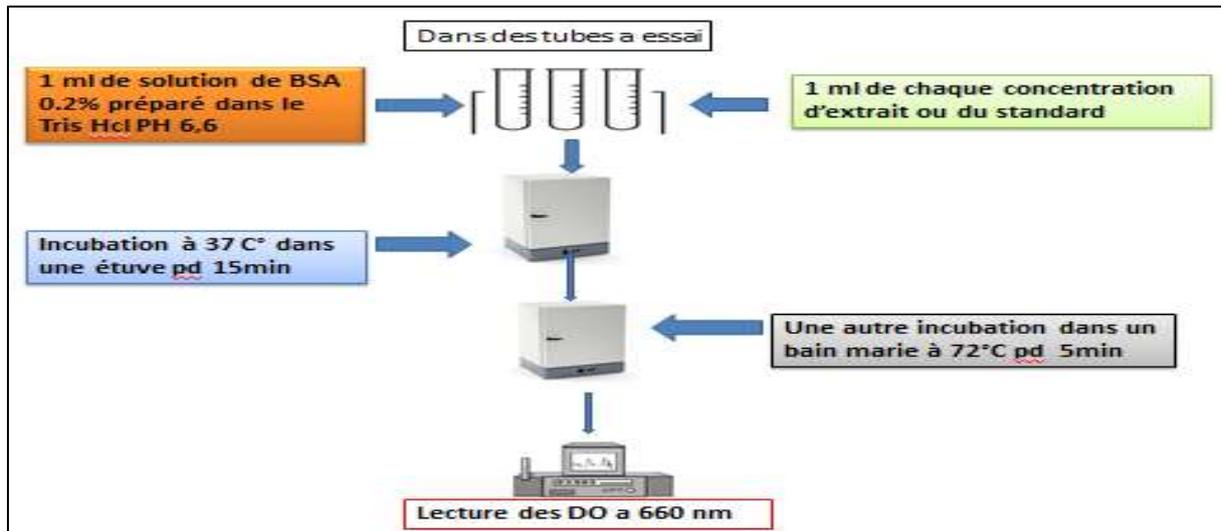


Figure 13 : Protocole de l'inhibition de la dénaturation de BSA (BIORENDER)

II.4. La méthode de stabilisation des membranes (Activité anti-hémolytique) :

L'objectif de cette étude est l'évaluation de la capacité des extraits aqueux de *P. granatum* et *Cistus Sp* à empêcher l'hémolyse des globules rouges (GR), induite d'une part par un stress osmotique et thermique. L'utilisation des globules rouges est motivée par le fait qu'ils soient admis comme modèle cellulaire en recherche scientifique et qu'ils partagent des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment celle du lysosome.

L'exposition des érythrocytes à une concentration saline hypotonique et à la chaleur conduit à la rupture de leurs membranes avec libération de leur contenu cytoplasmique (hémoglobine). L'intensité de l'hémolyse est estimée par la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée.

a) Préparation de la suspension des érythrocytes :

- Du sang fraîchement prélevé à l'aide d'une seringue graduée a été mis dans des tubes héparinés ensuite centrifugé à 1300g pendant 10 min pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang.
- Après élimination du surnageant, le culot a été récupéré et lavé 3 fois avec une solution d'eau physiologique à 0,9% à température ambiante.
- Chaque lavage consiste en une centrifugation à 1300 g (5min) et une suspension du culot dans l'eau physiologique à 0,9%.
- Après la dernière centrifugation le culot est resuspendu à nouveau dans une solution constituée de tampon phosphate salin (PBS) à PH= 7,4. A raison d'un volume du culot et 9 volumes de PBS, permettant ainsi d'obtenir un hémocrite à 10% (v/v)

b) Test de l'innocuité des extraits vis-à-vis des globules rouges :

Avant de s'intéresser aux propriétés de stabilisation membranaire des extraits de plantes, un test d'innocuité vis-à-vis des cellules érythrocytaires est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser.

A) Mode opératoire :

Pour ce test, une gamme de concentrations des extraits aqueux de *P.granatum* et *Cistus Sp* allant de 0 à 8 mg/ml a été préparée dans un tampon phosphate salin (pH 7,4 ; 0,9% NaCl). 1.6ml de différentes concentrations des deux extraits à tester a été mélangée avec 0.4 ml de la suspension de globules rouges à 10 %. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 min, puis centrifugé à 1300g pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été lu à 540 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. Le Diclofénac est utilisé comme molécule de référence dans cette expérience.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, un contrôle incluant 0.4 ml de la suspension de globules rouges et 1.6 ml d'eau physiologique ou de l'eau distillé, à la place de l'extrait, a été préparé pour vérifier l'état des globules rouges ou le 100 % d'hémolyse, respectivement.

Pour chaque concentration d'extrait ou de standard, un blanc constitué de 1.6 ml d'extrait et de 0,4 ml de tampon phosphate salin (PBS pH 7,5 ; 0,9 % NaCl) est préparé. Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et du PBS des résultats obtenus.

Les pourcentages d'hémolyses de chacune des concentrations utilisées sont calculés :

$$\text{Pourcentage d'hémolyse (\%)} = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ blanc})}{(DO \text{ control} - DO \text{ blanc})} \times 100$$

- **DO Blanc** : Absorbance de l'extrait
- **DO Echantillon** : Absorbance de l'échantillon ou du standard (test).
- **DO Contrôle** : Absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse).

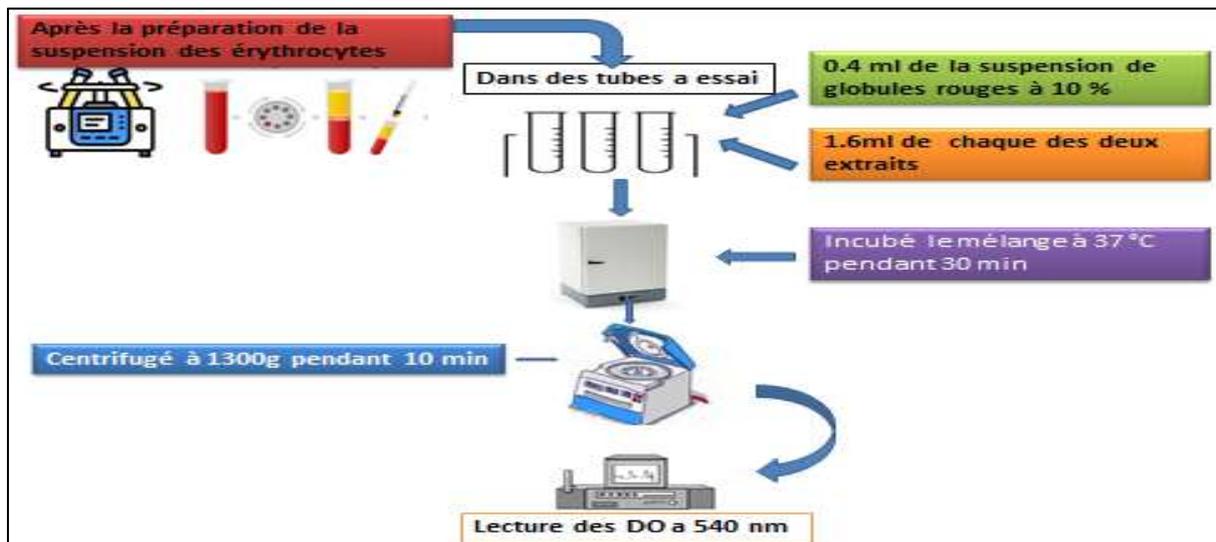


Figure 14 : Protocole du test de l'innocuité (BIORENDER)

B) Evaluation de l'effet des extraits aqueux des plantes sur la stabilisation de la membrane des globules rouges :

La stabilisation de la membrane des globules rouges a été utilisée comme méthode pour étudier l'activité anti-inflammatoire in vitro parce que la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (Marliyah et Ananthi, 2015).

A) Mode opératoire :

- Dans des tubes à essais, 0,25 ml d'extraits aqueux des plantes (dissous dans NaCl 0,9%), 0,75 ml du tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4) et 1 ml de la solution hyposaline (NaCl à 0,36 %) ont été mélangés et incubés à 37 °C pendant 20 min.
- Par la suite, un volume de 0,25 ml de la suspension des érythrocytes (10 %) a été rajouté dans chaque tube, enchaîné d'une incubation, à 56 °C pendant 30 min.
- Les tubes ont été mis dans de l'eau ambiante pendant 20 min, afin d'arrêter la réaction ensuite centrifugé, à 1300g pendant 5 min.
- La lecture d'absorbance du surnageant est faite à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre,
- Le contrôle consiste en un mélange de 1 ml de la solution hyposaline, 1 ml du tampon PBS, 0,25 ml de la suspension de globules rouges et 0,25 ml d'eau physiologique.
- L'acide gallique est utilisé comme molécule de traitement anti-inflammatoire, avec les mêmes concentrations que l'extrait.

- Pour chaque concentration d'extrait ou de standard, un blanc est préparé. Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et du PBS des résultats obtenus.

Le pourcentage d'hémolyse est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'hémolyse (\%)} = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc})}{(\text{DO control} - \text{DO blanc})} \times 100$$

- **DO Blanc** : Absorbance de l'extrait
- **DO Echantillon** : Absorbance de l'échantillon ou du standard (test).
- **DO Contrôle** : Absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse).

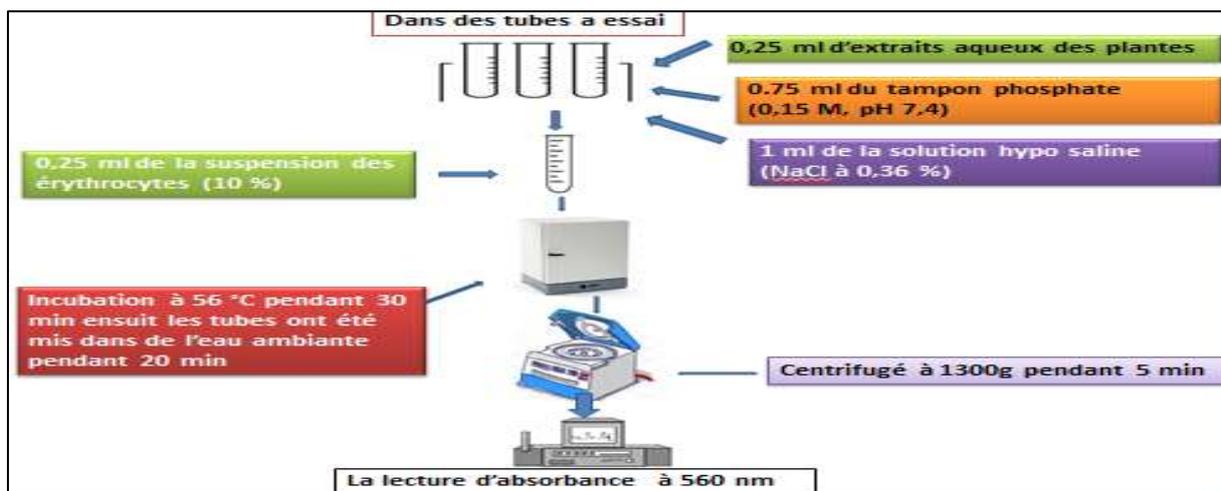


Figure 15 : Protocole de la stabilisation de la membrane des globules rouges (BIORENDER)

II.6. Méthodes de dosage des activités antioxydantes *in vitro* :

II.6.1. Le test de piégeage du radical DPPH :

A) Principe :

Dans ce test, une molécule ou un antioxydant va réagir avec un radical libre stable DPPH^{*} par transfert d'un hydrogène, provoquant une décoloration de la molécule, Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle après réduction (Fofié et al., 2017).

Le dosage du DPPH permet de déterminer, cinétiquement, l'activité anti-radicalaire libre des extraits de plantes, par spectrophotométrie à 517 nm (Blois, 1958).

B) Méthode de dosage en microplaques :

Ce test a été évalué, suivant le protocole appliqué en 1958 par **Blois**, sur une microplaque à 96 puits de volume 200 µl pour chaque puits. Couramment, 160 µl d'une solution de DPPH préparée dans le méthanol (6 mg de DPPH dissout dans un volume de 100 ml de méthanol) est mélangé avec 40 µl de différentes dilutions des extraits des plantes (0–4 mg/ml). Le mélange est gardé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de lumière, Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc composé de 160 µl de la solution de DPPH et de 40 µl de solvant utilisé.

Les échantillons et le blanc sont préparés dans le solvant correspondant et les standards (Le α -tocophérol, BHT et le BHA) sont préparés dans le méthanol absolu. L'absorbance est mesurée par un lecteur à microplaque et le % PI (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant cette formule :

$$\text{PI}\% = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantion}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

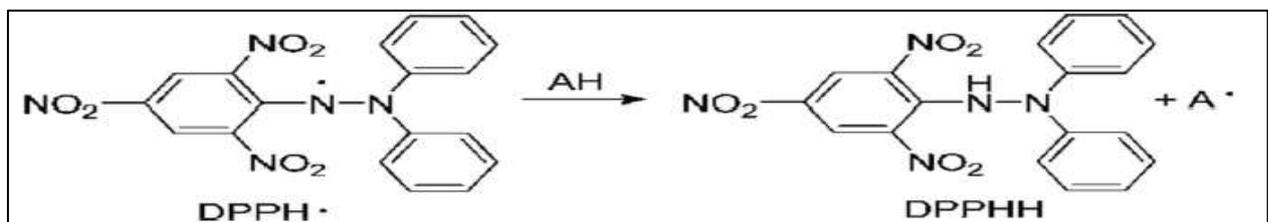


Figure 16 : Equation du radical DPPH transformé en DPPHH (Massaro et al., 2016)

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC_{50}) ; la valeur d' IC_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l' IC_{50} est exprimée en µg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

II.6.2. Le test de piégeage du radical ABTS^{•+} :

A) Principe :

L'activité ABTS est une technique spectrophotométrique basée sur la formation d'un radical cationique coloré (bleu-vert) stable (ABTS^{•+}), à partir de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈). L'ajout d'un antioxydant ; un donneur de H•, permet la réduction de ce radical qui se décolore suite à un transfert d'électron. Cette méthode est déterminée par (Re et al. 1999).

En effet, le dosage de l'ABTS permet de déterminée l'activité antioxydants totale des extraits de plantes à partir de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir d'ABTS,

La décoloration du radical est alors mesurée par spectrophotométrie à 734 nm comparativement à des antioxydants de référence : BHT et le BHA (Marc *et al.*, 2004 ; Re *et al.*, 1999).

B) Méthode de dosage en microplaques :

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Re *et al.*, 1999). 160 µl de l'ABTS⁺ a été déposé en triplicata dans une microplaque, auquel on a ajouté 40 µl d'extraits de plantes à différentes concentrations (0–4 mg/ml). La plaque est alors gardée à température ambiante et à l'abri de lumière pendant 10 minutes, avant lecture de l'absorbance à 734 nm contre un blanc sans échantillon préparé parallèlement dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le solvant. Il s'agit donc d'une mesure en point final proportionnelle à la concentration en antioxydants. L'activité ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$PI\% = \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs de l'échantion}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

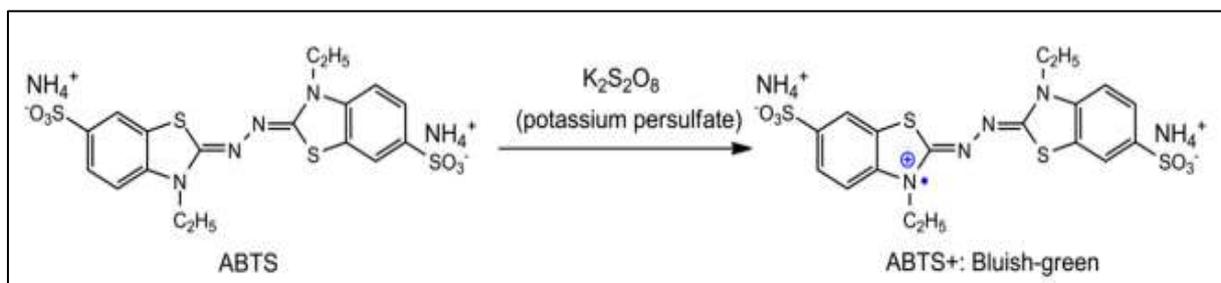


Figure 17 : Formation d'un radical ABTS stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium (Marc *et al.*, 2004).

II.6.3. Le test CUPRAC :

A) Principe :

Le Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), est une méthode de mesure du potentiel antioxydant, basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu₂⁺), [Nc₂ - Cu₂⁺], suite à une réaction d'oxydoréduction des antioxydants briseurs de chaîne avec le réactif CUPRAC, produisant un complexe chromogène de Cu(I)-néocuproïne (Nc) qui absorbe la lumière à 450 nm. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit et cette réaction est mesurée spectrophotométriquement à la longueur d'onde maximale d'absorption de la

lumière de 450 nm ; il s'agit donc d'une méthode basée sur le transfert d'électrons (özyürek et al., 2011 ; Apak et al., 2004).

B) Méthode de dosage en microplaques :

Le protocole utilisé dans ce test, est décrit par Apak et al., 2004. En bref, dans une plaque de 96 puits, 40 μL de chaque extrait de différente concentration (0-4 mg/ml) ont été ajoutés à 60 μL de tampon acétate d'ammonium (1M, PH=7), puis 50 μL de chacun de Néocupronine (7,5 mM) et de CuCl_2 (10 mM) ont été additionnés au mélange initial. L'absorbance est alors mesurée à 450 nm après 60 minutes (à température ambiante et à l'abri de lumière) à l'aide d'un lecteur de microplaque. Un blanc sans échantillon préparé parallèlement dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le solvant approprié. La mesure est faite comparativement à des antioxydants de référence : BHT et le BHA.

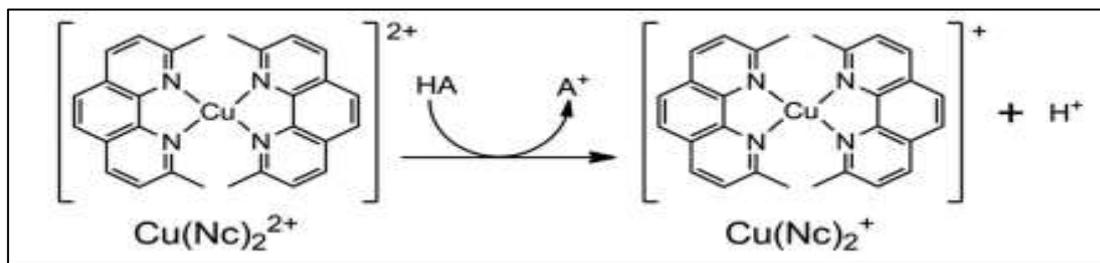


Figure 18 : Formation de $\text{Cu}(\text{Nc})^+$ à partir de $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ par antioxydant (özyürek et al., 2011)

II.6.4. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) :

A) Principe :

Les substances, qui possèdent un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe_3^+) pour former du ferrocyanure de potassium (Fe_2^+), qui lui-même réagit avec le chlorure ferrique pour donner un complexe ferreux de couleur bleu cyanée, qui présente un maximum d'absorption à 700 nm (Jayanthi et Lalitha, 2011).

B) Méthode de dosage en microplaques :

Le test FRAP a été effectué selon la méthode d'Oyaizu, 1986). 10 μl de diverses concentrations des extraits de plantes sont mélangées avec 40 μl du tampon phosphate (pH 6.6), 50 μl potassium ferricyanide (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 ml H_2O) est alors ajouté. Ce mélange a été maintenu à 50°C dans l'étuve pendant 20 minutes. Après refroidissement, 50 μl d'acide trichloracétique (TCA) à 10% (1 g de TCA dans 10 ml H_2O)

ont été ajoutés, 40 μl H_2O et 10 μl de chlorure ferrique fraîchement préparée à 0.1% (FeCl_3) (0,1 g de FeCl_3 dans 100 ml H_2O) ont été mélangée. L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

Le blanc a été préparé de manière similaire, à l'exclusion des échantillons. L'acide ascorbique à différentes concentrations Le α -tocophérol et le BHT ont été utilisé comme standard. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur.

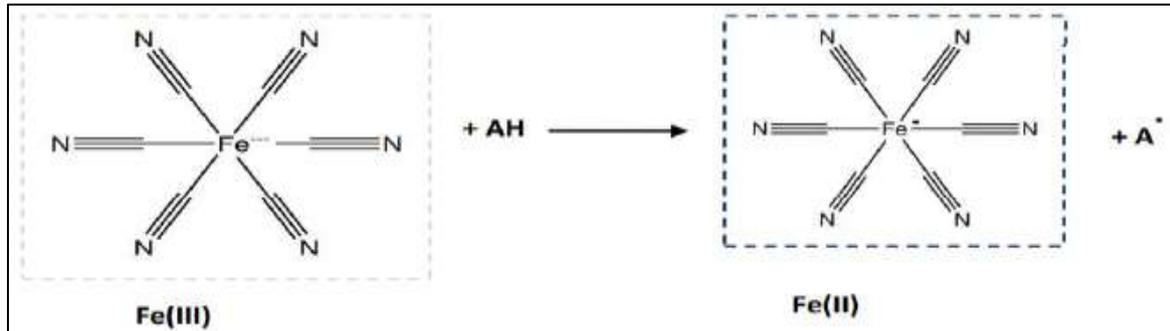


Figure19 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH) (Jayanthi et Lalitha, 2011).

II.6.5. Le test Phénanthroline :

A) Principe :

La méthode de la phénanthroline était basée sur la réduction de Fe_3^+ en ion Fe_2^+ par un antioxydant. L'ion Fe_2^+ formé réagissait ensuite avec la 1,10-phénanthroline pour former un complexe rouge-orange de tri-phénanthroline qui absorbe au maximum à 508-510 nm. (Yefrida et al., 2018).

B) Méthode de dosage en microplaques :

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de (Szydłowska-Czerniaka et al., 2008). Un volume 10 μl de différent concentration de chaque extrait est ajouté à 50 μl de chlorure ferrique FeCl_3 0.2% (0.02g de FeCl_3 dans 10ml de H_2O), 30 μl de phénanthroline 0.5% (0.05g de 1,10-Phénanthroline dans 10ml de MeOH) puis 110 μl de MeOH. Après une incubation à l'obscurité pendant 20 min à 30°C, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Un blanc sans échantillon préparé parallèlement dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le solvant. Le BHT et BHA sont utilisé comme standard.

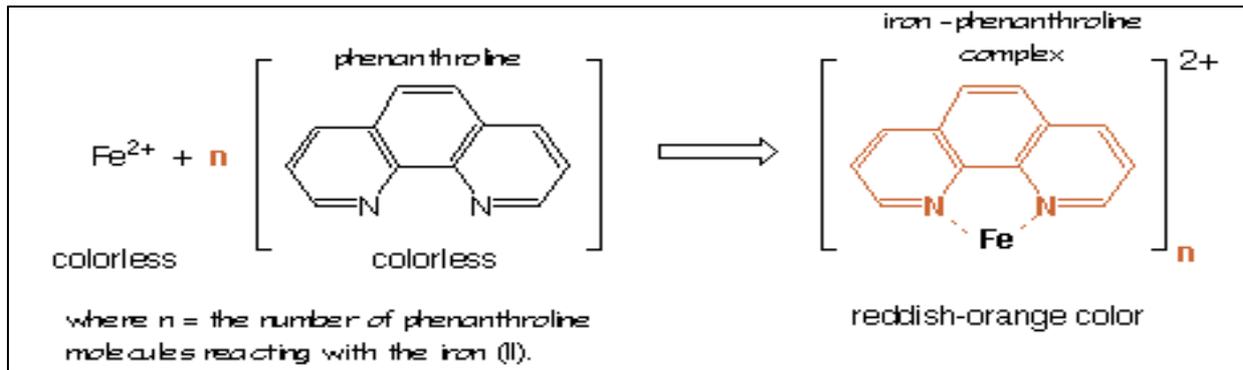


Figure 20 : Réaction de la 1,10-phénanthroline avec l'ion Fe^{2+} (complexe de Ferrand) (Kumar, 2017)

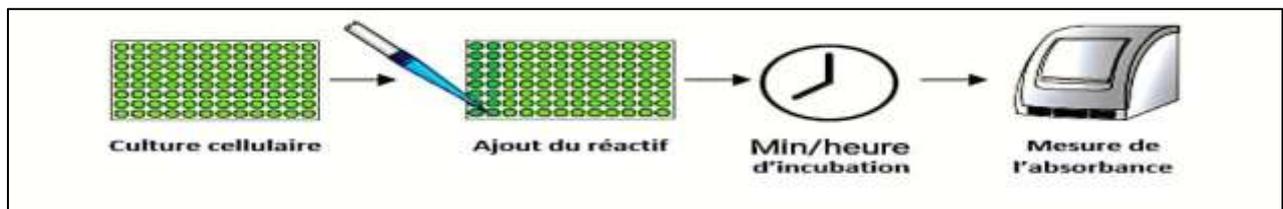


Figure 21 : Protocole général des tests antioxydants faite en CRBT (BIORENDER)

II.7. Etude de la toxicité

L'étude de toxicité orale aiguë a été réalisée selon l'OCDE directives et a consisté à tester l'extrait de aqueux (*Punica granatum* et *Cistus* sp).

L'essai a été réalisé sur 18 souris femelle ont été utilisées pour cette étude d'un poids variant entre 25 et 35g.

- **Le teste a dose 100 mg/kg** : regroupez 6 souris, dans le lot contient 3 (n= 3) souris pour chaque extrait.
- **Le teste a dose 200 mg/kg** : regroupez 12 souris de manière que dans chaque groupe contienne six animaux (n=6) pour chaque extrait.

Les souris gardent toute la nuit avec accès à l'eau, mais pas à la nourriture, après que les extraits de plantes ont été administrés par voie intra péritonéal à une dose de 100,200 mg/kg de poids corporel. Leur comportement a été observé (Observer les paramètres tels que la peau et la fourrure, les yeux, les muqueuses, les tremblements, les convulsions, la salivation, la diarrhée, la léthargie, le sommeil et le coma ainsi que les systèmes nerveux respiratoire,

circulatoire, autonome et central et l'activité somatomotrice et le comportement ainsi que le nombre de décès) sur une période de 24h.

Cinquante pour cent de la mortalité des animaux indique la concentration toxique de la substance.

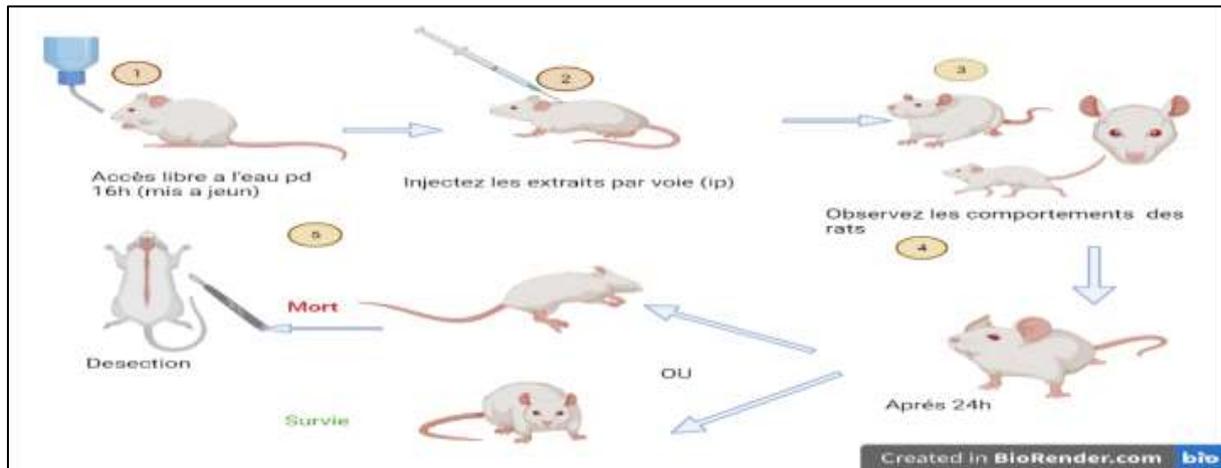


Figure 22 : Protocol d'étude de la toxicité.

II.8. Méthode de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo :

II.8.1. Evaluation de l'activité antipyrétique :

L'activité antipyrétique des deux extraits aqueux (L'écorce de *P. granatum* et *Cistus sp*) a été évaluée sur 30 souris albinos de sexe femelle, d'un poids variant entre 25 et 35g.

Les animaux d'étude étaient en bonne santé et acclimatés aux conditions de laboratoire avant l'expérimentation, ils étaient divisés en quatre groupes homogènes de six pour chaque. Ils étaient mis à jeun avec un accès libre à l'eau de boisson 24h avant de prélever la température initiale et l'induction de la fièvre. La température rectale (initiale) de chaque souris a été prélevée en utilisant un thermomètre digital juste avant l'induction de la pyrexie par injection de 20% d'une suspension aqueuse de levure de bière (*Sacchararomyces cerevisiae*) à raison de 10ml/kg en Sous-cutané (**Bhowmick et al., 2014**). 12h après l'induction, la température a été prélevée. La pyrexie a été confirmée par une augmentation de la température variant entre 0,3 °C et 0,5 °C.

Les souris dont l'augmentation de la température était inférieure à 0,3 °C étaient exclus pour l'étude (**Muhammad et al., 2012 ; Tijjani et al., 2012 ; Diallo and Diouf, 2000**).

L'administration des différents traitements a été effectuée de la manière suivante :

- **Lot témoin** : Les animaux de ce lot ont reçu par voie intra péritonéal la solution véhicule (eau distillée) à raison de 10 ml/kg de poids corporel.
- **Lot référence** : Les animaux de ce lot ont été traités par voie intra péritonéal avec un antipyrétique utilisé en thérapeutique (Diclofénac) à raison de 100 mg/kg de poids corporel.
- **Deux lots essais** : Les animaux reçoivent par voie intra péritonéal les extraits à tester à raison de 50,100mg/kg pc pour chaque groupe

A noter que ces traitements étaient administrés juste après avoir prélevé la température après induction de la pyrexie. Le pourcentage de réduction de la pyrexie a été calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{(T_p - T_n)}{(T_p - T_i)} \times 100$$

- **T_p** : température après induction de la pyrexie
- **T_n** : température après x temps
- **T_i** : température initiale.

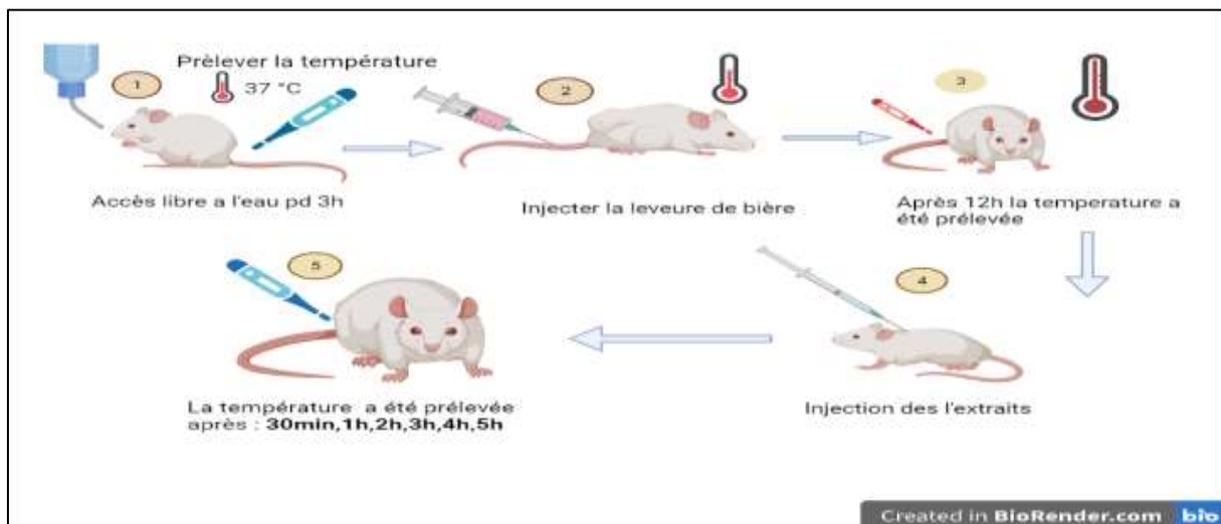


Figure 23 : Protocole de l'activité antipyrétique (BIORENDER).

II.8.2. Evaluation de l'activité analgésique :

Cette étude a été réalisée selon la méthode décrite par (Bhowmick *et al.*, 2014) avec quelques modifications. Elle consiste à induire une action algogène par l'administration à des souris de l'acide acétique (1 %), par voie intrapéritonéale (ip). Cette injection induit une sensation de douleur qui se manifeste chez les souris par un mouvement d'étirement des

pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales (Kang et al., 2008).

L'effet analgésique est apprécié par le dénombrement de ces crampes pendant 15 min après l'injection de l'agent algogène (Ochieng et al., 2013 ; Ouedraogo et al., 2012). 5 lots homogènes de trois souris ont été constitués. Ces souris sont de sexe femme et ont été mis à jeun 16 heures avant l'essai :

- **Lot témoin** : Les animaux de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique (1%) par voie intrapéritonéale.
- **Deux lot référence** : Les animaux de ces 2 lot ont été traités par voie intrapéritonéale avec des analgésiques utilisés en thérapeutique (Diclofénac et Aspigic) 30 minutes avant l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique. L'administration des analgésiques de référence se fait à raison de 75 mg/kg.
- **Lots essais** : Les animaux reçoivent, par voie orale l'extrait à tester (écorce de *P. granatum* et *Cistus sp*) à raison de 100 mg/kg de chaque un, et ceci 30 minutes avant l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique

Le pourcentage d'inhibition des crampes (PI) est calculé selon la formule suivante :

$$\% PI = \frac{(NCTe - NCTr)}{NCTe} \times 100$$

- **NCTe** : nombre moyen des contorsions dans le lot témoin
- **NCTr** : nombre moyen des contorsions dans le lot traité
- **Remarque** : Chaque carré représente 5 crampes 

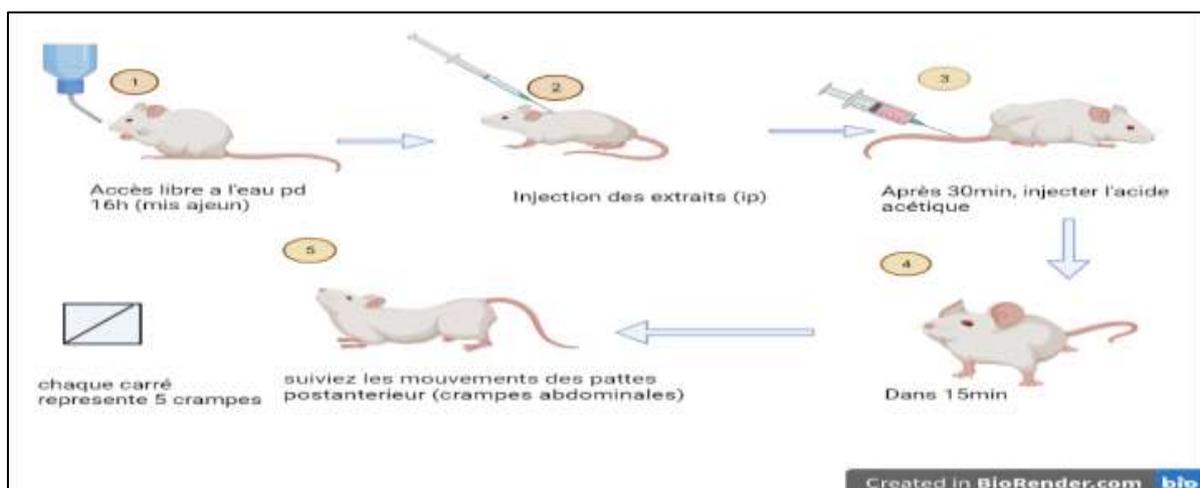


Figure 24 : Protocol de l'activité analgésique (BIORENDER)

II.9. Induction de l'œdème inflammatoire aiguë de la patte de rat par le formol chez des rats diabétique et non diabétique :

Le but de ce teste était de déterminer l'activité anti-inflammatoire des Extraits aqueux des plantes *Cistus sp* et l'écorce de *P. granatum L* sur l'œdème inflammatoire aigue sur la patte des rats normaux (non diabétiques) et des rats diabétiques induit par le Formol à 1% selon la méthode de (Rahmani et al., 2016).

A) Induction du diabète

Pour l'induction du DT1, après une mise à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas de l'eau), le diabète a été induit chez les rats par injection intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée de STZ (Sigma ST Louis, Mo) à une dose de 65 mg/kg de poids corporel soit un volume de 2 ml/kg (qui détruit les cellule β). La streptozotocine est dissoute dans un tampon citrate de sodium 0,1M pH 4,5. La destruction induite par la STZ des cellules bêta pancréatiques est communément acceptée comme modèle de DT1, a été décrite par d'autres groupes (Furman, 2015 ; Wu et J, 2015).

Après injection, les bouteilles d'eau ont été remplacées par des bouteilles contenant une solution de glucose 5% pendant la nuit afin de surmonté l'hypoglycémie induite par la STZ suite à la destruction des cellules β pancréatiques et la libération massive d'insuline. Cette hypoglycémie peut être fatale pour les rats.

Après 48 heures de l'injection (temps de développement du diabète), le diabète a été confirmé chez les rats à STZ par mesure de la glycémie à jeun à l'aide d'un glucomètre de type Acut Chek. Seuls les rats ayant le taux de glucose sanguin supérieur à 3g/l ont été considérés comme diabétiques de types 1et retenus pour cette expérimentation. (Ramalho et al., 2018 ; Filgueiras et al., 2015).

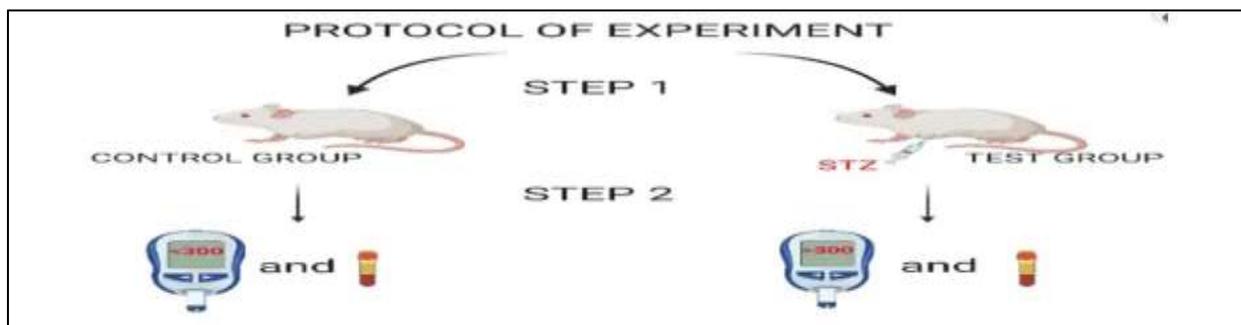


Figure 25 : Protocole d'induction du diabète type1(BIORENDER)

L'inflammation est induite par injection de formol d'une solution 0,1ml au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du rat et l'œdème causé par cet agent photogène sera traduit en volume et mesuré ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire (Rahmani et al., 2016).

B) Traitement des animaux :

Les rats répartis en 6 lots ont été pesés puis mis à jeun 12 heures avant l'expérimentation. Pour chaque rat, le volume initial (V_0) de la patte postérieure droite a été mesuré avant les traitements. Les différents traitements ont été administrés par voie intra-péritonéale

- **Lot témoin non diabétique :** Les rats de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) par voie intra-péritonéale (IP), 30 mn avant l'injection de formol à 1% dans la voûte plantaire de la patte du rat.
- **Lot témoin diabétique :** Les rats ayant le taux de glucose sanguin supérieur à 3 g/l de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) par voie intra-péritonéale (IP), 30 mn avant l'injection de formol à 1% dans la voûte plantaire de la patte du rat
- **Lot référence non diabétique :** Les rats de ce lot ont été traités par voie (IP) avec un anti-inflammatoire utilisé (Diclofénac 10 mg /kg), 30 mn avant l'injection de la formole.
- **Lot référence diabétique :** Les rats ayant le taux de glucose sanguin supérieur à 3 g/l de ce lot ont été traités par voie (IP) avec un anti-inflammatoire utilisé (Diclofénac 10 mg /kg), 30 mn avant l'injection de la formole.
- **Lot essai non diabétique :** L'extrait *Cistus* et de *P. granatum* à tester est administré aux rats par voie (IP) à raison de 100mg/kg, 30 mn avant l'injection de formol.
- **Lot essai non diabétique :** L'extrait *Cistus Sp* et de *P.granatum* à tester est administré aux rats ayant le taux de glucose sanguin supérieur à 3 g/l par voie (IP) à raison de 100mg/kg, 30 mn avant l'injection de formol.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème selon la formule :

$$\% INH = \frac{(V_t - V_0)_{\text{témoin}} - (V_t - V_0)_{\text{traité}}}{(V_t - V_0)_{\text{témoin}}} \times 100$$

- V_0 : représente le volume de la patte à $t=0$ (avant injection du formol)
- V_t : représente le volume de la patte à un temps t quelconque.

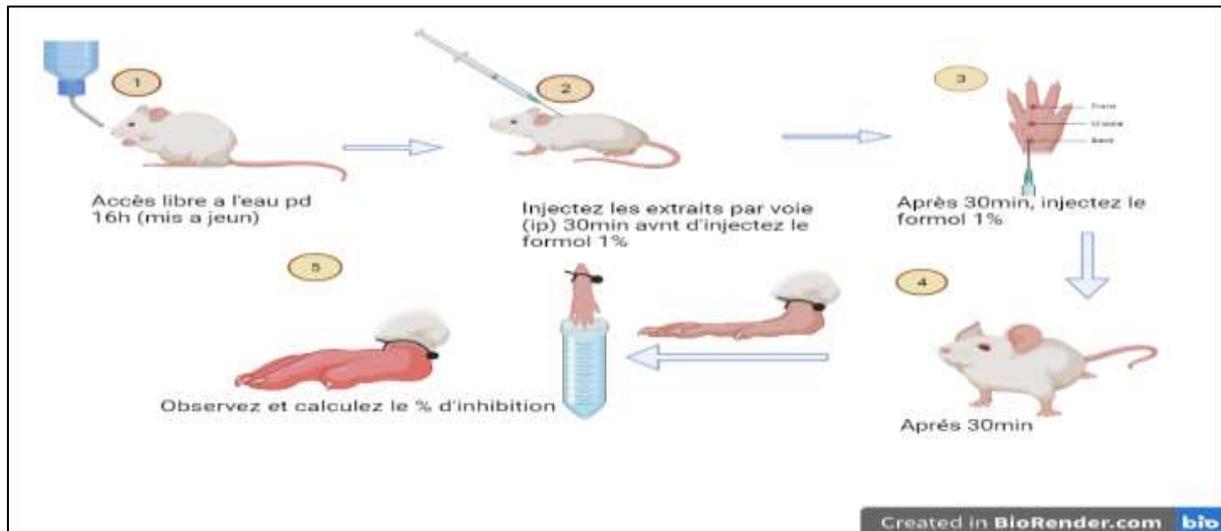


Figure 26 : Induction de l'œdème inflammatoire aigue de la patte de rat par le formol(BIORENDER).

II.10. Détermination de l'activité cicatrisante :

L'effet cicatrisant de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade sur des plaies expérimentales est déterminé selon (Sagliyan *et al*, 2010). Au début de l'expérience, Trois lots de 5 souris chacun placé dans des cages individuelles ont été respectivement traités.

L'extrait a été préparé dans la vaseline à une concentration de 5% (w/w). Le Mycocide® (0,25%, W/W) est utilisé comme standard. Les souris ont été anesthésiées par le chloroforme. Des plaies circulaires de 1 à 1,5cm ont été réalisées au niveau du corps des souris et désinfectées avant l'application de la pommade. Les animaux sont traités une fois par jour avec une quantité précise de la pommade (environ 0,2 g). Le groupe témoin ne reçoit que de la vaseline. Les mesures des plaies ont été faites tous les trois jours jusqu'à la guérison complète (15 jours). L'aspect, la couleur et l'odeur des plaies ont été surveillés pendant toute la durée du traitement. Le pourcentage de diminution ou rétrécissement des plaies est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de diminution} = \frac{(\text{surface de la plaie } M J_1 - \text{surface de la plaie } M J_n)}{\text{surface de la plaie } M J_1} \times 100$$

- **M J₁** : Mesure au premier jour
- **M J_n** : Mesure au n ème jour

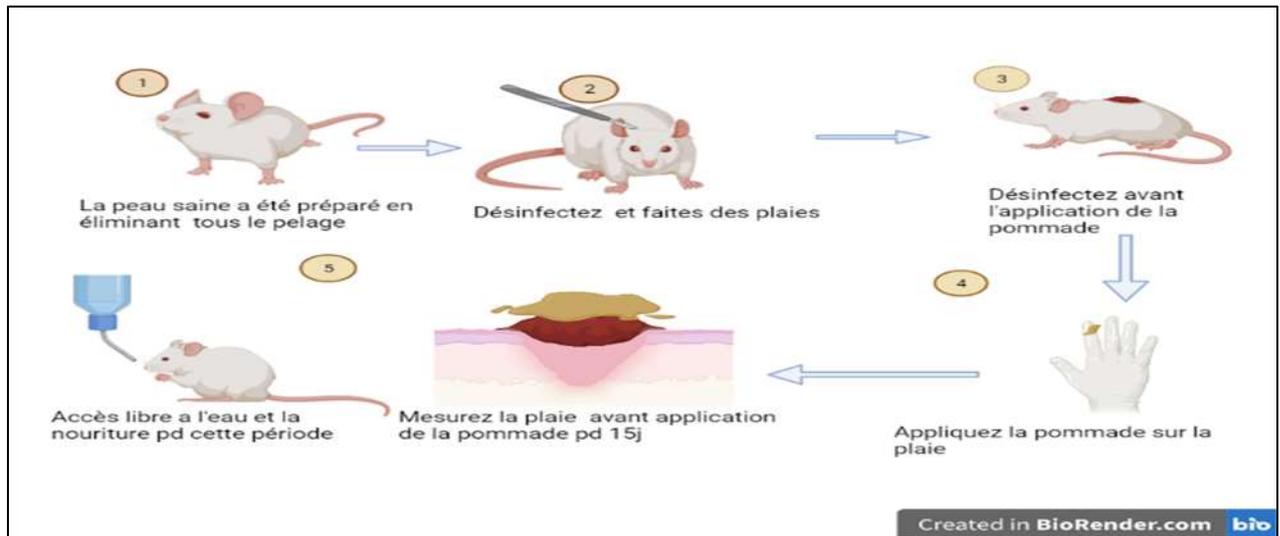


Figure 27 : Protocole de l'activité cicatrisante (**BIORENDER**)

II.11.Evaluation statistique :

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2019. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [%inhibition = f (concentrations)].

Remarque : toutes les figures avec une référence (**BIORENDER**) sont dessinées par un logiciel.

Résultats et discussion

I. Rendement de l'extraction :

L'extraction des plantes (*l'écorce de Punica granatum et de Cistus sp*) par l'eau distillée à chaud a permis d'obtenir des extraits de différentes couleurs, qui ont été conservés au frais dans des flacons ombrés jusqu'à leur utilisation.

Les résultats des rendements et caractéristiques des extraits aqueux des deux plantes sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Rendement et caractéristiques des extraits aqueux des plantes :

Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Aspect	Couleur	Le poids des extraits poudre en (g)	Le rendement en (%)
50	Ext AQ GRE	Poudre	Jaune	12,4 g	24,8%±0,02
	Ext AQ CYS	Poudre	Vert foncé	8,4 g	16,8±0,28

L'extraction des feuilles et des tiges du matériel végétal utilisé par l'eau distillée a donné un rendement de 16,8% pour *Cistus sp* et de 24,8 % pour l'écorce de *P.granatum* comme illustré dans le tableau, Cette différence entre les rendements montre que la composition chimique diffère d'un extrait à l'autre.

D'après les résultats obtenus dans cette étude, le rendement d'extraction de l'écorce de *P. granatum* est de 24.8% moins que l'extrait aqueux de **Kota et al., 2018** qui a donné un rendement de 26%. D'autre part, un rendement de 16,6% pour l'extraction du *Cistus sp*, ce résultat est plus élevé que celui trouvé par **(Trabsa, 2019)** qui ont utilisé le même protocole d'extraction de *Cistus salvifolius* avec un rendement de 6,40%, et proche de celui de **(Laid., 2016)** de la même plante qui ont eu un rendement de 16,6%. Cette différence des résultats a été remarquée en comparant nos résultats avec ceux d'autres auteurs ayant travaillé sur la même partie de la plante et est traduite par l'influence significative de l'espèce sur le rendement d'extraction même si les plantes sont du même genre ou famille. Aussi, elle est due à la richesse de chaque plante en molécules hydrosolubles, en outre, elle peut être également due à d'autres facteurs tels que la durée de séchage, la granulométrie du broyat, la température et la durée d'extraction **(Yaya et Sorho, 2017 ; Bourgou, 2016)**.

II. Caractérisation quantitative des extraits de plantes :

II.1. Teneur des extraits en polyphénols :

Le dosage des polyphénols dans l'extrait aqueux a été effectué par le réactif de Folin Ciocalteu en se référant à l'acide gallique. La concentration des polyphénols dans nos différents Ext aq de *Cistus sp* et de *P. granatum* a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage $y = 0,0035x - 0,0387$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9909$ et exprimée en milligramme d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait).

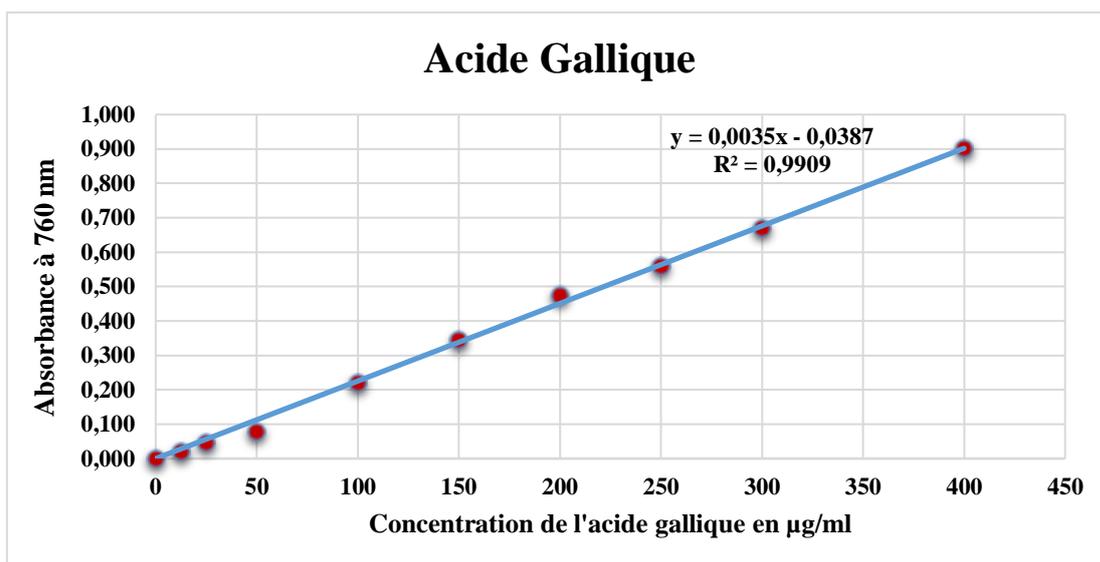


Figure 29 : Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique ((Moyenne \pm SD de trois essais)

Une deuxième gamme étalon est établie avec l'acide tannique pour évaluer la teneur des polyphénols. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait (mg EAG / g d'extrait) ($y = 0,0027x - 0,0187$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9969$).

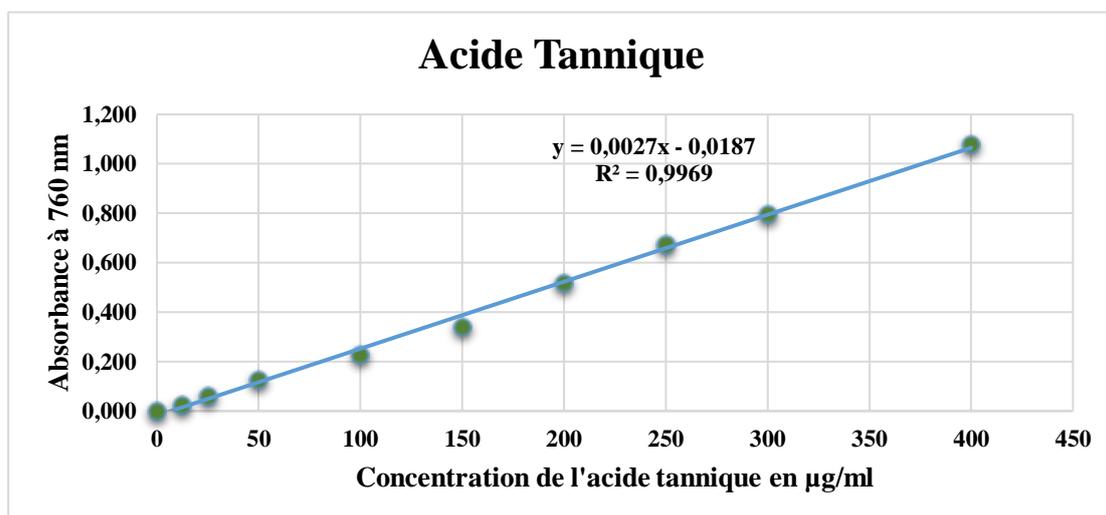


Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'Acide Tannique ((Moyenne \pm SD de trois essais)

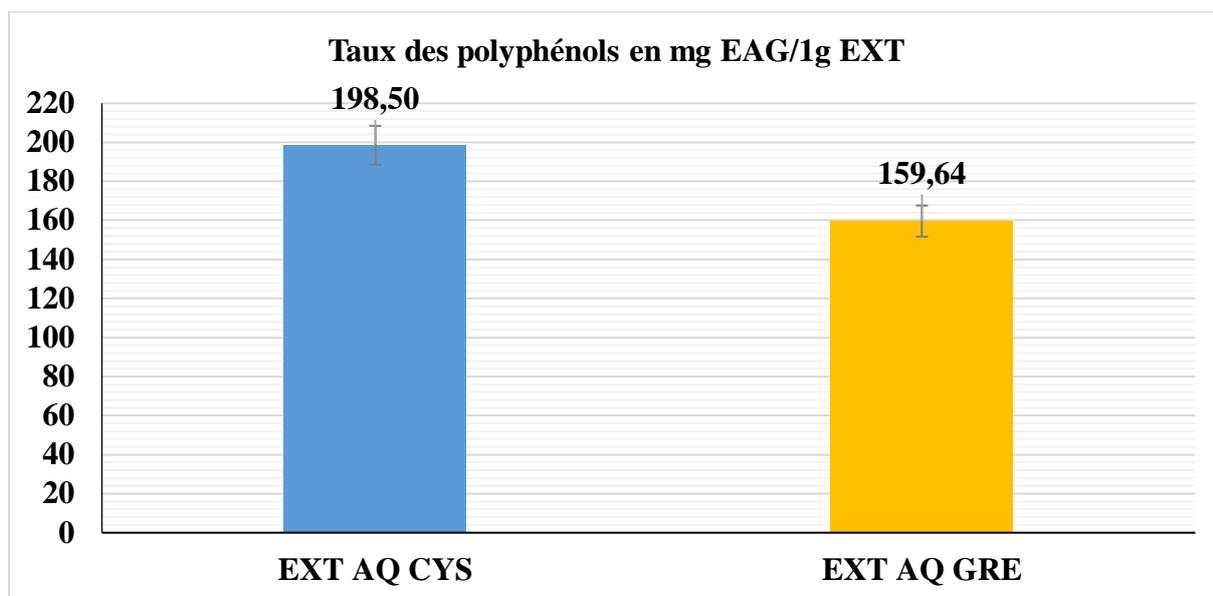


Figure 31 : Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits exprimés en équivalent d'acide gallique.

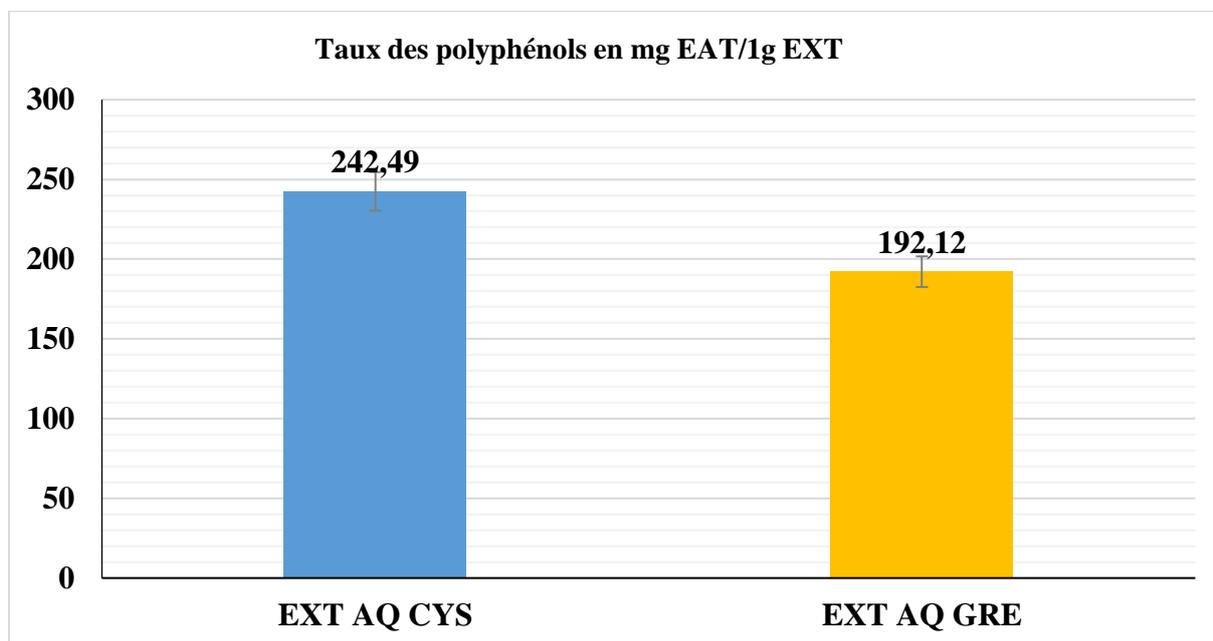


Figure 32 : Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits exprimés en équivalent d'acide Tannique.

D'après les résultats qu'on a obtenus et illustrés dans la figure 32, on peut dire que les Ext aq de la plante *Cistus sp* étudiés ont montré un contenu phénolique significatif (taux de polyphénols élevés) contrairement aux polyphénols des Ext aq de l'écorce *P. granatum* qui ont montré un taux de polyphénols inférieur à celui de *Cistus sp*.

Nous avons constaté que les résultats de teneurs en polyphénols totaux de l'extrait aqueux de *Cistus sp* obtenus par (MOUALEK, 2018) (207.84 ± 15.03 mg EAG/1g Ext), sont plus élevés que ceux qu'on a obtenus (198.50 ± 12.13 mg EAG/1g Ext).

Concernant l'extrait aqueux de *P. granatum* les résultats (159.64 ± 1.19 mg EAG/1g Ext) sont significativement plus élevés que ceux trouvés par (Douaouri et Djebli, 2018) avec (92.61 ± 0.38 mg EAG/1gExt) de l'extrait aqueux de *P. granatum*.

Cette différence pourrait s'expliquer par un contenu polyphénolique des aliments qui est fortement influencé par des facteurs édaphiques environnementaux tels que le type de sol, l'exposition au soleil et les précipitations, la période de récolte, la température et le temps d'extraction qui peut agir sur la libération du contenu végétal dans le milieu, Un autre facteur qui affecte directement la teneur en polyphénols des aliments est le stockage. Les aliments stockés présentent un changement dans le contenu polyphénolique en raison de l'oxydation facile de leurs polyphénols (Rajbhar et al., 2015).

II.2. Teneur des extraits en flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) La quercétine a été utilisée comme étalon et l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 415 nm (Bahorum et al, 1996). Les résultats obtenus sont représentés dans un courbe d'étalonnage (figure33), ayant l'équation : $y=0,0219x+0,0008$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0,9924$, comme indiqué ci-dessous :

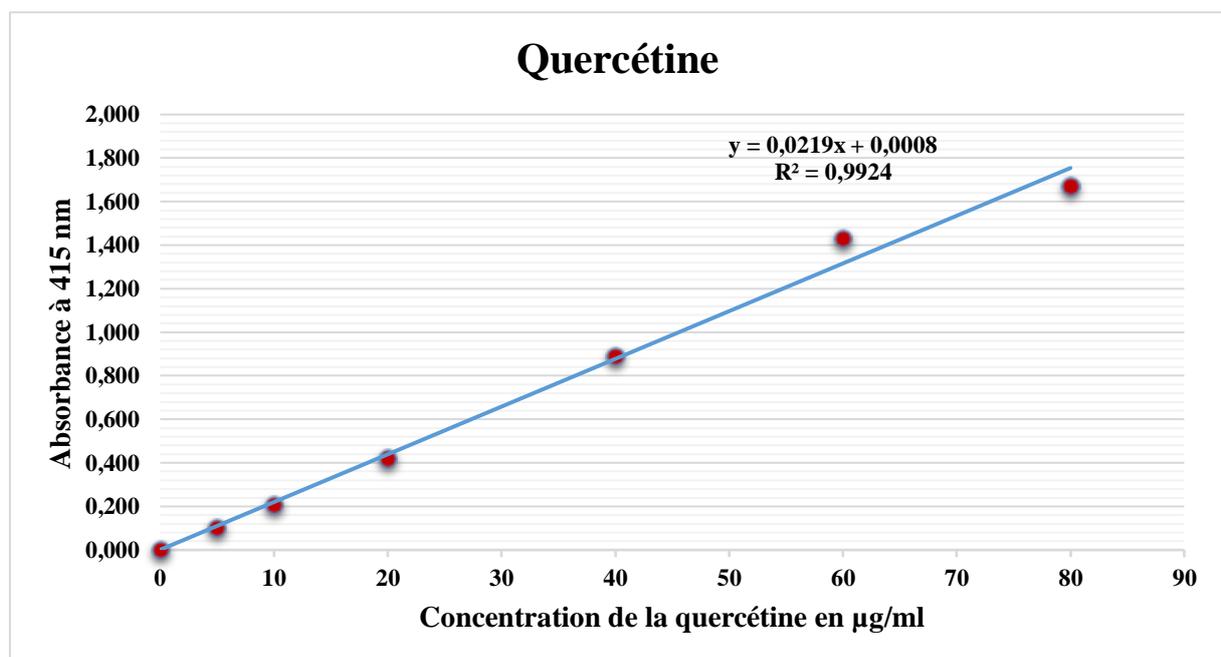


Figure 33 : Droite d'étalonnage de la quercétine (Moyenne \pm SD de trois essais)

D'après les résultats obtenus et représentés par la figure 34, on peut constater que les deux plantes étudiées sont riches en flavonoïdes mais avec des quantités variables.

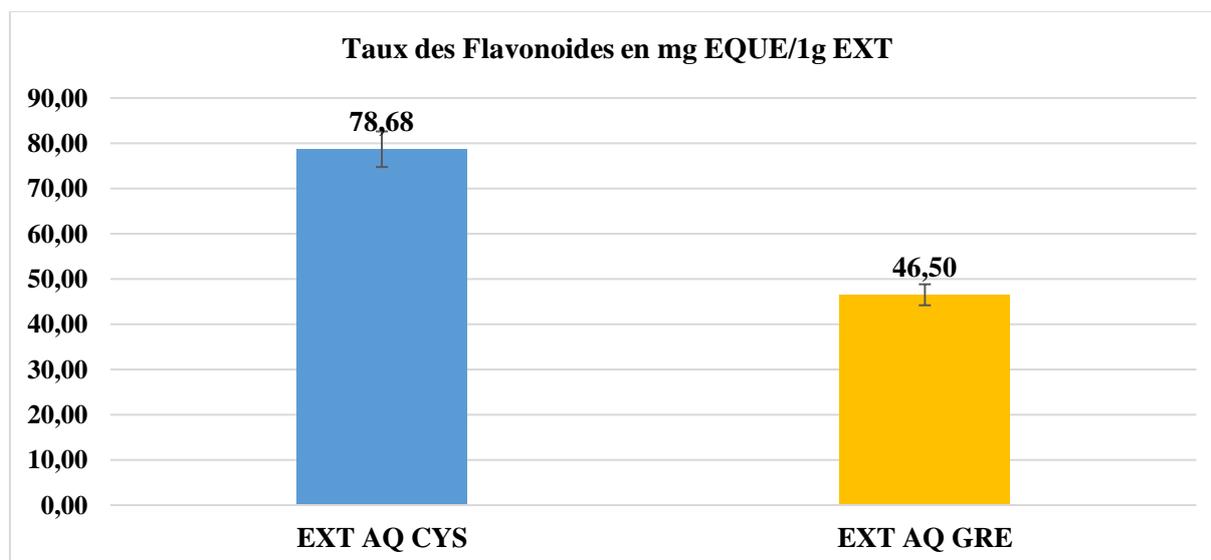


Figure 34 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits aqueux exprimées en équivalent de quercétine

La figure 34 Montre que l'extrait aqueux de *Cistus Sp* contient plus de flavonoïdes ($78,68 \pm 0,19$ mg EQUÉ/g EXT) comparément à l'extrait de *P. granatum* ($46,50 \pm 0,66$ mg EQUÉ/g EXT). Ces résultats sont en corrélation avec ceux des polyphénols.

Dans notre étude, les résultats de Ext aq de *P. granatum* sont supérieurs à ceux enregistrés par Douaouri et Djebli (2018) pour les deux extrait aqueux et méthanoliques de la même plante (21.68 mg EQUÉ/1g et 31.35 mg EQUÉ/1g respectivement).

Par contre, la teneur en flavonoïdes pour Ext aq de *Cistus Sp* est en accord avec celle publiée par El Euch et Bouajila (2015) qui ont enregistré un taux de 76.21 mg EQUÉ/1g pour l'extrait méthanolique du bouton de fleurs du *Cistus salviifolius*, Ceci confirme la richesse de la plante étudiée en flavonoïdes. On a également constaté que notre extrait présente une teneur en flavonoïdes légèrement supérieure à celle trouvée dans l'extrait méthanolique des feuilles de la même plante (65.58 mg EQUÉ/1g contre 78,68mg EQUÉ/1g).

Diverses études récentes ont montré que de nombreux flavonoïdes contribuaient de manière significative aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires de nombreuses plantes (Gunathilake et al., 2018).

On pourrait expliquer ces différences dans les teneurs en flavonoïdes totaux par divers facteurs, parmi lesquels on peut citer : les différents cultivars, les zones géographiques de la

matière végétale brute, les facteurs environnementaux, par exemple les nutriments et les minéraux dans le sol et la polarité du solvant utilisé ont également un effet sur la qualité et la quantité des composés phytochimiques dans certaines espèces de plantes médicinales (Tungmannithum et al., 2018).

III. Activité antioxydant *in vitro* :

Les trois types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydant de nos extraits de plantes sont : le radical DPPH, le radical ABTS^{•+}, Le test CUPRAC, le Test FRAP et Le test Phénanthroline.

III.1. Le test de piégeage du radical DPPH :

Le DPPH est un radical libre stable qui réagit avec des composés capables de donner un atome d'hydrogène, ainsi, ce test est basé sur le piégeage du DPPH par l'ajout d'une espèce radicalaire ou d'un antioxydant capable de décolorer la solution de DPPH du violet profond.

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à un substrat capable de donner un atome d'hydrogène, cela conduit à la forme réduite avec perte de la couleur violette, le degré de décoloration est proportionnel à la concentration de molécules de type antioxydant. L'activité est mesurée par spectrophotométrie. Une faible absorbance indique une forte activité de piégeage des radicaux libres du composé étudié (Ammor et al., 2021).

La capacité anti-radicalaire libres des Ext aq *cistus* et *P. granatum* a été testée par la méthode DPPH en utilisant Les antioxydants suivants : l'hydroxyanisolebutylé (BHA), le Trolox et l'acide ascorbique comme des molécules de références.

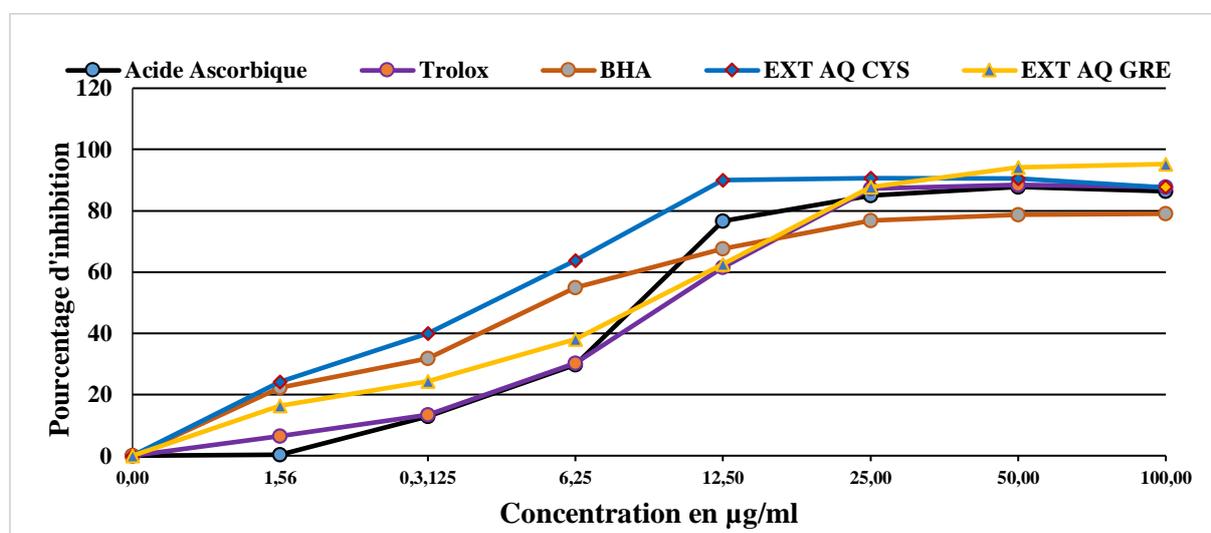


Figure 35 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH* des antioxydants de références et des extraits aqueux testés (Moyenne ± SD de trois essais)

Les résultats obtenus dans notre étude (La figure 35) ont montré que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards ou pour les deux extraits des plantes étudiées.

Nous avons noté que le pourcentage d'inhibition de l'extrait de *P. granatum* est supérieur aux pourcentages d'inhibition des standards utilisés dans l'analyse pour la concentration de 100µg/ml par un pourcentage de 95,26±0.80%, les standards ont révélé les pourcentages d'inhibition de DPPH suivants : pour l'acide ascorbique 86,36±0,21%, pour le BHA 79,01±0,89%, et pour le Trolox 87,72±0,47%.

Concernant l'extrait aqueux de *cistus*, pour une concentration de 50 µg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 90,58±1,16% qui est légèrement élevé par rapport aux pourcentages remarquables pour les standards : acide ascorbique, Trolox et BHA dans la même concentration par (87,78±0.49%, 88.46±0.11% et 78,67±1.31% respectivement). Ces pourcentages correspondent à une inhibition du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ (µg / ml), ce qui signifie que la concentration nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de la DPPH à partir des équations des régressions linéaires des graphes, Plus la valeur CI₅₀ est faible, plus le composé est antioxydant. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Le pouvoir antioxydant (exprimé par IC₅₀ (en µg / ml)) des antioxydants de références et des extraits testés

	IC ₅₀ ±Ecart type (En µg /ml)
Acide ascorbique	04,390 ± 0,010
Trolox	05,120 ± 0,210
BHA	05,730 ± 0,410
Ext AQ CYS	05,636 ± 0,136
Ext AQ GRE	11,630 ± 0,143

En se basant sur les valeurs affichées dans le tableau 5, des CI₅₀ du test DPPH pour les Ext aq des *cistus* et *P. granatum* on constate que l'extrait de *cistus* a une CI₅₀ (05,636 ± 0,136µg/ml) légèrement supérieur à celui des standards : Acide ascorbique et Trolox de 04,390±0,010µg /ml et 05,120±0,210µg /ml respectivement, et très proche pour CI₅₀ de BHA par 05,730±0,410µg /ml. Ces résultats viennent donc confirmer les travaux de Rebaya et ses collaborateurs (2016) qui ont noté une CI₅₀ pour l'extrait aqueux de la même plante de 2,18±0.011µg/ml. Dans une autre étude On note que l'activité antioxydante de notre extrait

été très proche Par rapport à la valeur enregistrée par Sayah et ses collaborateurs (2017) d'IC₅₀ par 4.10±0.85µg /ml pour l'extrait aqueux de *Cistus salviifolius* et un résultat similaire (5.11±0.17µg/ml) pour l'extrait aqueux de *Cistus monspeliensis*. Qui confirme l'excellente capacité de neutralisation du radical libre DPPH de cet extrait.

D'autre part, On a remarqué que, pour l'extrait aqueux de *P. granatum* la concentration d'inhibition de 50% de la DPPH est supérieure à celle des molécules de référence utilisées et l'extrait aqueux de *cistus* par une valeur de 11,630±0,143µg/ml, Ce résultat est en accord avec celui publié par Laosirisathian et ses collaborateurs (2020) qui ont montré que l'extrait qui a été préparé à l'aide d'éthanol à 60 % v/v, possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH avec une IC₅₀ de 10.97 ± 0.97µg/ml, Cela signifie une très forte activité antioxydante pour les deux extraits des deux plantes étudiées.

En revanche notre résultat de cette activité est de deux fois plus fort que celui des El-Hamamsy et El-khamissi (2020) qui ont montré que l'extrait d'eau chaude présentait une activité antioxydante avec une valeur CI₅₀ de 23,5µg/ml.

L'activité de piégeage de la DPPH a montré une tendance similaire avec la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux, indiquant que les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes présents dans *cistus* et *P. granatum* sont les principaux constituants qui peuvent piéger le radical DPPH, en raison de la présence des groupes hydroxyles dans leur structure et de leur capacité de don d'électrons (Ammor et al., 2021 ; Sayah et al., 2017).

III.2. Le test de piégeage du radical ABTS^{•+} :

L'ABTS ou acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique est un composé organique stable utilisé dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire. ABTS^{•+} réagit avec l'antioxydant et passe de la couleur bleu-vert à un état incolore (Re et al., 1999). Cette transformation est suivie par la mesure de l'absorbance à 734 nm et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards BHA, BHT qui sont illustrés dans la figure 36 ci-dessous :

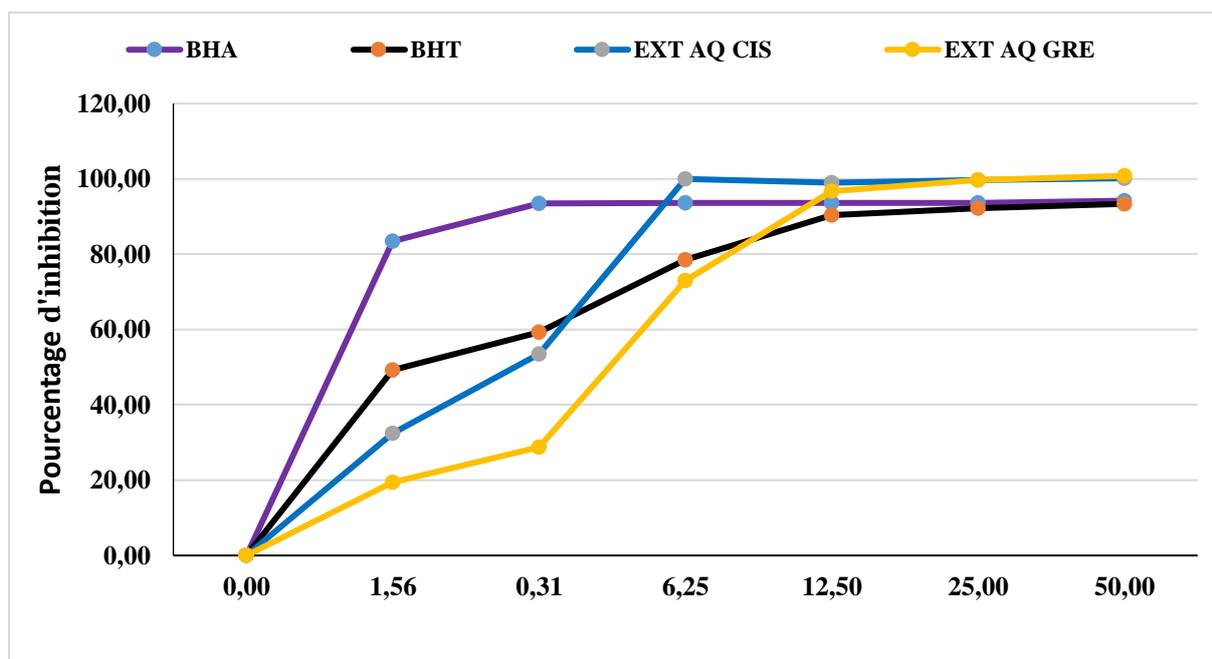


Figure 36 : Pourcentages d’inhibition du radical ABTS* des antioxydants de références et des extraits testés (Moyenne ± SD de trois essais).

D’après la figure 36 on a constaté, pour une concentration de 50 µg/ml, les Pourcentages d’inhibition du radical ABTS des deux standards est de $94,20 \pm 0,9\%$ pour BHA et $93,37 \pm 0,9\%$ pour BHT, alors que pour les deux extraits nous avons remarqué que les pourcentages d’inhibition sont supérieurs aux pourcentages d’inhibition des standards utilisés dans l’analyse par $100,15 \pm 0,45\%$ pour Ext aq de *cistus* et $100,80 \pm 0,23\%$ pour Ext aq de *P. granatum* dans la même concentration.

Les résultats sont exprimés en termes d’IC₅₀ représentant la concentration nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical ABTS + de 50% et la plus petite valeur d’IC₅₀ correspond à la plus grande activité anti radicalaire.

Tableau 6 : le pouvoir antioxydant (exprimé par IC₅₀ (en µg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés

	IC ₅₀ ±Ecart type (En µg /ml)
α-Tocopherol	NT
BHA	$1,03 \pm 0,00$
BHT	$1,59 \pm 0,03$
Ext AQ CYS	$2,96 \pm 0,00$
Ext AQ GRE	$5,51 \pm 0,12$

En fonction des valeurs présentées dans le tableau 6 L’IC₅₀ de BHA est très important à une valeur de $1,03 \pm 0,00\mu\text{g/ml}$, suivie par le BHT à $1,59 \pm 0,03\mu\text{g/ml}$. Concernant nos extraits, on remarque que la plante *cistus* enregistre la plus faible valeur d’IC₅₀ de $(2,96 \pm$

0,00 $\mu\text{g/ml}$), suivie par *P. granatum* ($5,51 \pm 0,12\mu\text{g/ml}$). Ces valeurs sont légèrement supérieures au IC_{50} des standards BHT et BHA et correspondent à une meilleure efficacité de l'extrait *cistus* comparé à l'extrait de *P. granatum* dans la neutralisation du radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$.

Ces résultats concordent avec ceux de Rebaya et ses collaborateurs (2016) sur l'activité antioxydant de l'extrait de *Cistus salviifolius*, révèlent une valeur basse (IC_{50} de $2,73\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour un extrait n-butanol par rapport à l'extrait aqueux (IC_{50} de $8,77\mu\text{g.mL}^{-1}$), Ces résultats sont très proches des valeurs que nous avons obtenues au cours de notre étude.

Concernant l'extrait de *P. granatum*, Masci et ses collaborateurs (2016) confirment nos résultats par une CI_{50} de $5.490 \mu\text{g/ml}$ d'un extrait aqueux, et pour l'éthanolique ils ont obtenu une CI de $5.013 \mu\text{g/ml}$, ainsi que les autres valeurs qui sont presque similaires aux valeurs qu'on a constatées, une autre étude fait par Laosirisathian et ses collaborateurs (2020) a montré un résultat proche pour un extrait de l'éthanol à 60 % v/v par une CI_{50} de $6.48 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$, ceci correspond à une grande activité anti radicalaire.

Il est à noter que les deux extraits étudiés ont une activité antioxydante importante et qu'ils peuvent piéger le radical ABTS, on observe aussi une corrélation entre les valeurs DPPH et ABTS et les compositions phénoliques, Ces corrélations montrent que les flavonoïdes faisaient partie des microconstituants contribuant aux activités antioxydants. Par ailleurs, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et de la nature des antioxydants (Hmid et al., 2017).

III.3. Le test CUPRAC :

L'activité réductrice a été étudiée par une méthode impliquant un réactif beaucoup plus stable et facilement accessible (le complexe $[\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}]$) que les réactifs radicalaires chromogènes ABTS et DPPH. En mesurant la capacité de réduction cuprique d'un échantillon à 450 nm, ce test peut indirectement mais efficacement refléter le pouvoir antioxydant total de l'échantillon même si aucune espèce radicalaire n'est impliquée dans le test (Apak et al., 2013). Les résultats obtenus du test CUPRAC sont reportés dans la (Figure37).

La lecture des courbes des cinétiques de réduction de Cu^{+2} en Cu^{+1} , montre que les extraits des écorces de *P. granatum*, *Cistus sp* et les standards chimiques (BHT et le BHA) possèdent un pouvoir réducteur de Cu^{+2} en Cu^{+} cet effet est proportionnel aux doses utilisées, avec le potentiel antioxydant de BHA et BHT est significativement supérieur par rapport à celui de l'extrait de *Cistus sp*, et de *P. granatum*.

L'extrait de *Cistus sp* se distingue de l'extrait de *P. granatum* et de standards BHT chimiques par son effet réducteur significativement supérieur à la concentration 400µg/ml vis-à-vis du radical CUPRAC, par contre l'extrait de *P. granatum* se distingue par son effet supérieur à la concentration 800µg/ml sur le même standard (BHT).

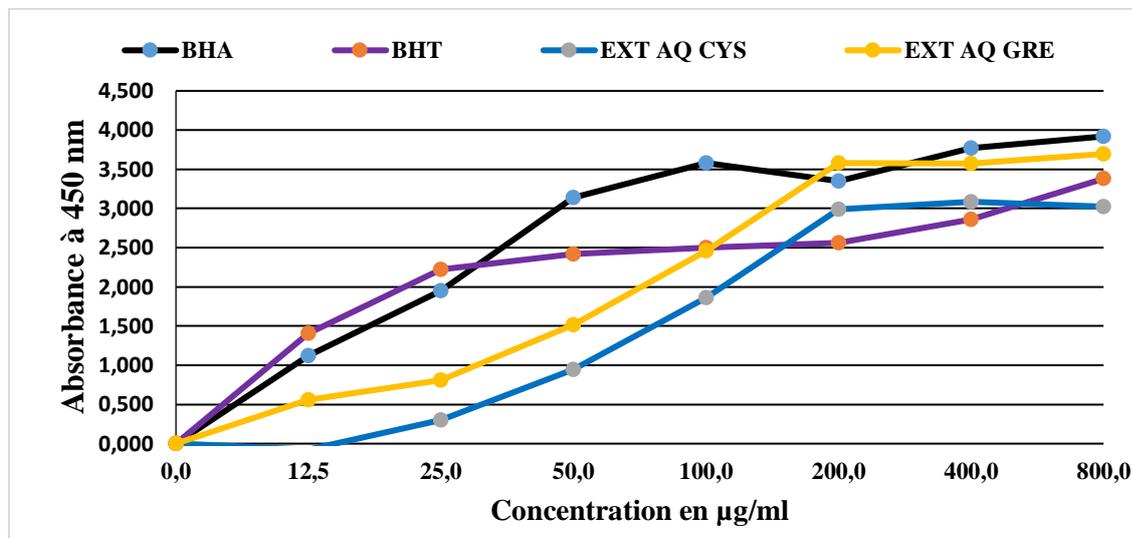


Figure 37 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode CUPRAC (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Test CUPRAC a été donné en $A_{0.50}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) qui correspond à la concentration fournissant une absorbance de 0.50 de BHT. BHA et les Ext aq étudiés

Tableau 7 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu\text{g} / \text{ml}$)) des antioxydants de références et des extraits testés

	$A_{0,5} \pm \text{Ecart type (En } \mu\text{g} / \text{ml)}$
BHA	$3,64 \pm 0,19$
BHT	$9,62 \pm 0,87$
Ext AQ CYS	$24,63 \pm 0,41$
Ext AQ GRE	$13,56 \pm 0,66$

Il ressort de ces résultats, que l'extrait de *P. granatum* soit l'échantillon le plus actif avec une $A_{0,5}$ ($D_0 = 13,56 \pm 0,66 \mu\text{g} / \text{ml}$) et celle-ci est la plus proche de celle du BHT, suivie par l'extrait du *Cistus sp* avec une $A_{0,5}$ égale à $D_0 = 24,63 \pm 0,41 \mu\text{g} / \text{ml}$.

En partant de ces résultats, on peut déduire que les variations de la capacité antioxydante des différents échantillons testés comparativement à celles des témoins (BHA et BHT) pourrait être principalement due à la présence et à la teneur de composés phénoliques ou au pouvoir antioxydant élevé peut être attribué à la présence des flavonoïdes, tels que les flavan-3-ols (catéchine et epigallocatechine) et les flavonols (isorhamnitine, kaempferol,

quercétine). La puissance antioxydante des flavonoïdes est approximativement proportionnelle et positivement affecté par la présence d'une fraction orto-dihydroxy dans le cycle B (Re et al., 1999).

Les faibles activités pourraient être liées à la présence d'autres composés (par exemple les sucres, les acides aminés), qui pourraient d'une manière ou d'une autre interférer dans l'activité totale de l'extrait (Da Silva et al., 2008).

III.4. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) :

La capacité réductrice des échantillons a été également étudiée à partir de la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette méthode est souvent utilisée comme un indicateur de l'activité donneuse d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique et peut être fortement corrélée avec d'autres propriétés antioxydantes (Dorman et al., 2003). Les résultats obtenus du test FRAP sont reportés dans la (Figure 38).

La figure 38 montre que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} varie proportionnellement avec la variation de la concentration en extrait donc le pouvoir réducteur est proportionnel avec la valeur de l'absorbance, c'est-à-dire une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé.

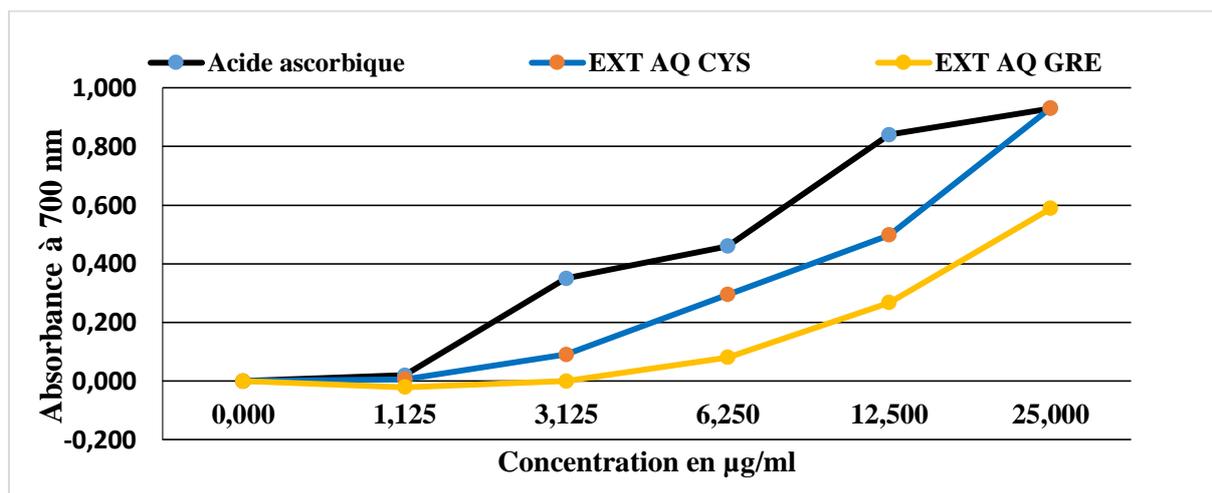


Figure 38 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les résultats des concentrations réductrices des ions Fe^{3+} à 0,5 d'absorbance sont calculés, puis représentés par le tableau 8 affichant la décroissance du potentiel antioxydant, plus le A0,5 est petit, plus la réaction est intense, plus l'échantillon est actif vis-à-vis de l'oxydation.

Tableau 8 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu\text{g}/\text{ml}$)) des antioxydants de références et des extraits testés

	$A_{0,5} \pm \text{Ecart type (En } \mu\text{g/ml)}$
Acide ascorbique	3,62 \pm 0,29
Ext AQ CYS	13,18 \pm 0,88
Ext AQ GRE	17,12 \pm 4,45

Les résultats obtenus, révèlent des activités antioxydantes appréciables de nos extraits mais qui restent inférieures à celles de l'acide ascorbique. On remarque également que l'extrait aqueux de *Cistus sp* possède un pouvoir réducteur des ions de fer ferrique supérieur celui de l'écorce de grenade et similaire à celui de l'acide ascorbique à une concentration de $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ($Do=0,931\pm 0,065$ et $0,930\pm 0,3$ respectivement)

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante par le test PR indique que l'acide ascorbique est le plus actif parmi tous les échantillons avec une valeur d' $A_{0,5}$ atteignant $3,62\pm 0,29 \mu\text{g}/\text{ml}$, l'extrait de *P. granatum* est l'échantillon le plus faible en matière de réduction de l'ion Fe^{3+} , donnant une valeur d' $A_{0,5} = 17,12\pm 4,45 \mu\text{g}/\text{ml}$. Comparativement aux standards, la *Cistus sp* a exhibé un très bon potentiel antioxydant avec une valeur de $A_{0,5} = 13,18\pm 0,88\mu\text{g}/\text{ml}$, ce dernier résultat s'avère plus intéressant que celui obtenu pour l'infusé aqueux de l'espèce *Tuberaria lignosa* ($A_{0,5} = 21.3 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{ml}$) (José et al., 2012). Ce pouvoir antioxydant est probablement lié à la richesse de cette fraction en composés réducteurs tels que les sucres libres.

Dans une autre étude similaire, il est noté que l'extrait de la peau de grenade, tel qu'évalué par le test de FRAP, s'est avéré être la source la plus riche en antioxydants parmi les extraits de pelure des fruits les plus consommés. De même, cette étude a démontré une activité antioxydante 2,8 fois plus élevée que les extraits de graines et de feuilles du fruit (Ismail et al., 2012) les résultats ont montré que l'extrait de l'écorce a une capacité antioxydante nettement plus élevée que celle de l'extrait de pulpe en matière de piégeage ou de prévention contre l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyle et peroxyde, ainsi que l'inhibition des LDL induite par l'oxydation de CuSO_4 (Soni et al., 2012).

Donc on peut dire que le pouvoir réducteur des extraits peut être dû au fait que ces extraits sont riches en composés phénoliques, d'où l'on peut déduire que les polyphénols, notamment les flavonoïdes, jouent un rôle très important dans la chélation des métaux de transition impliqués. Réaction de Fenton (réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène pour

former des radicaux hydroxyle) (Ghedadba et al., 2015). Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des agents réducteurs et inactivants des agents oxydants.

Certaines études antérieures ont également montré que la capacité réductrice d'un composé peut être un indicateur important de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura et Bendimerad, 2012)

III.5. Le test Phénanthroline :

Au sujet de l'activité réductrice du fer, L'importance la plus fréquente de cette évaluation est due au rôle toxique du fer lié à la décomposition catalytique de peroxyde d'hydrogène par réaction de Fenton, conduisant à la formation de ROS et causant des dommages aux biomolécules, y compris les lipides, les protéines et l'ADN (Ecker et al., 2015).

Suite à une réaction d'oxydoréduction, un complexe stable rouge-orangé de Fe^{2+} coordonné par trois ligands de phénanthroline est formé. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm.

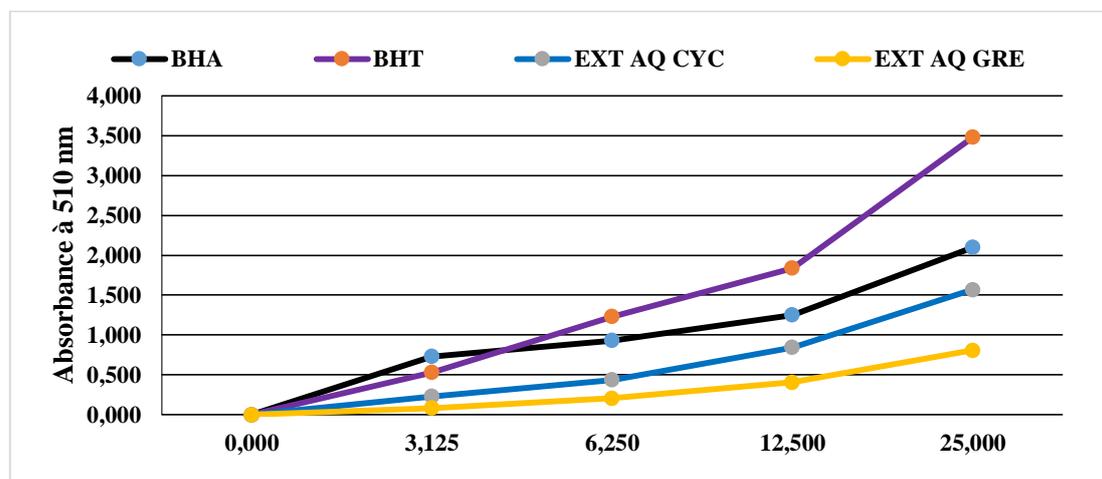


Figure 39 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode Phénanthroline (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les résultats obtenus dans notre étude (La figure 39) ont montré que l'absorbance de tri-phénanthroline augmente en fonction de la concentration, soit pour les standards ou pour les deux extraits des plantes étudiées. On observe une absorbance maximale dans la concentration 25 μ g/ml pour les standards BHA, BHT et pour les deux Ext aq *cistus sp* et *P. granatum*, mais qui restent inférieures à celle de standards.

L'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{2+} phénanthroline a été évaluée en mesurant les valeurs $A_{0,50}$ des extraits de la plante et celles des standards BHA et BHT.

Tableau 9 : le pouvoir antioxydant (exprimé par $A_{0,5}$ (en $\mu\text{g}/\text{ml}$)) des antioxydants de références et des extraits testés

	$A_{0,5} \pm \text{Ecart type (En } \mu\text{g}/\text{ml)}$
Acide ascorbique	NT
BHA	$0,930 \pm 0,07$
BHT	$2,240 \pm 0,17$
Ext AQ CYS	$7,532 \pm 0,32$
Ext AQ GRE	$15,159 \pm 1,21$

Les résultats obtenus à partir du tableau 9 montrent que les deux extraits sont capables de réduire le fer et de former un complexe Fe^{2+} phénantroline. On peut déduire que le BHA présente le pouvoir réducteur le plus important ($A_{0,50}=0,930\pm 0,07\mu\text{g}/\text{ml}$), suivi par BHT ($A_{0,50}= 2,240\pm 0,17\mu\text{g}/\text{ml}$), tandis que, l'extrait cistus arrive en troisième position avec $A_{0,50}=7,532\pm 0,32\mu\text{g}/\text{ml}$, et en dernière position, *P. granatum* avec $A_{0,50}=15,159\pm 1,21\mu\text{g}/\text{ml}$. Et par rapport à l'activité antioxydante des radicaux DPPH et ABTS on observe une basse capacité réductrice de la formation du complexe Fe^{2+} -phénantroline pour les deux plants étudiés.

Cette différence de puissance réductrice est liée au pouvoir réducteur des polyphénols en fonction du degré d'hydroxylation et du degré de conjugaison des composés phénoliques. Spécifiquement pour les flavonoïdes, il a été reporté que la capacité d'élimination des radicaux libres augmente en cas de présence de : une structure 3',4'-dihydroxy dans le cycle B, une double liaison (C2-C3) en conjonction avec le groupe 4-oxo dans l'hétérocycle, des groupes 3- et 5-hydroxyle dans le cycle A avec une fonction 4-oxo dans les cycles A et C (Walger, 2018; Ecker et al., 2015).

VI. Activité anti-inflammatoire *in vitro* :

VI.1. Inhibition de la dénaturation thermique des protéines (BSA) :

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel elles perdent leur structure secondaire et tertiaire et se traduit par des pertes des propriétés biologiques des molécules de protéines sous l'effet d'un stress ou d'un composé externe, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur. La dénaturation des protéines a été corrélée avec la formation de troubles inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, le diabète et le cancer. Par conséquent, la capacité d'une substance à prévenir la dénaturation des protéines peut également aider à prévenir les troubles inflammatoires (Sarveswaran et al., 2017).

Le mécanisme de dénaturation implique probablement une altération de la liaison électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure. Plusieurs médicaments anti-inflammatoires ont montré une capacité dose-dépendante à inhiber la dénaturation des protéines induite thermiquement, les AINS ont pris en compte la prévention de la dénaturation des protéines, qui agit comme des antigènes et provoque des maladies auto-immunes. Ces médicaments contiennent plusieurs effets indésirables, en particulier une irritation gastrique provoquant le développement d'ulcères gastriques (Rahman et al., 2015).

La figure 40 représente la variation du pourcentage de protection vis-à-vis de la dénaturation thermique du BSA en fonction des différentes concentrations en extrait. Ces résultats sont comparés à ceux enregistrés pour le diclofénac, considéré dans ce test comme molécule de référence.

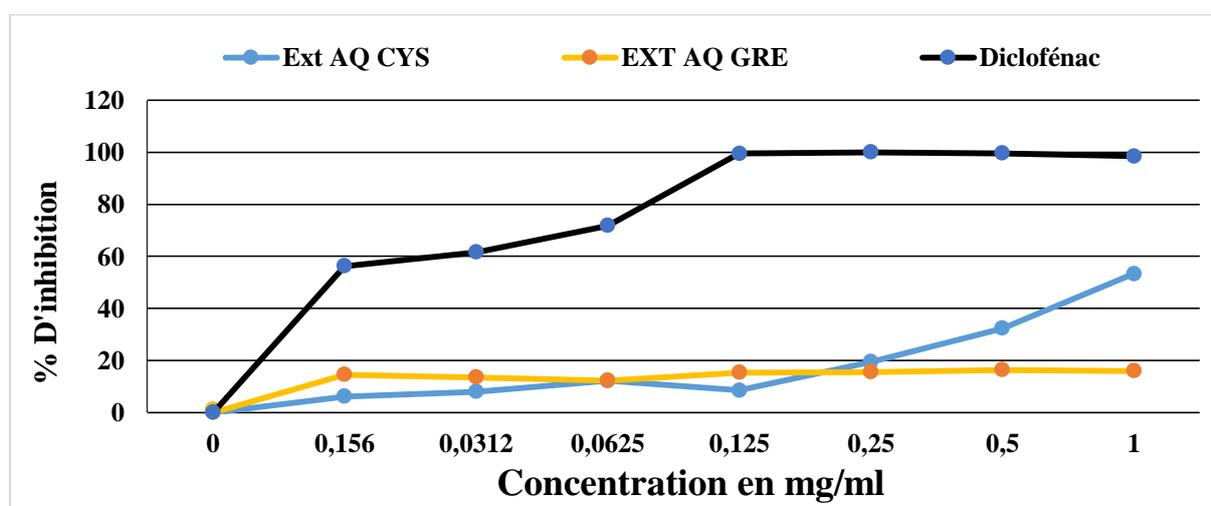


Figure 40 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation du BSA

Nos résultats montrent que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA pour les extraits était inférieur à celui du diclofénac pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 0,250 mg/ml le diclofénac a relevé un pourcentage d'inhibition maximal de la dénaturation du BSA de $100,07 \pm 0,00\%$, et le pourcentage le plus bas est de $56,28 \pm 6,61\%$ pour une concentration de 0.156 mg/ml.

Par rapport aux deux extraits, le pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA le plus élevé de l'extrait aqueux de *Cistus* est de $53,32 \pm 5,86\%$ et le pourcentage le plus faible est de $6,06 \pm 5,20\%$ pour les concentrations 1 et 0,156 mg/ml respectivement.

Concernant l'extrait aqueux de *P. granatum* pour la concentration de 0,5mg/ml nous avons noté le pourcentage d'inhibition le plus supérieur de la dénaturation du BSA avec

16,31± 1,21 %, et le pourcentage le plus inférieur est de 12,24± 0,00% à une concentration de 0,063 mg/ml.

La capacité anti-inflammatoire des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du BSA. Nous avons déterminé pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du BSA ou IC₅₀. À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Le pouvoir anti-inflammatoire *in vitro* (exprimé par IC₅₀ (en µg /ml)) d'un anti-inflammatoire de référence et des extraits testés

	IC ₅₀ ±Ecart type (En µg /ml)
Diclofénac	52,87 ± 7,66
Ext AQ CYS	1472,81 ± 189,84
Ext AQ GRE	4480,90 ± 1096,61

D'après les résultats présentés dans le tableau numéro 10, la CI₅₀ obtenue pour le diclofénac, utilisé comme molécule de référence, est largement inférieure à celle de l'extrait aqueux *P. granatum* et de *cistus* (52,87 ± 7,66 µg /ml contre 4480,90 ± 1096,61µg /ml et 1472,81 ± 189,84 µg /ml respectivement). Par conséquent, la capacité des Ext aq de *cistus sp* et de *P. granatum* à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti inflammatoire.

La dénaturation des protéines a été bien corrélée avec l'apparition de la réponse inflammatoire et conduit à diverses maladies inflammatoires, y compris l'arthrite. Les lésions tissulaires au cours de la vie peuvent être référées à la dénaturation des constituants protéiques des cellules ou de la substance intercellulaire (Osman et al., 2016).

VI.2. Activité anti-hémolytique :

VI.2.1. Innocuité des extraits vis-à-vis de la cellule érythrocytaire :

Le pourcentages d'hémolyse obtenues après incubation de la suspension des GR de 10 % avec l'extrait aqueux à température ambiante, sont calculés en référence à un témoin positif induisant 100 % d'hémolyse (eau distillée) et à un témoin négatif (PBS tampon).

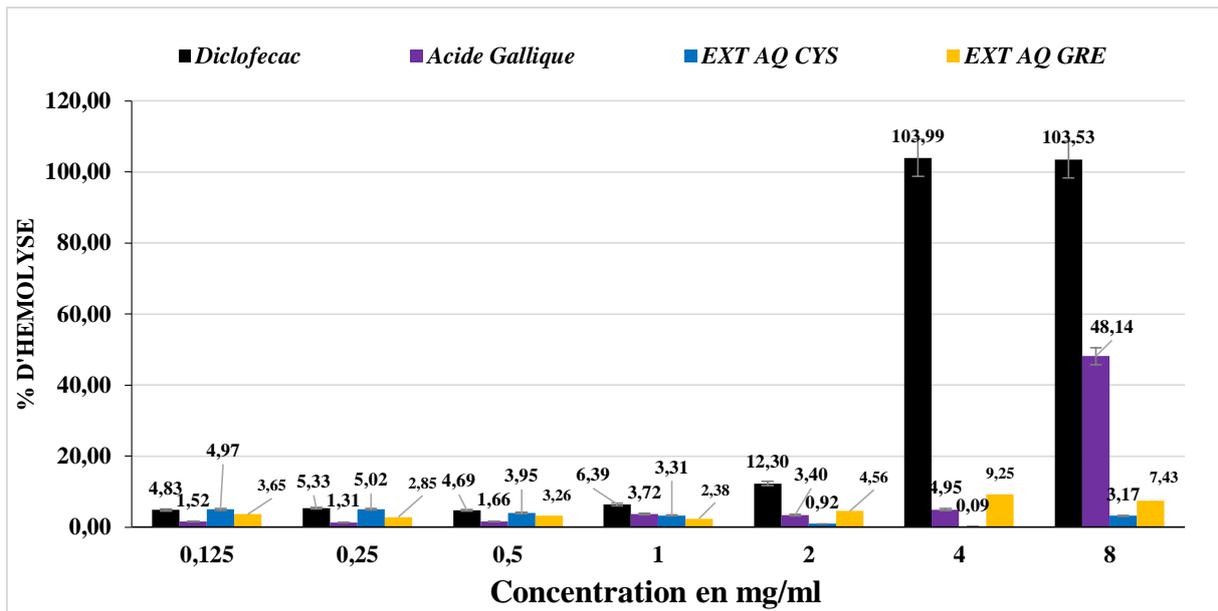


Figure 41 : Pourcentages d'hémolyse en fonction de la concentration des extraits testés

D'après les résultats obtenus dans l'histogramme des pourcentages d'hémolyse Figure 41, l'extrait aqueux *Cistus sp* a donné des pourcentages 4.69 %, 4.83 %, 5.33 %, 6.39 %, 12.30 %, 103.53 %, 103.99 % d'hémolyse aux concentrations de (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8) mg /ml. Ainsi que l'extrait aqueux de *P. granatum* a donné des pourcentages d'hémolyse de 2.38 %, 2.85 %, 3.26 %, 3.65 %, 4.56 %, 7.43 %, 9.25 % aux mêmes concentrations. Ces résultats lors ce qu'on a réfère au diclofénac indique que les Ext aq des deux plantes étudiées n'ont pas la propriété d'hémolyse.

VI.2.2. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique associé à un stress thermique :

La stabilisation de la membrane des globules rouges a été utilisée comme méthode pour étudier l'activité anti-inflammatoire in vitro parce que la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (Marliyah et Ananthi, 2015). L'activité extracellulaire des enzymes lysosomales libérées au cours de l'inflammation est liée à une inflammation aiguë ou chronique

L'effet protecteur de l'extrait de *P. granatum* et *Cistus Sp* contre l'hémolyse des globules rouge induite par la chaleur est illustré dans (la figure 42) pour ce test l'acide gallique est utilisé comme molécule de traitement anti-inflammatoire.

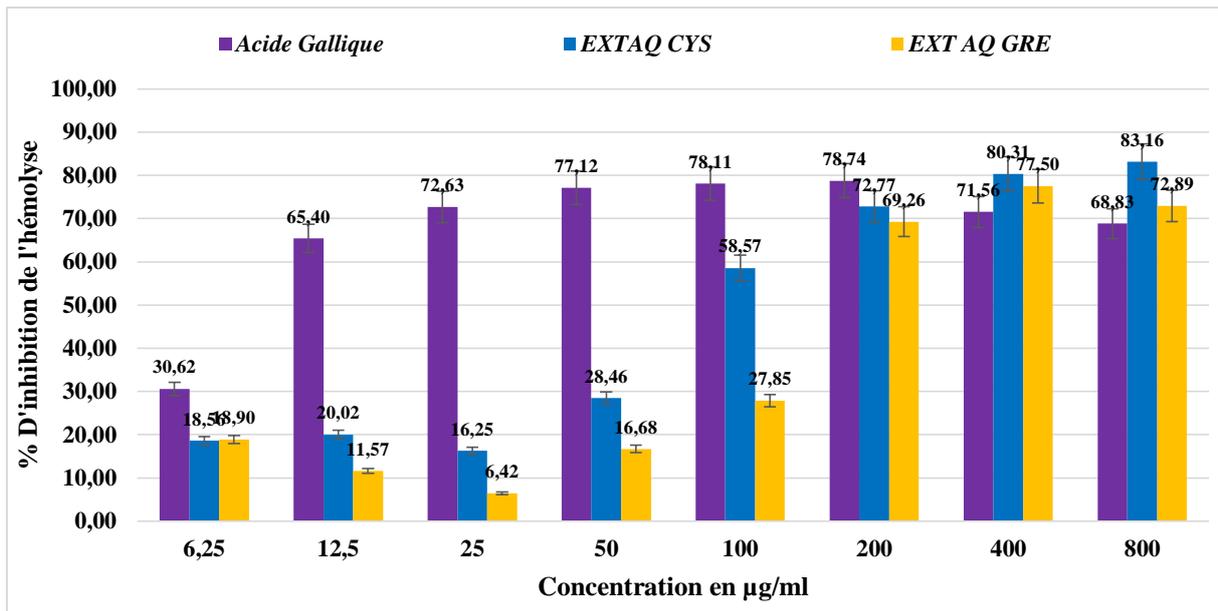


Figure 42 : Pourcentages de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique et thermique en fonction des différentes concentrations des extraits testés.

A partir des résultats mentionnés dans la figure 42, On a enregistré un effet protecteur maximal de (78,74±1,69%) de l'acide gallique à une concentration de 200 µg/ml. Cet effet protecteur commence à diminuer progressivement à partir de 100 µg/ml jusqu' à 6,25 µg/ml par un effet minimal de (30,62±3,47).

On remarque que le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse le plus élevé est observé avec l'extrait de *Cistus* à la concentration de 800 µg/ml, et le plus faible observé à la concentration de 25 µg/ml de l'appart d'extrait des écorces de grenade. Ces deux extraits présentent des effets inhibiteurs d'hémolyse des globules rouges proches aux concentrations de 200,400 µg/ml à 800 µg/ml. Au-delà de ces concentrations, l'efficacité de l'extrait aqueux de *Cistus Sp* est supérieure toujours à celle de l'écorce de grenade et similaire a la concentration de 6,25µg/ml.

Par ailleurs, le traitement des érythrocytes par les extraits de plantes étudiée présente une inhibition d'hémolyse nettement supérieure à celle obtenue avec l'acide gallique. Qui a donné une inhibition maximale de (71,56 ± 3.91%), (68,83±0,59%) aux mêmes concentrations des extraits (400,800µg/ml) avec une inhibition maximale de (77,50±2.49%, 71,89±1,73% d'écorce de *P. granatum* et 80,31 ±4,99%, 83,16±6,01% de la *Cistus sp*), cette évaluation du pourcentage d'inhibition montre que les deux Ext aq possèdent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges par la chaleur à différentes concentrations.

Les résultats que nous avons obtenus pour la plante *cistus sp* sont proches de ceux trouvés par Laid, 2021 qui a utilisé le même protocole d'extraction et dans les mêmes conditions pour la plante *Cistus*, d'autres études similaires ont été réalisées sur l'extrait aqueux de l'écorce de *P.granatum* telles que l'étude de Tatke et al., 2015 qui a utilisé différents solvants d'extraction et qui a eu comme pourcentages de stabilisation : (Extrait aqueux 58.81 ± 1.448 , éther de pétrole : 31.48 ± 1.490 , acétate d'éthyle : 42.94 ± 0.679 , méthanol : 86.95 ± 2.477 , extrait hydro méthanolique $77.05 \pm 1.466\%$), une autre étude de Kota et al., 2018 sur cet extrait, il a stabilisé significativement la membrane érythrocytaire à 94,59 % à la concentration de 2000 µg/ml en comparant avec les résultats de notre extrait de l'écorce de grenade qui a présenté une inhibition maximale de 77.50% à une concentration de 400µg/ml, La grande différence enregistrée entre les deux valeurs peut être due à l'effet de la dose (notre dose maximale n'a pas dépassé 800 µg/ml).

Chaudhuri et ces collaborateurs (2007) suggèrent que les polyphénols peuvent être responsables de cet effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique et les composés phénoliques ont aussi la capacité de se fixer sur le site actif de la NADH-cytochrome réductase, ce qui active le complexe PMRS et donc agit contre l'oxydation de l'érythrocyte.

V. Les tests in vivo

V.1. Test de toxicité

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL₅₀) (Diezi, 1989).

Les résultats obtenus à partir du test de toxicité montrent que la dose initiale de 100mg/kg d'extraits par voie intra péritonéale avec une répétition d'essais n'a induit aucun cas de décès et ne provoque aucun trouble pendant les deux premières heures d'observation, jusqu'à 24 heures. Selon les règles dictées par l'OCDE 423, la dose d'essai a été augmentée à 200 mg/kg par la voie intra péritonéale avec une répétition d'essais et a induit une toxicité remarquable au niveau de la peau, les yeux, les muqueuses, signes de tremblements, mort de la moitié des souris

Tableau 11 : différents comportements des souris dans le test de toxicité à dose 100 g/kg et 200 g/kg.

La dose	100 mg/kg			200 mg/kg		
Observation	30 MIN	4H	24H	30 MIN	4H	24H

Respiration	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Absent
Tremblement	Absent	Absent	Absent	absent	Présent	Présent
Douleur	Absent	Absent	Absent	absent	Présent	Présent
Changement de la peau	Absent	Absent	Absent	Présent	Présent	Présent
Coma	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Présent
Vivant/mort	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Mort

Selon (Diezi, 1989), on peut considérer que les 2 extraits sont très toxique car DL_{50} (mg/kg) entre 50 à 500 mg /kg sur la voie IP. Une étude de (Nor El Houda et Nouredine, 2018) Après administration orale des extraits méthanolique et aqueux d'écorce de fruit de grenade 250 doses de 500 mg/kg, aucune mortalité n'a été enregistrée pour tous les animaux observés 24h, donc la dose requise pour la toxicité orale causée par la punicalagine était de 20 fois plus élevée que la dose requise lorsqu'elle est administrée par voie intra péritonéale à des souris (Zeghad, 2018)

Certains métabolites secondaires produits par différentes espèces de *Cistus Sp* exercent des effets toxiques sur les mammifères. Les composés les plus toxiques sont l'acide gallique et les tanins, néfastes pour le foie et les reins. Plusieurs cas de toxicité mortelle chez les bovins ont été rapportés, dus à l'ingestion de *C. salviifolius* (Yeruham et al., 2002)

En citant une étude réalisée évalue la toxicité potentielle de l'extrait aqueux de feuilles de l'arbuste *C. ladaniferus* (extrait CL) par la méthode d'administration orale aiguë et subchronique chez la souris et le rat (El Kabbaoui et al., 2017). Les résultats obtenus au cours de l'essai de toxicité aiguë, lorsqu'on a administré à des souris des doses de 3 000 et 5 000 mg/kg, l'extrait de CL a entraîné comme conséquence un taux de mortalité de 10 à 30%, respectivement, et induit des signes de toxicité. En revanche, aucune mortalité ni effet indésirable n'ont été notés à des doses de 1000 et 2000 mg/kg. La dose létale médiane (DL_{50}) de l'extrait a été estimée à plus de 5000 mg/kg (El Kabbaoui et al., 2017).

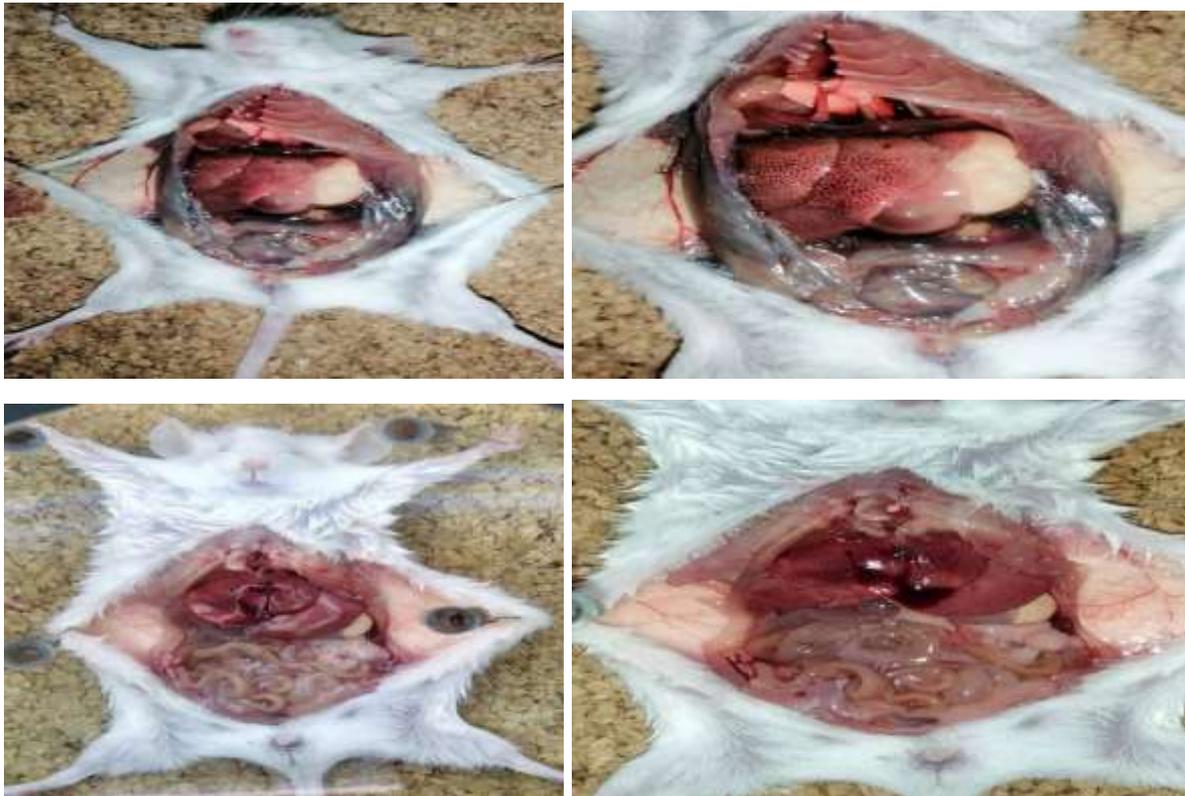


Figure 43 : Observation du foie des souris mortes des extraits étudiés

La richesse de l'écorce *P. granatum* en tannins pourrait être à l'origine de cette toxicité. Il a été dit que la punicalagine, le tanin ellagique hydrosoluble et le polyphénol antioxydant très abondant dans l'écorce de grenade étaient toxiques pour le bétail (Bendjabeur, 2012)

Le pyrogallol est connu pour être potentiellement responsable d'une cytotoxicité via la production de radicaux libres d'oxygène. Il est considéré comme plus toxique que l'acide gallique ou l'acide tannique, car le pyrogallol produit à partir du métabolisme cellulaire de l'acide gallique. L'acide gallique provoque une toxicité chez le rat et d'autres animaux après ingestion, et entraînant une réduction de l'hémoglobine et des lésions hépatiques indiquant une anémie hémolytique (Zeghad, 2018)

Cependant, la DL_{50} a une valeur très limitée, car elle ne concerne que le taux de la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement ... etc (Lapointe, 2004).

V.2. Effet antipyrétique des extraits :

Le tableau montre l'effet antipyrétique des Ext aq de l'écorce de grenade et de *Cistus sp* sur l'hyperthermie induite par l'injection d'une solution de levure de bière (20 %) chez le rat.

L'injection de la suspension de levure de bière a provoqué une élévation de température rectale après 12 heures.

Tableau 13 : Variation de la température provoquée par les extraits sur l'hyperthermie induite chez le rat par la levure de bière : Chaque valeur représente la moyenne \pm SD; n = 6 pour chaque groupe.

Produit	Diminution de la température rectale (°C)						
	Avant traitement	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Témoin (Eau physiologique)	38,24 \pm 0,29	0,12 \pm 0,09	0,40 \pm 0,16	0,70 \pm 0,31	0,94 \pm 0,21	1,28 \pm 0,21	1,28\pm 0,28
Paracétamol 10 mg/kg	38,04 \pm 0,34	1,46 \pm 0,49	1,74 \pm 0,43	1,52 \pm 0,41	1,58 \pm 0,22	1,52 \pm 0,26	1,56\pm 0,36
Ext AQ GRE 50 mg/kg	38,00 \pm 0,16	2,70 \pm 0,99	1,38 \pm 0,68	0,56 \pm 0,50	0,74 \pm 0,30	0,98 \pm 0,50	0,78\pm 0,33
Ext AQ CIS 50 mg/kg	37,94 \pm 0,11	2,42 \pm 0,63	1,88 \pm 0,72	1,12 \pm 0,22	0,86 \pm 0,26	0,84 \pm 0,26	0,74\pm 0,27
Ext AQ GRE 100 mg/kg	38,00 \pm 0,10	3,47 \pm 0,44	3,23 \pm 0,09	3,17 \pm 0,78	2,43 \pm 0,65	2,30 \pm 0,10	2,07\pm 0,06
Ext AQ CIS 100 mg/kg	38,10 \pm 0,50	3,03 \pm 0,40	2,03 \pm 0,47	3,27 \pm 0,17	3,27 \pm 0,95	3,23 \pm 0,60	3,20\pm 0,17

L'extrait aqueux de *P. granatum* et de *Cistus sp* (100 mg/kg) sont des antagonistes significativement l'hyperthermie induite par la levure de bière après une demi-heure et persiste jusqu'à la 5ème heure qui suivent l'injection de la levure de bière. Ces effets sont surtout significatifs dans les 30min, 1 heures avec une diminution de température rectale avec une valeur de (T30=3,47 \pm 0,44, T60=3,23 \pm 0,09) pour l'Ext aqueux écorce GRE et (T30=3,03 \pm 0,40, T60=2,03 \pm 0,47) pour le deuxième Ext aqueux de CIS, c'est deux valeurs sont très élevées que celles du paracétamol (T30=1,46 \pm 0,49, T60=1,74 \pm 0,43)

La dose de 50 mg/kg des Ext aq de *P. granatum* et de *Cistus sp* est moins efficace par rapport à la dose 100mg/kg avec une diminution de (2,70 \pm 0,99 ; 2,42 \pm 0,63). Dans les 30 premières minutes et (1,38 \pm 0,68 ; 1,88 \pm 0,72) dans une heure, mais elle reste toujours élevée que celle du paracétamol (t30=1,46 \pm 0,49, T60=1,74 \pm 0,43). La dose 50mg/kg donne un effet efficace et proche de paracétamol que la dose 100mg/kg qui baisse trop la température car la régulation de la température corporelle exige un équilibre sensible entre la production et la perte de la

chaleur et l'hypothalamus règle le point de réglage pour rendre la température à sa valeur normale (Ushikubi et al., 1998).

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

L'administration des Ext aq de *P. granatum* et de *Cistus sp* a significativement atténué la température rectale induite chez les souris. Ainsi, ces résultats nous amènent à prédire que ces extraits renferment des molécules pharmacologiquement actives interférant avec la synthèse des PGs agissant de façon similaire aux AINS (Bannwarth et al., 2016) en provoquant un blocage de l'activité enzymatique de la cyclo-oxygénase grâce à son action sur COX-2 ou en améliorant la production des substances antipyrétiques du corps telles que la vasopressine et l'arginine (Chandrasekharan, 2002).

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

V.3. Test analgésique

La douleur est une fonction vitale du corps humain, impliquant des nocicepteurs et le système nerveux central (SNC) pour transmettre des messages de stimuli nocifs au cerveau. Le mécanisme de la douleur neuropathique est distinct car il est causé par une blessure au système nerveux lui-même et peut se produire sans la présence de stimuli nocifs (City, 2019).

Dans le test de torsion, l'administration d'acide acétique (1 %) a été utilisée pour induire une douleur d'origine périphérique chez les souris. Une torsion est indiquée par un étirement de l'abdomen avec un étirement simultané d'au moins un membre postérieur. L'activité analgésique des échantillons d'essai est déduite de la diminution de la fréquence des torsions (Li et al., 2016).

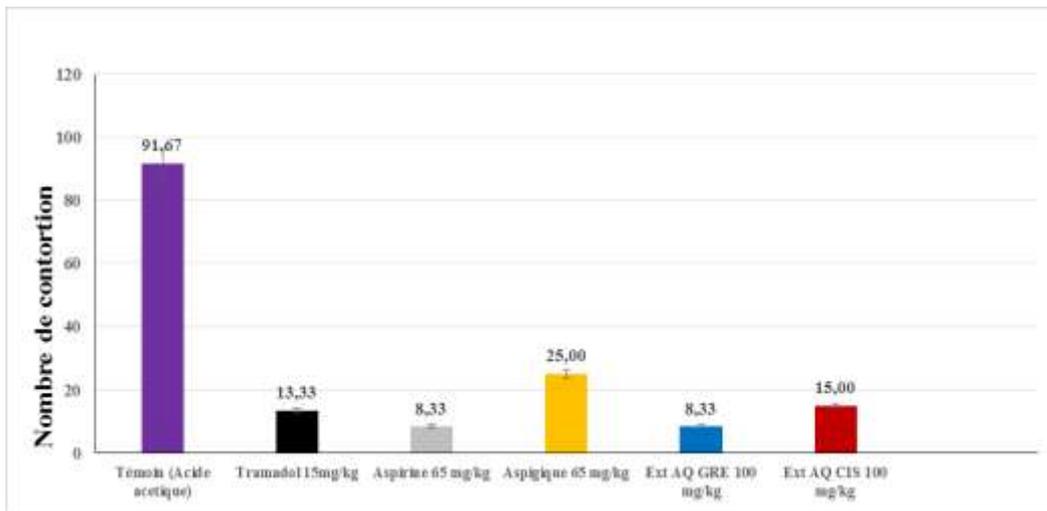


Figure 44 : Effet des différents extraits et du tramadol, aspirine et aspigique sur le nombre de contorsions induit par l'administration de l'acide acétique (1%) (Effet analgésique).

D'après la figure 44, l'administration intrapéritonéale des Ext aq *cistus* et *P. granatum* (100 mg/kg) a provoqué une inhibition significative des torsions par rapport au groupe témoin. Les résultats étaient comparables aux standards : l'aspirine et l'aspigique à une dose de 65mg/kg et tramadol à 15mg/kg qui produisaient des nombres de contorsions 8,33, 25 et 13.33 respectivement, ainsi qu'un témoin négatif avec un nombre maximum de contorsions de 91.67.

Les résultats ont révélé un effet analgésique similaire entre l'Ext aq de *Cistus* sp et celui de l'aspirine (8,33) et un effet plus fort par rapport aux tramadols, l'aspigique et l'Ext aq de *P. granatum* qui ont notés 15 contorsions mais ce résultat reste très proche de celui tramadol, Contrairement à l'aspigique avec lequel nous avons remarqué un plus grand nombre de contorsions en rapport à d'autres standards à nos extraits., cela signifie que ce médicament ne convient pas à l'utilisation analgésique.

La réduction du nombre de torsions abdominales causées par *cistus* et *punica granatum* suggère une activité analgésique périphérique des deux extraits qui pourrait être liée à la réduction de la libération de médiateurs inflammatoires.

Dans ce test, l'acide acétique stimule le tissu à produire plusieurs médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine et les cytokines. La méthode a également été associée à des prostanoides, notamment l'augmentation des niveaux de PGE2 et de PGF2 α .

dans les liquides péritonéaux ainsi que dans les produits à base de lipoxigénase (**Sayah et al., 2017**).

Les prostaglandines sont synthétisées dans les cellules à partir de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2), ces enzymes(associée par le récepteur couplé aux protéines G et de AMPc) sont sécrétées par les cellules endommagées et produisent une sensation de douleur (**City, 2019**)

Les analgésiques sont les agents qui permettent de soulager la douleur sans perdre connaissance. L'activité végétale des ingrédients pharmaceutiques réduisant la sensation de douleur comprend la coumarine, les ingrédients alcaloïdes, les acides organiques, les stéroïdes glycosides, les ingrédients phénoliques, les flavonoïdes, En effet, les flavonoïdes empêcheraient les prostaglandines d'induire la COX dans les tissus enflammés. Par conséquent, les flavonoïdes réduisent la douleur inflammatoire en agissent sur les récepteurs de la douleur et produisent une action analgésique et inhibant les cascades de signalisation (**Bouyahya et al., 2022**).

V.4. Effet anti-œdémateux des extraits :

L'inflammation est une réponse biologique complexe des tissus vasculaires à des stimuli nocifs. En outre, il est associé à la douleur, et elle implique une augmentation de la dénaturation des protéines, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une altération de la membrane, entre autres. L'inflammation est également décrite comme la réponse de l'organisme pour inactiver ou à éliminer les stimuli ou les organismes envahissants, pour éliminer les irritants et préparer le terrain pour la réparation des tissus, et le processus est accéléré par la libération de médiateurs chimiques à partir de cellules ou de tissus blessés et de cellules en migration.

L'activité anti-inflammatoire des EXT aq *cistus sp* et *P. granatum* a été évaluée par la méthode de l'œdème induit par le formol dans la patte des rats normaux et des rats rendus diabétiques par streptozotocine. On a mesuré le changement dans l'œdème une heure après l'administration intrapéritonéale des divers produits, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux d'un médicament diclofénac qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien et celui du contrôle physiologique.

Les rats ont jeûnés pendant la nuit, puis ont reçu une injection intrapéritonéale (p.i.) De streptozotocine à une dose de 65 mg/kg, dissoute dans un tampon de citrate (0,1 M ; pH

4,5). Quelques jours après l'injection de streptozotocine, des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine latérale de la queue et testés pour la glycémie par le glucomètre (Diagno-Ccheck ® Smart). Les rats ayant un taux de glucose >250 mg / dl pourraient être utilisés comme animaux de laboratoire.

Tableau 14 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats normaux et des rats rendus diabétique par streptozotocine : Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ; n = 5 pour chaque groupe.

Traitement	Dose	0 h	1 h	2h	3 h
		Volume de la patte droite (Moyenne \pm SD) ml	Volume de la patte droite (Moyenne \pm SD) ml	Volume de la patte droite (Moyenne \pm SD) ml	Volume de la patte droite (Moyenne \pm SD) ml
Témoin (Eau physiologique)	0	1,556 \pm 0,086	2,611 \pm 0,250	2,500 \pm 0,211	2,527 \pm 0,267
Diclofénac	10 mg/ml	1,416 \pm 0,204	1,638 \pm 0,370	1,527 \pm 0,245	1,500 \pm 0,279
Ext AQ CIS	100 mg/ml	1,217 \pm 0,046	1,367 \pm 0,139	1,300 \pm 0,112	1,233 \pm 0,070
Ext AQ GRE	100 mg/ml	1,067 \pm 0,149	1,217 \pm 0,112	1,167 \pm 0,058	1,100 \pm 0,108
Témoin diabétique (Eau physiologique)	0	0,733 \pm 0,685	1,017 \pm 0,932	1,017 \pm 0,932	1,117 \pm 1,030
DIAB+ Diclofenac	10 mg/ml	1,056 \pm 0,192	1,333 \pm 0,144	1,389 \pm 0,192	1,333 \pm 0,144
DIAB+ Ext AQ CIS	100 mg/ml	0,917 \pm 0,220	1,194 \pm 0,127	1,139 \pm 0,254	1,139 \pm 0,240
DIAB+ Ext AQ GRE	100 mg/ml	1,000 \pm 0,166	1,222 \pm 0,096	1,167 \pm 0,083	1,139 \pm 0,127

D'après le tableau 14 Chez les témoins négatifs des rats non diabétique, l'injection du formol 1% dans la patte postérieure droite des rats témoins œdémateux provoque un œdème qui passe de 1,556 \pm 0,086 ml à 2,611 \pm 0,250ml dans la première heure puis à 2,500 \pm 0,211ml dans la deuxième heure et 2,527 \pm 0,267ml dans la troisième heure. Ces valeurs correspondent à des pourcentages d'augmentation des volumes d'œdèmes respectifs de 50%, et 60%. Ces résultats montrent que l'œdème maximal a été atteint à la 2ème heure. En revanche chez les témoins négatifs des rats diabétiques l'œdème passe de 0,733 \pm 0,685ml à 1,017 \pm 0,932ml dans la première heure puis à 1,017 \pm 0,932ml dans la deuxième heure et 1,117 \pm 1,030ml dans la troisième heure. Ces valeurs accordent à des pourcentages d'augmentation des volumes d'œdèmes respectifs de 50% et 66,66%. Ces résultats montrent que l'œdème maximal a été atteint à la 3ème heure, contrairement à l'étude de (Cuman et al., 2001) qui a trouvé que les rats rendus diabétiques avec la streptozotocine étaient moins sensibles au carraghénane avec l'œdème étant 20% inférieur à celui du contrôle rat donc les réponses réduites ne sont pas liées aux niveaux de sucre dans le sang des rats, ce qui indique qu'une carence en insuline plutôt qu'une hyperglycémie est responsable des réponses altérées.

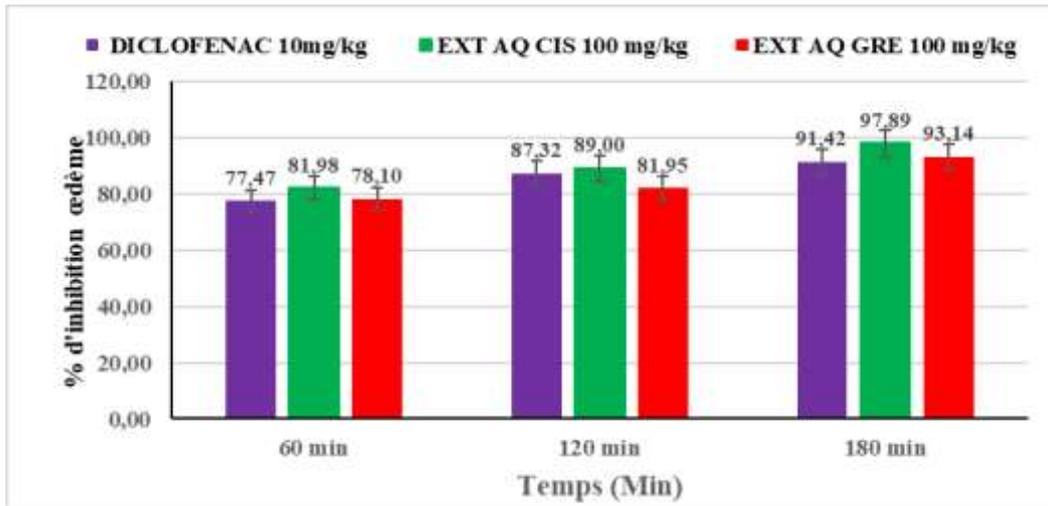


Figure 45 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats normaux (Pourcentage d'inhibition de l'œdème).

Les résultats ont été présentés à la Figure 45, les extraits ont montré des inhibitions significatives de l'augmentation de l'œdème de la patte entre 30 min à 180 min après l'injection de formol par rapport au groupe témoin.

180 minutes après l'injection du formol, les deux extraits ont montré une activité d'inhibition significative et plus élevée (97,89% pour *cistus* et 93,14% pour *P. granatum*) par rapport au médicament de référence diclofénac à une dose de 10 mg / kg avec une valeur d'inhibition de 91,42%.

Les résultats obtenus ont démontré une activité inhibitrice efficace des deux Ext aq sur les deux phases de l'inflammation de la patte induite par le formol. Ces résultats étaient similaires à ceux produits par le diclofénac sodique (10 mg/kg), un médicament AINS, dont le mécanisme d'action est médié par une inhibition non sélective de l'enzyme cyclo-oxygénase (Tahiri et al., 2017).

Ce modèle in vivo approprié implique plusieurs médiateurs libérés en séquence. Une phase initiale au cours des premières minutes est causée par la libération d'histamine et de sérotonine ; une deuxième phase est médiée par la bradykinine et enfin une troisième phase, dont le médiateur est suspecté d'être des prostaglandines produite à partir de métabolites de l'acide arachidonique par la catalyse de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Tahiri et al., 2017). 2h après l'injection du formol, un autre médiateur important dans l'inflammation aiguë est l'oxyde nitrique (NO), il a été rapporté que le formol provoque la production et la libération de NO sur le site blessé. De plus, la réponse inflammatoire est également liée à l'infiltration

locale et à l'activation des neutrophiles et à la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Sayah et al., 2017).

Les médicaments agissant sur le SNC comme les opioïdes suppriment les deux phases de manière égale. Alors que les médicaments agissant à travers le système nerveux périphérique comme les AINS et les corticostéroïdes inhibent exclusivement la deuxième phase (Segawa et al., 2007). C'est un fait bien établi que les anti-inflammatoires non stéroïdiens exercent leur activité par inhibition de la biosynthèse des prostaglandines, mais leur utilisation est associée à des effets indésirables graves (Roth, 2012). En tant que rôle important dans les réponses inflammatoires des cellules et tissus inflammatoires, l'inhibition de la COX-2 exerce des effets anti-inflammatoires et analgésiques puissants (Li et al., 2016)

Dans notre étude précédente, les Ext aq de *Cistus* et *P.granatum* ont montré des teneurs intéressantes en composés polyphénoliques, et ont démontré une forte activité antioxydante, compte tenu de l'implication possible des composés polyphénoliques et des agents antioxydants dans les effets anti-inflammatoires, Sayah et ses collaborateurs (2017) la richesse des extraits en composés polyphénoliques pourrait contribuer significativement à leurs effets anti-inflammatoires perceptibles.

Les résultats de la présente étude sont en accord avec l'étude d'El Youbi et al. (2016) démontrant que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus ladaniferus* (L.) possède un puissant effet anti-inflammatoire lorsqu'il est testé dans l'œdème de la patte postérieure induit par le carraghénane chez le rat.

D'autre part, les résultats de Küpeli et Yesilada (2007) ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus laurifolius* (L.) de Turquie n'ont montré aucun effet remarquable contre le modèle d'œdème de la patte postérieure induit par le carraghénane, tandis que l'extrait éthanolique était significativement actif à la fois à des doses de 250 et 500 mg / kg.

Les différences entre les espèces du genre *Cistus* dans la réponse anti-inflammatoire peuvent probablement être liées aux conditions environnementales et au profil génétique qui permettent à chaque espèce végétale d'avoir des constituants phytochimiques spécifiques et donc une réponse biologique variable (Küpeli et Yesilada, 2007).

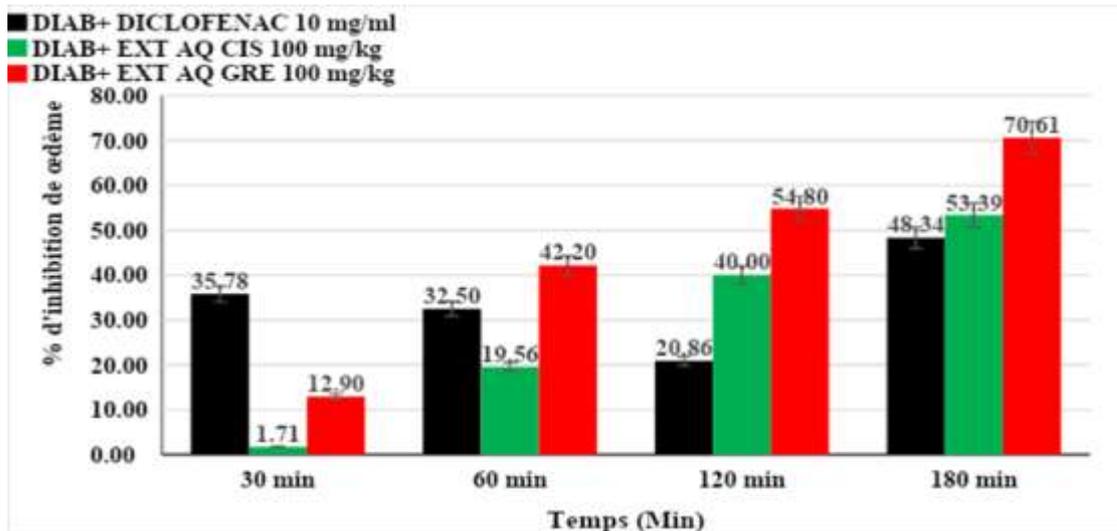


Figure 46 : Effet des différents extraits et du diclofénac sur l'œdème induit par le formol chez des rats rendus diabétique par streptozotocine (Pourcentage d'inhibition de l'œdème).

Chez les rats diabétiques traités par les EXT aq *P.granatm et cistus sp*, l'inhibition de l'œdème a été plus efficace que celle obtenue avec le diclofénac à la troisième heure après injection du formol 1% (70,61% et 53,39% respectivement contre 48,34%).

Dans la troisième heure après injection du formol 1% on constate des pourcentages d'inhibition de l'augmentation de l'œdème plus puissants chez les rats normaux par rapport au groupe des rats diabétiques dans le médicament diclofénac et les deux extraits, cela peut signifier que l'activité anti-inflammatoire était affectée par le diabète.

Concernant l'Ext aq d'écorce de *P. granatum* nous avons observé un pourcentage d'inhibition significative par rapport à *cistus sp* dans les groupes des rats diabétiques contrairement aux valeurs marquées chez les rats normaux ce qui indique une l'activité antidiabétique possible de l'écorce de grenade.

L'exposition au formaldéhyde est susceptible d'aggraver la réponse inflammatoire des cellules structurales en augmentant leur capacité à produire des cytokines et des médiateurs chimioattractants. De plus, dans les cellules endothéliales humaines le formaldéhyde augmente l'expression des molécules d'adhérence « ICAM-1 » et « VCAM-1 » et l'adhésion des éosinophiles (Pons-Lebeau, 2007)

L'inflammation par le formaldéhyde joue un rôle essentiel dans l'apparition et le développement du DT1. Effectivement, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IFN- γ , et TNF- α jouent un rôle prépondérant dans le DT1 en activant des cascades inflammatoires et un

stress du réticulum endoplasmique au sein des cellules β , ce qui mène finalement à l'apoptose cellulaire. **(Caroline et al., 2019)**

Grâce aux médiateurs proximaux de la voie UPR (les protéines PERK, ATF6 et IRE1) qui sont des protéines transmembranaires du RE et sont maintenues dans un état inactif par la liaison de la protéine chaperone BiP (binding immunoglobulin protein) à leur domaine luminal. Lors d'un stress du RE, Il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires produites dans le cadre du DT1 étaient capables d'activer et de maintenir le stress du RE, induisant l'expression de CHOP et renforçant ainsi l'apoptose des cellules β pancréatiques déjà induite par les cellules immunitaires et l'inflammation **(Zhong et al., 2012)**

Les voies IRE1 et ATF6 vont également être capables d'activer les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B entraînant la transcription de caspases, d'iNOS et de cytokines pro-inflammatoires. Toutes ces voies permettent de renforcer l'apoptose des cellules β , mais aussi d'entretenir l'état inflammatoire chronique ce qui va réciproquement entretenir le stress du RE **(Zhong et al., 2012)**

L'oxyde nitrique produit abondamment dans le cadre de la réponse inflammatoire par iNOS et par les macrophages est capable d'inhiber SERCA (sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase), une pompe calcique du RE. Cette inhibition va entraîner la déplétion de la quantité de Ca^{2+} dans le réticulum, provoquant le stress et l'apoptose de la cellule via le facteur CHOP **(Zhong et al., 2012)**. De plus, l'activité des protéines chaperonnes présentes au niveau du RE est inhibée par le manque de calcium ce qui permet l'accumulation de protéines mal repliées ; renforçant encore une fois ces phénomènes de stress, d'inflammation, et d'apoptose **(Zhong et al., 2012)**

La richesse du genre *Cistus* en phénols et en flavonoïdes explique en grande partie l'effet anti-inflammatoire de leurs extraits. En fait, *Cistus salvifolius* contient des flavonoïdes aglycones (Kaempferol, quercétine, myricétine), des flavonoïdes glycosylés des stéroïdes aglycones (β -sitostérol) et des stéroïdes glycosylés **(Perihan et al., 2015)**. L'epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4B-8) -épigallocatechin et l'epigallocatechin-3-o-p-hydroxybenzoate-(4 B-6)-épigallocatechin-3-O-gallate isolés de l'extrait de *Cistus* inhibent fortement COX-2 et à un degré plus faible la COX-1 **(Qa'dan et al., 2011)**. Les phénols et les flavonoïdes sont d'après Schneider et Bucar (2005) de puissants inhibiteurs de la 12-LOX. Selon Kim et ses collaborateurs (2006), l'acide gallique et ses dérivés sont responsables de l'inhibition de l'activation du p38 MAPK, de l'inhibition de la fixation du NF- κ B, essentiels

pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6. En plus, les tanins ont la capacité d'inhiber la phospholipase A2, conduisant à l'inhibition des leucotriènes et des prostaglandines (Da Silva *et al.*, 2008 ; Chandra *et al.*, 2007 ; Glaser *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus dans ce test permettent d'affirmer aussi que l'activité anti inflammatoire des extraits des deux plantes est liée en grande partie à l'effet des extraits sur l'infiltration des cellules inflammatoires ainsi qu'à leurs médiateurs libérés dans le site inflammatoire. Pour cela, la migration cellulaire et la production de certains médiateurs clés de l'inflammation sont vérifiées dans la présente étude. Ces altérations peuvent être inversées dans les futures études en traitant les animaux diabétiques avec de l'insuline, une découverte qui renforce le rôle de l'insuline dans le contrôle de l'inflammation en fournissant un modèle utile de diabète de type 1 ou type 2 qui est caractérisé par une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline lorsque les rats vieillissent ou pendant la phase néonatale.

V.5. Teste de cicatrisation :

La cicatrisation est un processus complexe déclenché par l'organisme en réponse aux dommages et qui reconstitue la fonction des tissus endommagés. Dans la présente étude, les propriétés cicatrisantes de l'extrait aqueux des écorces de grenade ont été mises en évidence en utilisant le modèle de l'excision de la peau. Le diamètre de la contraction de la plaie est un paramètre souvent employé pour évaluer une cicatrisation (Suntar *et al.*, 2011).

Tableau 15 : Effet cicatrisant de l'extrait aqueux du *P. granatum* (les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=8)).

Zone des plaies (mm ²) et le pourcentage de contraction de la plaie							
Produit	Avant traitement	2 jours	3 jours	6 jours	9 jours	12 jours	15 jours
Témoin (Eau physiologique)	110,52 \pm 8,96	103,69 \pm 7,23 (6,04%)	98,41 \pm 2,88 (10,87%)	94,35 \pm 4,041 (14,50%)	77,70 \pm 2,08 (29,60%)	67,48 \pm 7,54 (38,97%)	46,67 \pm 2,88 (57,70%)
Mycocide $\text{\textcircled{R}}$ 0,25%	107,23 \pm 6,429	96,7 \pm 5,14 (9,90%)	88,06 \pm 6,83 (17,95%)	77,34 \pm 2,51 (27,95%)	42,4 \pm 3,83 (60,49%)	28,93 \pm 8,90 (73,04%)	17,433 \pm 4,33 (84,75%)

Ext AQ GRE 5%	117,86±8,3	106,7±8,26 (9,09%)	70±7,32 (40,43%)	53,3± 5,77 (54,54%)	26,68±1,54 (77,27%)	3,39±5,773 (97,15%)	0 (100%)
------------------	------------	-----------------------	---------------------	------------------------	------------------------	------------------------	-------------

Le traitement avec l'Ext aqueux de *P. granatum* a permis d'obtenir une guérison complète des plaies au bout de 15 jours de traitement. Les superficies des plaies mesurées aux jours 3, 6, 9, 12 et 15 après l'excision dans tous les groupes traités par les pommades préparées à base d'extrait de grenade ont été inférieures à celles du témoin (Tableau 15).

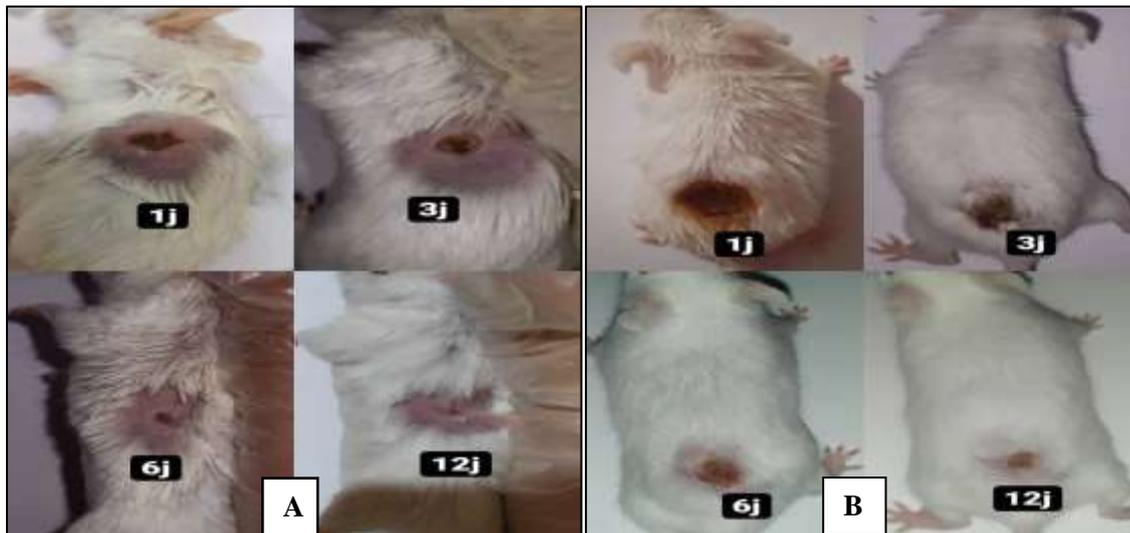


Figure 47 : Résultats souris traitée avec l'extrait aqueux de *P. granatum* (A)/souris traitée avec la Mycoside (B)

Le traitement avec l'Ext aq de *P. granatum* a permis d'obtenir une guérison complète des plaies au bout de 15 jours de traitement. Les superficies des plaies mesurées aux jours 3, 6, 9, 12 et 15 après l'excision dans tous les groupes traités par les pommades préparées à base d'extrait de grenade ont été inférieures à celles du témoin (Tableau 12).

L'application topique de l'extrait étudié a induit une diminution des diamètres des plaies. Il a montré un effet cicatrisant de plus de 50% au bout du 6eme jour (54,54%). Cet effet à un bon pouvoir cicatrisant, meilleur que celui de la Mycocide (27,95%). L'effet a été augmenté au 9^{ème} et 12^{ème} jour pour atteindre 70% et 90% respectivement. Au dernier jour (15^{ème} Jour), une cicatrisation complète a été obtenue avec l'extrait seulement et une réapparition des poils a été remarquée au niveau des cicatrices.

La cicatrisation est caractérisée par des modifications de la matrice extracellulaire dans laquelle interviennent la fibronectine, le fibrinogène et les intégrines (Suriyamoorthy et al., 2014). La reconstitution des tissus endommagés se résume en trois phases : une phase

inflammatoire (0-3 jours), une phase de prolifération (3-12 jours) et une phase de remodelage (3-6 mois) (Priya et al., 2002). Au cours de ces différentes phases, ce processus est régulé par les facteurs de croissance (PDGF, TGF et FGF) sécrétés par les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les plaquettes (Li et al., 2007).

L'effet cicatrisant de cet extrait peut être attribué à la présence de composés phénoliques, comme les flavonoïdes et les tannins ayant la capacité d'accélérer le processus de régénération tissulaire par stimulation de la production de collagène et de fibronectine (Suriyamoorthy et al., 2014)

Une étude réalisée par une équipe de chercheurs indiens, (Murthy et al., 2004), s'était penchée sur les effets d'extraits méthanoliques de la peau de grenades sur la cicatrisation de plaies cutanées chez des rats *Wistar*. Cette étude a montré que la peau de grenade contribue à la cicatrisation de blessures cutanées. Des examens plus complets, utilisant la technique de chromatographie liquide à haute performance, CLHP, ont montré que ces extraits de grenade, aux propriétés cicatrisantes, sont riches en catéchine et en acide gallique, des molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique.

La peau de grenade contribue également à la cicatrisation de blessures cutanées. Elle est riche en catéchine et en acide gallique, des molécules ayant des propriétés cicatrisantes qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Wald, 2009 ; Sitzia, 2009).

Chapitre IV : Business plan

La bouche n'est pas un milieu stérile. Des millions de microorganismes y résident, en suspension dans la salive ou au contact des dents et des muqueuses au sein du biofilm dentaire. Cette flore commensale assure la santé bucco - dentaire de son hôte. Les infections bucco - dentaires apparaissent en cas de détérioration de ce biofilm, laissant la possibilité de se développer à des microorganismes pathogènes. Les plus fréquentes pathologies, les caries, mettent en cause la prolifération de deux bactéries en présence de saccharose : *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus casei*. D'autre part, le développement de levures comme *Candida albicans*, est responsable de candidoses buccales (VASCONCELOS et al., 2006)

Si pour cela on a choisi de faire un projet à base des écorces de grenade, c'est un produit (une tisane) pour prévention et traitement efficace contre les candidoses buccales.

Biogrenadine

- C'est un petit projet avec un grand objectif.
- Tout d'abord, ce produit a été choisi comme point de départ uniquement pour introduire les produits de cette marque et les présenter sur le marché, tout en étudiant le succès du processus de ce produit dédié aux maladies des gencives. L'autre étape est de travailler à diversifier les produits et à les exporter vers l'extérieur.
- **Ce projet constitué de 3 matières : Alun, Thym, Grenade (écorce de grenade)**
- Les graines de grenade sont vendues à un magasin qui vend du jus frais, donc la moitié du prix de la grenade que nous achetons chaque mois sera remboursée (**Le bénéfice de cette indemnité n'a pas été calculé**)



Figure48 : Logo et Carte visite de la marque / forme du produit (**Original**)

1) Forme légale de l'entreprise

- L'entreprise sera : société de personnes en nom collectif ou SNC
- La raison du choix de cette forme d'entreprise est :
 - Les associés se connaissent et font confiance
 - Aucun capital minimum exigé
 - Consentement lors de la cession des parts

Tableau 16 : Forme légale de l'entreprise

Nom de l'Entreprise	BIOGRENADINE
Adresse de contact:biogrenadine@gmail.com	Téléphone : 0555575208
Type d'Entreprise : COSMITIQUEBIO	Statut légal : SNC
Fabricant les produits suivant	Les tisanes anti fongique spécifique aux maladies de la gencive
Propriétaires	-Atmani Rofaida -Ayaidia Besma -Chetioui Aya Serine
Qualifications et expériences (CV)	Master 2 en toxicologie et santé
Sources de capital initial : argent propre	Montant : 150 million
Clients	les Herboristes, les Médecins dentaires, les Pharmaciens

2) Idée d'entreprise

Tableau 17 : Idée d'entreprise

Nom de l'Entreprise	BIOGRENADINE
Type d'entreprise	Fabricant
L'entreprise va se charger de	Commercialiser les produits bio-cosmétiques et phytothérapeutique
Les compétences techniques proviendront de :	Des biologistes
Les clients seront	Toutes les personnes qui souffrent des aphtes, Les Herboristes, Les Médecins dentaires, Les Pharmaciens
L'entreprise va répondre aux besoins ci-après	les gens qui préfèrent le traitement par la médecine alternative, les personnes qui détestent

	prendre les médicaments
L'entreprise va commercialiser de la façon suivante	par des publicités sur réseau sociaux (en ligne) comme Instagram et Facebook
J'ai choisi cette idée d'entreprise parce que	sachant que le grenade a une grande activité antifongique, anti inflammatoire on a choisis de réaliser ce produit d'après la recette des grandes mères et nous améliorons cette réalisation avec autres bio aditifs pour augmenter la efficacité et la fiabilité de nos produits, diminuer l'utilisation des médicaments contre les maladies de la gencive sur tout pour les gens âgés et les personnes porteur les appareils dentaires

3) Etude du marché et segmentation

Tableau 18 : Etude du marché et segmentation

Segment de marché	Identification des clients potentiels	Besoins et préférences des clients	Analyse des concurrents
1	-Les personnes souffrant par des aphtes	les gens	les concurrents:
2	-les personnes âgées	préfère	les laboratoires
3	-les personnes porteuses les appareils dentaires	d'utiliser les	des médicaments
4	-les femmes enceintes, Allaitement, maternel	tisanes bio	les pharmacies
5	-les jeunes, les enfants		

4) Plan marketing (PRODUIT)

Tableau 19 : Plan marketing (PRODUIT)

Caractéristiques	Poudre fine
Qualité	supérieur
Couleur	vert orangé
Emballage	Sac en papier recyclable de 100 Gramme

4.1) Plan marketing, prix (TVA non comprise)

Tableau 20 : Plan marketing, prix

Les clients souhaitent payer	250 DA
Les prix pratiqués par les concurrents (ou	

politique de prix imposée) :	
Le plus élevé	400 DA
Le plus bas	310 DA
Ma proposition de prix	40 DA DE CHAQUES BOITE
Mon coût de revient	270 D
Mon prix définitif	300 DA
Raisons pour mon prix définitif	Les matières premières comme le grenade n'est pas disponible tout l'année (saisonnière)

4.2) Plan marketing (place, publicité)

Tableau 21 : Plan marketing (place, Publicité)

L'emplacement	Atelier
Les locaux sont	ma propriété
L'emplacement de l'entreprise peut être décrit de la façon ci-après	un garage qui a tous les moyens pour fabriquer mon produit
Cet emplacement est retenu pour les raisons suivantes	Cet emplacement est retenu pour les raisons suivantes : Pour éviter de louer ailleurs
Cet emplacement présente les avantages et inconvénients ci-après	les avantages sont: pas de paiement des frais de location, Propreté, je ne dérange pas les gens quand je le rentre (dans la nuit), je rentre dans l'atelier quand je veux
Les charges mensuelles de cet emplacement sont : Électricité et eau	Ces coûts comprennent : 1500DA/Mois
Méthode de distribution	Livraison
L'entreprise vendra directement aux	Les Détaillants, Les Individus
Ce type de distribution est retenu pour la raison	pour faciliter l'obtention de mon produit et apprendre à connaître le client et gagner sa confiance
Les charges mensuelles supplémentaires sont	Le prix de la livraison
Ces coûts comprennent	Dans la willaya de Constantine 100 Da Hors willaya: 500 DA

Je vais essayer d'influencer mon produit de la façon suivante : La publicité pour mon entreprise

Je vais assurer la promotion de mon entreprise de la façon suivante :

TYPE DE PUBLICITE	DETAILS	couts
En ligne	Cree mes propre pages sur facebook et instagram pour promouvoir et présenter mon produit	0 DA
L'affichage	Affichage sur des panneaux ou des emplacements prévus sur la voie publique ou aussi des insertions dans des magazines ou des journaux	10000/MOIS

Collaboration	Avec des personnes connu dans les réseaux sociaux, avec des médecins qui ont des cabinets dentaires	5000/4mois
Exposition	Exposer le produit dans les centres culturels et dans les célébrations nationales	10000/ 5J

4.3) Plan des ventes mensuelles (TVA NON COMPRISE)

Tableau 22 : Plan des ventes mensuelles

Mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Produit, Service ou gamme de Produits 1 : LA Tisane /boite													
Quantité	400	300	300	200	200	200	200	200	500	500	500	500	4000
Prix Unitaire	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	
Valeur des ventes	120000	90000	90000	60000	60000	60000	60000	60000	150000	150000	150000	150000	1200000

5.1) Organigramme

Tableau 23 : Organigramme

PERSONNEL	POSTE	TACHES ET RESPONSABILITES
1 Atmani roufaida	Gérante, Fabricante	responsable de l'atelier (BIOLOGISTE, fabricante, nettoyante)
2 Chetoui aya serine	Gérant, vendeuse	vendre, prendre les commandes, géré les pages Facebook et instagram de la marque (BIOLOGISTE, formation en marketing)
3 Ayaidia besma	Gérant, livreuse	livrer les commandes (BIOLOGISTE, délégué commercial, véhiculé)

5.2) Plan de production produit (TVA NON COMPRISE) Pour les fabricants

Tableau 24 : Plan de production produit pour les fabrications

Partie Pratique Chapitre IV : Business plan

Produit / Service 1 : BIOGRENADINE4

Mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	-------

Plan de production (basé sur le plan des ventes) en nombre d'articles produits ou fournis :

Quantité	400	300	300	200	200	200	200	200	500	500	500	500	4000
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Achat de matières premières (selon le plan de production) :

1 type de matière = Grenade (Ecorce) Quantité nécessaire par article = 40 gramme
 Prix unitaire =100 DA/kg

Quantité	40	30	30	20	20	20	20	20	50	50	50	50	400KG
Valeur	4000	3000	3000	2000	2000	2000	2000	2000	5000	5000	5000	5000	20000

2 type de matière = Alun Quantité nécessaire par article = 20 Gramme Prix unitaire = 600DA/kg

Quantité	8	6	6	4	4	4	4	4	10	10	10	10	76KG
Valeur	4800	3600	3600	2400	2400	2400	2400	2400	6000	6000	6000	6000	48000

3 type de matière = thym Quantité nécessaire par article = 40 gramme Prix unitaire =4000DA/kg

Quantité	20	15	15	10	10	10	10	10	25	25	25	25	200KG
Valeur	80000	60000	60000	40000	40000	40000	40000	40000	1000000	1000000	1000000	1000000	5120000

6.1) Investissements et amortissement (1ère ANNEE)

Tableau 25 : Investissements et amortissement

TYPE D'INVESTISSEMENT	SPECIFICATION	PRIX D'ACHAT	COÛTS D'ACHAT (TVA non comprise)	MONTANT TVA	AMORTISSEMENT* 1ère ANNEE
1- BALANCE	peser la matière première	6500	5395	1105	1300
2- TABLE EN BOIS	différents applications (fabrication, les	0	disponible déjà	0	0

	matériaux)				
3- BUREAU	différents applications informatiques	10000	8300	1700	2000
4- DESCHAISES(3)(PLASTIQUE)	afin de s'asseoir et de se reposer	650 da pour chaque une	1618,5	331,5	390
5- ROBOT MIXEUR	écraser la matière sec (poudre)	11500	9545	1955	2300
6- DES BOITES (9)	caler la matière sèche	350 DA pour chaque bt	2614,5	535,5	630
7- PC PORTABLE	prendre les commandes, organisation de la vente	0	disponible	0	0
8- TELEPHONE	prendre les commandes, livraison	0	disponible	0	0
9-DES CUILLETTES EN PLASTIQUE (4)	mélanger la matière sèche	70 DA pour la pièce	232,4	47,6	56
10- Emballage (4000pièce)	afin de protéger et vendre le produit final	5 DA pour chaque EM	16600	3400	4000
11- Etiquette (4000 pièce)	afin de définir le produit final	2 DA pour chaque Etq	6640	1360	1600

- Totaux pour l'année : 61380 DA
- Moyenne mensuelle d'amortissement pendant la première année : 12276 DA

6.2) Formulaire d'amortissement (TVA NON COMPRISE)

Tableau 26 : Formulaire d'amortissement

Article 1 : moto – scooters de livraison
Date d'achat : 1-10-2023

Coût d'achat : 10 million		
Années d'utilisation : 5 ans		
Amortissement annuel : $10/5=2M$		
Année	Cumule	Solde qui reste à amortir
1	2 M	$10-2=8M$
2-	2+2	$10-4=6M$
3-	2+2+2	$10-6=4M$
4-	2+2+2+2	$10-8=2 M$
5	2+2+2+2+2	$10-10=0$

- Totaux pour l'année + Motos=161380 DA
- Moyenne mensuelle d'amortissement pendant la première année + motos = 32276 DA

6.3) Différents couts de l'entreprise (TVA NON COMPRISE)

Tableau 27 : Différents couts de l'entreprise

Pour tous les Produits / Services / Gamme de produits	
Mois	Total
Différents coûts de l'entreprise (hormis coûts des matières premières, salaires, amortissement et capital)	
Matière première (charge variable)	580000
Eau et électricité (charge variable)	18000
Cout publicitaire (charge variable)	135000
Matériel (charge fixe)	61380
Amortissement (charge fixe)	32276
Assurance en cas d'accident de travail (charge fixe)	50000
Salaire (charge fixe)	30000
Total pour la 1^{ère} année	906656

6.4) Différents couts total de l'entreprise (TVA NON COMPRISE)

- Sources du capital de démarrage
- Fond immédiatement disponibles du propriétaire : 50M pour chaque propriétaire

$$D = 50 + 50 + 50 = 150 \text{ million}$$

Tableau 28 : Tous les différents couts de l'entreprise

Le coût global du projet = Charges fixes + Charges variables	
Charges constantes : Loyer, Assurance, Matériel, Salaires, Amortissements...).	580000 + 18000 + 135000 + 61380 + 32276
Charges variables (Matière première, Electricité, Frais de packaging et emballage, Frais de transport, Publicité,...).	+ 50000 + 30000 = 906656
Valeur des ventes = Quantité x Prix unitaire	4000 × 300 = 1200000
Valeur des achats (Matière première) = Quantité x Prix unitaire	20000 + 48000 + 512000 = 580000
Le coût de revient = Coût global du projet / Quantité de production annuel	906656 / 4000 = 226,664
Prix de vente = Coût de revient + Le bénéfice	226,664 + 40 = 270
Chiffre d'affaire = Prix de vente (Prix unitaire) X Quantités vendues (Prévisionnelle)	300 × 4000 = 1200000
Résultat net = Chiffre d'affaire - Les charges (le coût global du projet) Résultat net = (-) Perte (+) Bénéfice	1200000 - 906656 = 293344 (Bénéfice)

Conclusion

Et perspectives

Conclusion :

Les plantes médicinales sont une source importante de nouvelles substances ayant des effets thérapeutiques potentiels dépourvus d'effets secondaires. La recherche sur les plantes folkloriques avec des vertus médicinales présumées, telles que les analgésiques et les agents anti-inflammatoires et antidiabétiques, devrait donc être considérée comme une stratégie de recherche fructueuse et logique pour de nouveaux médicaments.

L'objectif de cette étude était de comparer et de caractériser les compositions polyphénoliques des deux extraits aqueux *cistus sp* et l'écorce de *P. granatum*, et d'évaluer ses activités anti-inflammatoires chez des rats diabétiques, ses activités analgésiques, antipyrétiques et cicatrisant in vivo et les activités anti-hémolytique, la dénaturation thermique des protéines et des activités antioxydants (DPPH, ABTS, CUPRAC, Pouvoir réducteur du fer et le test Phénanthroline) in vitro.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folinciocalteu a indiqué la présence des quantités importantes en polyphénols dans les extraits aqueux des deux plantes étudiées (*cistus sp* et de l'écorce de *P. granatum*). De façon similaire, nous avons mesuré les flavonoïdes à l'aide de la méthode AlCl₃, ce qui nous a menés à la conclusion que les deux plantes sont tout aussi riches en flavonoïdes.

La capacité antiradicalaire défini à l'aide de cinq tests (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC et le test Phénanthroline) a montré que les deux plantes étudiées présentent des excellent propriétés antioxydants.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro (Test de la dénaturation protéique, test d'hémolyse des globules rouges et test de la stabilisation membranaire) nous a démontré que les deux plantes présentent une bonne activité antiinflammatoire.

L'activité anti-inflammatoire a été déterminée in vivo à l'aide d'un œdème expérimental de la patte produit par l'administration de formol sur des rats normaux et des rats diabétiques, le diabète a été induit par injection intrapéritonéale avec streptozotocine (65 mg / kg). Les résultats de cette étude viennent confirmer le potentiel anti-inflammatoire des deux plants étudié sur les deux groupes des rats diabétiques et normaux.

Concernant les tests analgésique, antipyrétique et le test de cicatrisation nous avons également reçu des résultats positifs indiquant la possibilité des deux extraits pour traiter les cicatrise et ses efficacités analgésique et antipyrétique.

En résumé, l'utilisation de composés phénoliques et de flavonoïdes des plantes médicinales est le candidat potentiel d'agents bioactifs dans les secteurs pharmaceutique et médical pour promouvoir la santé humaine, prévenir et guérir diverses maladies. Afin de découvrir et de faire progresser ce choix alternatif d'utiliser des composés phytochimiques, l'étude des plantes médicinales ainsi que le profilage intense de la recherche doit être fait. Les composés ciblés devraient être utilisés dans la recherche biomédicale et pharmaceutique allant de l'étape d'essai in vitro, in vivo et clinique pour évaluer l'innocuité, l'efficacité et les effets secondaires du composé plante testé.

A la fin, le business plan est un document a été élaboré à l'aide des données collectés et analysés durant l'étude de marché.

Nous souhaitons à réaliser ce médicament (la tisane de la marque BIOGRENADINE), qui va être le premier en Algérie, en produisant un nouveau produit naturel et pur utilisé comme un point de départ de notre marque bio cosmétique, Nous espérons également étendre le projet avec le lancement d'une nouvelle pommade à cause de la réussi d'essai de réparation des plaies qui a complètement guéri en courte période.

Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de deux plantes médicinales *Punica granatum* et *Cistus sp*, chez les rats diabétiques**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en toxicologie****Résumé**

Le diabète est l'un des problèmes médicaux majeurs, qui peut endommager les cellules ou les organes de diverses parties du corps. L'objectif de ce travail vise à déterminer l'effet anti inflammatoire in vivo et in vitro des extraits aqueux en tant que molécules bioactives sur le diabète expérimental de type 1 de t induit par streptozotocine.

Premièrement, l'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin ciocalteu a montré que l'extrait aqueux de *Cistus sp* est plus riche en polyphénols ($101,73 \pm 6,62$ et $94,50 \pm 0,33$ EAG/g EXT respectivement) et en flavonoïdes ($45,08 \pm 1,13$ et $31,14 \pm 1,90$ mg EQUÉ/g EXT) que l'extrait aqueux de écorce de *P.gratanum*, ces valeurs sont de bons indices du potentiel thérapeutique des extraits, car beaucoup d'activités biologiques sont intimement liées à l'aspect quantitatif mais aussi qualitatif de ces biomolécules.

La deuxième étape consiste l'évaluation de l'activité d'antioxydant qui a été déterminé par la méthode du DPPH, le test du ABTS et la méthode de FRAP, CUPRAC et phenanthroline, selon les résultats on a confirmé que les deux extraits sont de forts piègeurs de radicaux libres et peuvent être considérés comme une bonne source d'antioxydants naturels à des fins médicinales.

La troisième étape consiste en l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine et le test de protection de la membrane du globule rouge vis-à-vis du stress osmotique et thermique. Cette étude a montré que l'extrait aqueux de *Cistus sp* possède une excellente capacité à protéger l'albumine contre la dénaturation thermique ($IC_{50} = 56,28 \pm 6,61 \mu\text{g/ml}$) par rapport à l'extrait aqueux des écorces de *p.granatum* ($IC_{50} = 16,31 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$). De même, l'analyse de la protection de la membrane du globule rouge vis-à-vis du stress osmotique et thermique a montré que l'efficacité de l'extrait aqueux de *Cistus sp* est supérieure à celle des écorces de *P.granatum* ($80,31 \pm 4,99$ contre $77,50 \pm 2,49$ %).

Ainsi, il s'agissait au cours de ce travail, d'évaluer les effets de l'extrait aqueux sur la cicatrisation, la douleur, la fièvre, et l'inflammation. L'application locale de la pommade de l'extrait des écorces de *P.granatum* a réduit la surface des plaies de 88%. Le traitement des souris par 100 mg/kg d'extrait aqueux des deux plantes inhibe (83%) la douleur induite par l'acide acétique. L'étude de l'activité anti-inflammatoire chez les rats sains et diabétiques a révélé une bonne activité anti-œdémateuse des deux plantes. Le prétraitement des rats non diabétiques par l'extrait aqueux de *Cistus sp* à la dose de 100mg/kg a provoqué un effet inhibiteur maximal de l'œdème de la patte (97,89%) 3 heures après l'administration du formol, ce résultat est meilleur que celui de l'autre extrait. Tant dit que chez les rats diabétiques le meilleur effet inhibiteur maximal a été marqué dans l'extrait de *P.granatum* à la même dose (70,61%) et a été enregistré à la troisième heure.

Ces résultats confirment la validité de l'indication traditionnelle des deux plantes dans le traitement de plusieurs maladies. Toutefois, de nouvelles études sont nécessaires afin d'identifier les molécules biologiquement actives pour donner avec précision le/les mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de ces effets.

Mots-clés : l'inflammation, *Cistus sp*, *Punica granatum*, diabète

Laboratoires de recherche :

- Génie Microbiologique et Applications.
- Laboratoire de centre de biotechnologie, Université Abdelhamid Mehri, Constantine2.
- Laboratoires pédagogiques du département de science de la nature et de la vie et au niveau de l'animalerie de Chaaba l'université de frères Mentouri Constantine 1.

Encadreur : Mr LAID BAHRI (MAA – à l'UFM Constantine 1).

Examinateur 1 : Mr MENED AHMED (Pr - à l'UFM Constantine 1).

Examinateur 2 : Mr BENREBAI MOUAD (MCA – à l'UFM Constantine 1).