

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire de domiciliation Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT EN 3^{ème} CYCLE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie. Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

AISSANI Fatine

Intitulée

**Caractérisation phytochimique, valorisation biologique et toxicologique
des différents extraits d'une espèce Algérienne *Sonchus oleraceus L.***

Soutenue le : 11/01/2022

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr BENOURETH Djamel Eddine	Prof	Univ. de Guelma	Président
Mme GRARA Nedjoud	Prof	Univ. de Guelma	Encadreur
Mr GHEID Abdelhak	Prof	Univ. de Souk ahras	Examinateur
Mme KHALDI Fadila	Prof	Univ. de Souk ahras	Examinatrice
Mme KHALLEF Messaouda	M.C.A	Univ. de Guelma	Examinatrice

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

بداية وقبل كل شيء، الحمد والشكر لله الذي أمدني بالإرادة والقوة لتحقيق هذا العمل المتواضع .

Ce travail a été réalisé dans plusieurs laboratoires de recherche et a nécessité la collaboration et l'implication de plusieurs personnes. Comme pour confirmer le proverbe africain qui dit « une seule main ne peut nouer un paquet ». Alors, je tiens à remercier toutes les mains qui, d'une manière ou d'une autre ont participé à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, Madame GRARA Nedjoud, Professeur de l'université de Guelma d'avoir accepté d'encadrer ce travail, ainsi que pour sa gentillesse, ses conseils constructifs, son dévouement, ses qualités humaines et sa disponibilité tout au long de ces années de travail. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer ma gratitude.

Ma reconnaissance va également aux membres du jury : Mr. Benouareth Djamel Eddine Professeur de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. J'adresse mes sincères remerciements à Madame Maître de conférence Khallelf Messaouda de l'Université 8 Mai 1945, pour l'attention qu'elle a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger. Je remercie aussi les examinateurs de ce travail, Monsieur le Professeur Gheid Abdelhak et Madame la Professeure Khaldi Fadila de l'Université de Souk Ahras pour avoir accepté d'évaluer les travaux et de faire partie de mon jury. Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissante et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

Je veux exprimer mes vifs remerciements au directeur de laboratoire de Biochimie de 'Crbt' Dr. Bensouici Chawki et aux techniciens du laboratoire d'Histologie de « Crbt » pour leurs aides précieuses dans la réalisation des coupes histologiques.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Pr. Teh Lay Kek de l'UNIVERSITI TEKNOLOGI MARA (UiTM), Malaisie, pour m'avoir guidé pendant tous le stage pratique ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils.

Pour ces encouragements et surtout pour la grande patience qu'il a manifesté, je me trouve incapable de formuler mes remerciements à Dr. Md Idris Muhd Hanis, Docteur de l'université Teknologi Mara de Malaisie. Aujourd'hui je témoigne que je vous suis redevable et je vous remercie par l'occasion, pour avoir bien voulu examiner mon travail.

Ma gratitude va également à tous les membres de l'équipe de recherche de l'institut 'iPROMISE', Département de Pharmacie, Université TEKNOLOGI MARA (UiTM), Malaisie. Je tiens aussi à remercier tout spécialement Ms. Dyana pour les analyses LC-MS/QTOF.

Je tiens vivement à remercier Prof. Stefania Marzocco et Prof. Nunziatina De Tommasi, de l'Université de Salerno-Italie, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, de la confiance

*qu'elles m'ont accordé et aussi pour leurs encadrements exemplaires, leurs sympathies, leurs rigueurs scientifiques, leurs conseils et leurs encouragements.
Leurs grande expérience en recherche et en enseignement m'ont été et me seront profitables.*

Je remercie également les doctorantes Valentina Parisi et Maria Laura Bellone du laboratoire 'Molecole Naturali Bioattive' de m'avoir permis de faire les expériences d'extraction et séparation des molécules bioactives, ainsi qu'à la pharmacienne Giorgia pour m'avoir montré la technique de la culture cellulaire dans le laboratoire de 'Farmacologia Sperimentale'. Cela m'a permis de travailler avec des instruments analytiques de pointe et du matériel de première qualité. Cette expérience sera inoubliable. J'ai apprécié leurs dynamismes, générosités, enthousiasme communicatif, ainsi que leurs aides pendant mon séjour à Salerno.

Je voudrais exprimer un infini merci à mon frère Farouq pour la dissection des souris et pour sa présence à mes côtés et son soutien.

A Marwa avec qui j'ai travaillée pendant 5 ans. Merci pour ton aide, tes bons conseils, tes encouragements, ton soutien, ton amitié et pour tous les moments que nous avons partagés lors des stages au Cibt et en Italie.

J'exprime toute ma gratitude à tous mes amies et collègues pour leurs accueils, leurs aides précieuses, leurs compréhensions, leurs encouragements et leurs sympathies tout au long de mon travail.

Je remercie toutes les personnes que j'ai oubliées dans cette liste.

MERCI à tous, je vous souhaite le meilleur sur tous les plans !

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

Mes Parents ;

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de la dignité, de l'honneur et de l'humilité.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réaliser aujourd'hui l'un de vos rêves.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu le tout-puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants. Je vous aime.

Mes chers frères, sœur et leurs progénitures, pour leur grand amour et leur soutien. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

Toute ma famille.

Ma confidente : HAMDI Hesna,

Conserve-moi ta profonde amitié et ton immense amour et sois convaincue qu'il en est de même pour moi. La fraternité n'est pas seulement héréditaire : tu m'as toujours soutenu. Un simple merci ne suffira jamais à te témoigner ma reconnaissance.

Mes amies et mes collègues de travail : Marwa, Wissal, Leila, Hanane, Wissem, Djamila et Karima qui n'ont cessé à aucun moment de m'apporter aide et encouragement pour achever ce travail, vous partagerez toujours une partie de ma vie et de mon cœur. Que Dieu vous accorde le plein bonheur que vous méritez.

Vous qui avez toujours cru en moi et su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Acceptez ce travail comme le témoignage de mon profond amour et mon attachement indéfectible.

Fatine

Liste des figures

Figure 1. Structure d'acides hydroxybenzoïques communs.	17
Figure 2. Structure des principaux acides hydroxycinnamiques communs.....	18
Figure 3. Squelette de base des flavonoïdes.....	19
Figure 4. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	34
Figure 5. Photos de <i>Sonchus oleraceus</i> L. (Photos. Aissani F., Janvier 2018 ; Lieu : Boumahra Ahmed-Guelma, Est Algérie).....	46
Figure 6. Protocole d'extraction par macération du <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	47
Figure 7. Réaction d'inhibition du radical DPPH• avec un phénol.....	55
Figure 8. Structure chimique de galvinoxyle.....	57
Figure 9. Illustration schématique de la voie de réaction menant à la détection de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les antioxydants.....	61
Figure 10. Schéma de la transformation du bromure de 3(4,5dimethylthiazol-2yl)2,5 diphenyl tetrazolium (MTT) en formazan par les cellules métaboliquement actives.....	76
Figure 11. Teneurs des polyphénols totaux dans les différents extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	84
Figure 12. Teneur en flavonoïdes et flavonols totaux dans les différents extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	85
Figure 13. Cinétique d'activité anti-radicalaire des extraits de <i>S.oleraceus</i> L. sur le radical DPPH.....	91
Figure 14. Courbe représentant l'activité anti-radicalaire galvinoxyle des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	94
Figure 15. Courbe représentant l'activité anti-radicalaire ABTS ^{•+} des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	95
Figure 16. Activité d'inhibition de la décoloration du β-carotène en présence des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	96
Figure 17. Activité de chélation des ions ferreux des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L. et d'EDTA.....	97
Figure 18. Activité phénanthroline des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	98
Figure 19. Activité de réduction cuprique des extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L. comparés avec les standards.....	99
Figure 20. Activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.....	106
Figure 21. Effet des différents extraits de <i>Sonchus oleraceus</i> L. et le Diclofénac sodique sur l'inhibition de la dénaturation des protéines.....	112
Figure 22. Activité inhibitrice de l'ACHé des différents extraits de la partie aérienne de <i>S. oleraceus</i> L.....	117
Figure 23. Activité photoprotectrice 'FPS' de <i>Sonchus oleraceus</i> L. à différents longueurs d'onde λ.....	120
Figure 24. Variations du poids corporel (g) des souris témoins et traitées oralement dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut EBr.....	126
Figure 25. Variations du poids corporel (g) des souris témoins et traitées oralement dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait acétate d'éthyle EAe.....	127
Figure 26. Taux sérique de « créatinine » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c d'extrait brut EBr et d'acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus</i> L.....	129

Figure 27. Taux sérique de « glucose, l'urée et l'acide urique » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c d'extrait brut EBr et d'acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	130
Figure 28. Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	131
Figure 29. Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	131
Figure 30. Taux sérique de « protéines totales » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	132
Figure 31. Taux sérique de « triglycéride, cholestérol, HDL et LDL » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	133
Figure 32. Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins et traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	142
Figure 33. Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus rénales des souris témoins traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	143
Figure 34. Photomicrographies sélectionnées des tissus pulmonaires des poumons des souris témoins traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	143
Figure 35. Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de <i>Sonchus oleraceus L.</i> dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	145
Figure 36. Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus rénales des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de <i>Sonchus oleraceus L.</i> dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	146
Figure 37. Photomicrographies sélectionnées des tissus pulmonaires des poumons des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de <i>Sonchus oleraceus L.</i> dans les conditions de la toxicité subaiguë.....	147

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification systématique de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	10
Tableau 2. Quelques métabolites isolés de différentes espèces du genre <i>Sonchus.</i>	11
Tableau 3. Les activités biologiques du genre <i>Sonchus.</i>	13
Tableau 4. Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	67
Tableau 5. Calcul de la SPF par l'application de l'équation mathématique de Mansur...	67
Tableau 6. Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la Recommandation de la Commission Européenne 2006.....	68
Tableau 7. Rendement d'extraction (%) de <i>S.oleraceus L.</i> par différents solvants.....	79
Tableau 8. Profils phytochimiques des différents extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	81
Tableau 9. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux des différents extraits des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	83
Tableau 10. Activité anti-oxydante des extraits de <i>S.oleraceus L.</i>	93
Tableau 11. Résistance et sensibilité des germes isolés aux antibiotiques.....	105
Tableau 12. Diamètre d'inhibition des extraits de la plante <i>S.oleraceus L.</i> sur les différentes souches bactériennes.....	106
Tableau 13. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à différentes concentrations des extraits de <i>Sonchus oleraceus L.</i> et de Diclofénac sodique.....	112
Tableau 14. toxicité aigüe des extraits brut 'EBr' et acétate d'éthyle 'EAe'.....	124
Tableau 15. Evolution du poids corporel des souris traitées par l'extrait brut EBr en g.....	125
Tableau 16. Evolution du poids corporel des souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle EAe en g (*)......	126
Tableau 17. Effet de l'extrait brut EBr de <i>Sonchus oleraceus L.</i> sur le poids relatif des organes chez les souris témoins et traitées dans les conditions de toxicité subaigüe.....	128
Tableau 18. Effet de l'extrait acétate d'éthyle EAe de <i>Sonchus oleraceus L.</i> sur le poids relatif des organes chez les souris témoins et traitées dans les conditions de toxicité subaigüe.....	128
Tableau 19. Valeurs des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut EBr des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	134
Tableau 20. Valeurs des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	135
Tableau 21. Valeurs des paramètres hématologiques de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut de <i>S.oleraceus L.</i> des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	138
Tableau 22. Valeurs des paramètres hématologiques de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait acétate d'éthyle de <i>S.oleraceus L.</i> des parties aériennes de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	139
Tableau 23. CI ₅₀ de l'activité antiproliférative <i>in vitro</i> de divers extraits de <i>S.oleraceus L.</i> contre les macrophages J774.A1.....	156

Liste des abréviations

ABTS^{•+}	Acide 2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonique)
AChE	Acétylcholinestérase
ACI	Iodure d'acétylthiocholine
ALAT	Alanine aminotransférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATC	Acétylthiocholine
BChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CAA	Cellular antioxidant activity
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity assay
DL₅₀	Dose létale 50
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH[•]	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
DSTA	Démence sénile du type Alzheimer
DTNB	5,5'dithiobisnitrobenzoate
DW	Dry weight
EAD	Extrait aqueux décocté
EAc	Extrait acétate d'éthyle
EAM	Extrait aqueux macéré
EAT	Extrait alcaloïde total
EBr	Extrait brut
EBu	Extrait butanolique
ECh	Extrait chloroformique
EDTA	Éthylène-diamine-tétra-acétique
EE	Extrait éthanolique
EPa	Extrait phase aqueuse
ERO	Espèces réactives d'oxygène
ESI	Electrospray ionization source
FCS	Foetal calf serum
FDA	Food and drug administration
FPS	Facteur de protection solaire
HDL	High density lipoprotein
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRSA	Hydroxyl radical scavenging activity
IFN-γ	Interféron gamma
IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8	Interleukine

MA	Maladie d'Alzheimer
MTT	Bromure de 3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NF-Kβ	Nuclear factor-kappa B
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Oxyde nitrique
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORAC	Oxygen radical absorption capacity
PAL	Phosphatase alcaline
PGE2	Prostaglandine E2
QTOF-MS	Quadripole time-of-flight-mass spectrometry
SO	<i>Sonchus oleraceus L.</i>
SPF	Sun protection factor
STLs	Sesquiterpènes lactones
TBHQ	Tétrabutylhydroquinone
TC	Tannin catéchique
TG	Tannin gallique
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TFIT	Teneur en flavonols totaux
TFT	Teneur en flavonoïdes totaux
TGO	Glutamate oxalo-acétate transaminase
TGP	Glutamate-pyruvate-transaminase
TNF-α	Facteurs de nécrose tumorale
TPT	Teneurs en Polyphénols totaux
TR	Temps de rétention

Table des matières

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	iv
Liste des abréviations.....	vi
Introduction général.....	1

Partie I. Revue bibliographique

Chapitre I. Aperçu bibliographique sur la famille des *Astéraceae* et sur l'espèce *Sonchus oleraceus L.*

I.1. Présentation des Astéraceae : morphologie, date d'introduction et distribution.....	4
I.1.1. Introduction.....	4
I.1.2. Description botanique des Astéraceae.....	5
I.1.3. Principaux métabolites secondaires de la famille des Astéraceae.....	6
I.1.3.1. Introduction.....	6
I.1.3.2. Principaux métabolites secondaires des Astéraceae.....	6
I.1.3.3. Les lactones sesquiterpéniques.....	7
➤ Structure.....	7
➤ Intérêt thérapeutique des lactones sesquiterpéniques.....	8
II. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Sonchus</i>	9
II.1. Généralités.....	9
II.2. Description de la plante.....	9
II.3. Classification botanique.....	10
II.4. Usage ethnobotanique.....	11
II.5. Travaux antérieurs sur le genre <i>Sonchus</i>	11
II.5.1. Constituants chimiques.....	11
II.6. Activités biologiques.....	13

Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques

I. Définition	16
I.1. Structure et catégories des composés phénoliques.....	16
I.2. Classification.....	16
I.2.1. Acides phénols (acides phénoliques)	17
A. Acide hydroxybenzoïques.....	17
B. Acide hydroxycinnamiques.....	17
I.2.2. Rôles et propriétés thérapeutiques des acides phénoliques.....	18
➤ Chez les plantes.....	19
➤ Chez les humains.....	19
I.3. les Flavonoïdes.....	19

I.3.1. Structure.....	19
I.3.2. Classification des flavonoïdes.....	20
I.3.3. Propriétés des flavonoïdes.....	20

Chapitre III : Généralités sur les activités pharmaco-toxicologiques de la plante.

Introduction.....	21
I . Méthodes d'analyse des extraits de plantes.....	21
I.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	22
II. Activités biologiques des extraits de plantes.....	23
II.1. Activité antioxydante.....	23
II.1.1. Introduction.....	23
II.1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques.....	24
II.1.3. Dommages oxydatifs des radicaux libres.....	25
II.1.4. Antioxydants.....	25
a. Modes d'action des antioxydants.....	26
b. Différentes localisations cellulaires des antioxydants.....	27
c. Origines des antioxydants.....	27
II.1.5. Moyens de défense contre les radicaux libres.....	27
II.1.6. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante.....	28
II.2. Effet antimicrobien.....	29
II.2.1. Mécanisme de l'effet antimicrobien.....	30
II.3. Activité anti-inflammatoire.....	30
II.3.1. L'inflammation.....	30
II.3.2. Les anti-inflammatoires.....	31
II.3.3. Méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire.....	31
II.3.3.1. Dénaturation protéique	31
II.4. Activité anti-cholinestérasique (anti-Alzheimer)	32
II.4.1. Histoire.....	32
II.4.2. Définition.....	32
II.4.3. Les traitements pharmacologiques.....	32
A. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	33
II.4.4. Les méthodes de détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	34
II.4.4.1. Mesure de l'activité anticholinestérase.....	34
II.5. Activité photoprotectrice ou dermatoprotectrice (détermination <i>in vitro</i> du facteur de protection solaire « FPS »)	35
II.5.1. Définition de la peau.....	35
II.5.2. Facteur de protection solaire (FPS)	36
II.5.2.1. Les méthodes de mesure de l'activité dermatoprotectrice (photoprotectrice).....	37
III. Généralités sur la toxicité.....	38
III.1. Introduction.....	38

III.1.2. Evaluation des effets toxiques.....	38
a. La toxicité aiguë.....	39
b. La toxicité subaiguë et chronique.....	40
III.2. Activité antiproliférative des substances naturelles.....	41

Partie II : Matériel et Méthodes
Chapitre 1 : Caractérisation phytochimique

I.1. Critères de sélection du matériel végétal.....	44
I.1.2. Utilisations traditionnelles du matériel végétal.....	44
I.1.3. Travaux scientifiques	45
I.2. Matériel végétal.....	45
I.2.1. Méthode d'extraction.....	46
I.2.1.1. Extraction à froid ou macération.....	46
I.2.1.2. Extraction à chaud.....	47
I.2.1.3. Extraction des alcaloïdes totaux.....	48
I.2.2. Rendement d'extraction.....	48
I.3. Criblage phytochimique.....	48
I.4. Quantification des polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux.....	51
I.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	51
I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	52
I.4.3. Dosage des flavonols totaux.....	52
I.5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire par ionisation par électrospray (HPLC–ESI–QTOF–MS)	53

Chapitre II : Méthodes expérimentales des activités biologiques

I. Test biologiques.....	55
I.1. Activités antioxydantes.....	55
I.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle).....	55
I.1.2. Test de piégeage des radicaux libres Galvinoxyles.....	56
I.1.2.1. Principe.....	56
I.1.2.2. Mode opératoire.....	57
I.1.3. Test de décoloration du radical ABTS ^{•+} (Acide 2,2-azino-bis-3-(éthylBenzo Thiazoline-6-Sulfonique)	57
I.1.4. Test de blanchiment du β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	58
I.1.4.1. Principe.....	58
I.1.4.2. Mode opératoire.....	58
I.1.5. Activité chélatrice des ions ferreux.....	59

I.1.6. Piégeage des radicaux hydroxyles par le test d'oxydation de la phénanthroline-Fe (II)	60
I.1.6.1. Principe.....	60
I.1.6.2. Mode opératoire.....	61
I.1.7. La réduction cuprique (CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity assay).....	62
I.2. Activité antibactérienne.....	63
I.2.1. L'aromatogramme.....	63
a. Repiquage des espèces bactériennes et préparation de l'inoculum.....	63
b. Préparation des extraits et imprégnation des disques.....	63
c. Incubation et Lecture du résultat.....	64
I.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in-vitro</i>	64
I.3.1. Méthodes d'anti-dénaturation de l'albumine (dénaturation du BSA).....	64
I.3.1.1. Principe.....	64
I.3.1.2. Mode opératoire.....	64
I.4. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase.....	65
I.5. Activité photoprotectrice (détermination <i>in vitro</i> du facteur de protection solaire FPS ou sun protection factor 'SPF')	66
I.5.1. Principe.....	66
I.6. Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait brut et acétate d'éthyle de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	68
I.6.1. Toxicité aiguë.....	68
I.6.1.2. Matériel animal.....	68
I.6.1.3. Détermination de la (DL ₅₀) de l'extrait brut et acétate d'éthyle de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	69
I.6.1.4. Préparation des solutions à base d'extrait brut et d'extrait acétate d'éthyle...	69
I.6.1.5. Méthode d'étude.....	69
I.6.2. Evaluation <i>in vivo</i> de la toxicité subaiguë.....	70
I.6.2.1. Principe de l'essai.....	70
I.6.2.2. Mode opératoire.....	71
A. Répartition des souris en lots.....	71
B. Administration de l'extrait.....	71
C. Étude observationnelle.....	71
D. Etude de l'évolution pondérale des souris.....	72
I.6.2.3. Sacrifice des animaux et observation macroscopique.....	72
A. Poids des organes.....	72
I.6.2.4. Préparation du plasma et analyse biochimique.....	73
A. Dosage des paramètres biochimiques sériques.....	73
B. Dosage des paramètres hématologiques.....	73
I.6.2.5. Etude histopathologique.....	73
A. Préparation des blocs et fixation des pièces.....	73
B. Enrobage et confection des coupes.....	74
C. Coloration et montage des lames.....	74

D. Observation microscopique.....	75
I.7. Evaluation de l'activité antiproliférative.....	75
I.7.1. Test au MTT.....	75
I.7.2. Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées.....	76
I.7.3. Test antiprolifératif de MTT.....	76
I.8. Analyse statistique.....	77

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I : Etudes phytochimiques de l'espèce *Sonchus oleraceus L.*

I.1. Rendement de l'extraction par différents solvants.....	79
I.2. Profils phytochimiques qualitatifs des extraits de <i>S.oleraceus L.</i>	80
I.3. Dosage des composés phénoliques totaux.....	82
I.4. Dosage des Flavonoïdes et flavonols totaux.....	84
I.5. Investigation phytochimique des différents extraits de la partie aérienne de <i>Sonchus oleraceus L.</i> par LC/MS-QTOF.	87
I.5.1. Démarche d'identification des composés des extraits.....	88
I.5.2. Discussion.....	88

Chapitre II : Activités biologiques.

II. Test d'activité antioxydante in vitro des extraits de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	91
II.1. Test d'activité anti-radicalaire DPPH• (2.2-diphényle-1-picrylhydrazyle).....	91
II.2. Test d'activité anti-radicalaire galvinoxyle.....	93
II.3. Test de décoloration du radical cation ABTS ^{•+}	94
II.4. Test de blanchiment de β-carotène/acide linoléique.....	95
II.5. Test de chélation des ions ferreux (méthode de Férène)	96
II.6. Test de l'activité phénanthroline.....	98
II.7. La réduction cuprique.....	99
II.8. Discussion.....	100
III.1. Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de plante.....	106
III.2. Discussion.....	108
IV. Activité anti-inflammatoire <i>in-vitro</i>	112
IV.1. Effet anti-thermo dénaturant protéique des extraits de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	112
IV.2. Discussion.....	113
V. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase.....	116
V.1. Discussion.....	117
VI. Activité photoprotectrice.....	120
VI.1. Discussion.....	120

Chapitre III : Etudes toxicologiques de *Sonchus oleraceus L.*

VII. Toxicité aiguë <i>in vivo</i> des extraits de <i>Sonchus oleraceus L.</i>	124
VII.1. Détermination de la dose létale DL ₅₀ des extraits brut et acétate d'éthyle.....	124
VII.1.2. Autopsie générale.....	125
VII.2. Toxicité subaiguë.....	125
VII.2.1. Observations comportementales et modèles de mortalité.....	125
VII.2.2. Détermination de l'évolution de la masse des animaux et des organes.....	125
VII.2.2.1. Effets des extraits de <i>S.oleraceus</i> sur le poids corporel et le poids relatif.....	125
A. Effets des extraits sur le poids corporel de souris.....	125
VII.2.2.2. Effets des extraits de <i>S.oleraceus L.</i> sur le poids relatif des différents organes dans les conditions de la toxicité subaiguë.	127
A. Effet sur le poids relatif des organes.....	127
VII.2.3.1. Evaluation de l'action des extraits sur les marqueurs biochimiques (fonction rénal et hépatique) des organes.....	128
❖ Paramètres biochimiques.....	128
A. La fonction rénale.....	129
B. La fonction hépatique.....	130
VII.2.3.2. Evaluation de l'action des extraits bruts EBr et acétate d'éthyle EAe sur les paramètres hématologiques.....	136
A. Effets de l'EBr et l'EAe sur les paramètres de la lignée érythrocytaire (globules rouges, hémoglobine, hématocrite, MCV, MCH, CCMH).....	136
B. Effets de l'EBr et l'EAe sur les paramètres de la lignée leucocytaire (globules blancs, neutrophiles, lymphocytes, éosinophiles, basophiles, et monocytes).....	137
C. Effets de l'EBr et de l'EAe sur les plaquettes sanguines.....	137
VII.2.4. Analyse histopathologique.....	140
VII.2.5. Discussion.....	147
VIII. Activité antiproliférative.....	156
VIII. 1. Discussion.....	157
Conclusion générale.....	160
Références bibliographiques.....	163
Annexes.....	190

ملخص

Abstract

Résumé

Sur les 500 000 espèces végétales recensées à la surface du globe, seule la moitié est répertoriée par les botanistes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a identifié 22 000 plantes utilisées par la médecine traditionnelle. Seules 3 000 d'entre elles ont fait l'objet d'évaluations scientifiques (**Lehmann, 2013**). Selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle (**Hostettman et al., 1998**). L'étude ethnobotanique présente un intérêt incontestable pour la découverte de nouvelles plantes, qui demeurent une source importante de médicaments, soit parce que les composés qu'ils renferment sont de précieux principes actifs, soit parce que les chimistes sont parvenus à modifier la structure de certains de ces principes, afin de les rendre moins toxiques, plus efficaces, ou de leur conférer une meilleure biodisponibilité. L'usage de substances d'origine végétale pour la prévention ou le traitement de diverses affections chez l'homme a cours depuis des millénaires. Le spectre d'utilisation des substances d'origine végétale intéresse un grand nombre de maladies chez l'homme. A titre d'exemple, nous citerons des anticancéreux (vinblastine, taxol...), des antipaludéens (quinine, artémisinine...), des cardio-stimulants (digitaline), des psychostimulants (caféine, théophylline), des antalgiques (aspirine, morphine extraite de l'opium, codéine...), des anesthésiques (alcaloïdes à noyau tropane dont la cocaïne) et des immunosuppresseurs (cyclosporine...), etc... (**Newman & Cragg, 2012**).

A l'heure actuelle, 25% des médicaments prescrits à travers le monde ont une origine végétale et s'appuient sur environ 121 principes actifs (**Sahoo et al., 2010**).

Dans les pays émergents, entre 70 et 95% de la population dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins primaires (**Ito et al., 2012**), en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne mais aussi parce que les plantes présentent une réelle efficacité. Pour les tradipraticiens africains, les plantes médicinales sont une source inépuisable pour traiter certaines pathologies, qui souvent, sont mortelles. Ces éléments témoignent du fait que l'utilisation des plantes fait partie intégrante des traditions et que la valorisation médicinale de ces pratiques présente un réel intérêt.

La médecine traditionnelle africaine est l'un des systèmes de santé les plus anciens et les plus diversifiés (**Mothibe & Sibanda, 2019**). Pendant des siècles, la population de l'Afrique a exploité la biodiversité végétale unique et riche pour ses besoins de santé. La biodiversité végétale africaine, associée aux connaissances ethnobotaniques africaines profondément enracinées, a donné naissance à plusieurs nouveaux composés biologiques actifs qui sont

maintenant des composants des médicaments modernes. Par conséquent, avec le grand intérêt pour les médicaments dérivés des plantes, l'Afrique reste une ressource prometteuse pour la récupération de nouvelles entités chimiques qui peuvent être exploitées pour le développement ultérieur de nouveaux médicaments (Nafiu *et al.*, 2017).

Par la richesse et la diversité originelle de sa flore, l'Algérie constitue un véritable réservoir phytogénétique avec environ 3150 espèces de plantes vasculaires avec un taux d'endémisme à 10% environ du nombre total des espèces (Greuter *et al.*, 1991). Cependant, ce potentiel floristique reste très peu exploré d'un point de vue phytochimique et biologique.

De ces nombreuses plantes médicinales, notre étude s'est portée essentiellement sur l'espèce *Sonchus oleraceus* L. connue sous le nom de « laitron maraîcher » et son nom vernaculaire en Algérie est "Tilfaf". Cette plante de la famille des Astéraceae, est cosmopolite, originaire d'Afrique du Nord et d'Europe (Vieira & Barreto, 2006), ses feuilles sont comestibles et fréquemment consommé dans les pays méditerranéens (Guil-Guerrero *et al.*, 1998). Le choix de cette plante repose sur des enquêtes ethnobotaniques menées dans la région d'Est Algérien sur les plantes à activité hépatoprotectrice. Ils ont rapporté son utilisation dans la médecine traditionnelle et dans le traitement du dysfonctionnement du système nerveux central et les troubles mentaux (Lane *et al.*, 2006). Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels et la compréhension de leur mécanisme d'action, constituent un enjeu passionnant qui pourrait enrichir l'arsenal pharmacologique par la fabrication des médicaments.

Les effets secondaires graves de certains médicaments autorisés qui sont utilisés pour traiter différentes maladies ont intrigué les chercheurs à explorer des produits naturels bioactifs alternatifs plus sûrs (Saleem *et al.*, 2016). En outre, de nombreuses études ont montré de fortes implications du stress oxydatif dans le développement de nombreuses maladies comme la maladie d'Alzheimer, maladie inflammatoire, les infections virales, les pathologies auto-immunes, l'élasticité de la peau, les altérations des fibres élastiques et diverses maladies cardiovasculaires. De plus, les oxydants tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les neutrophiles et les macrophages activés joueraient un rôle important dans la pathogenèse de diverses maladies liées à la douleur, notamment les troubles neurodégénératifs, le cancer et l'athérosclérose (Elmi *et al.*, 2018). Certains des médicaments approuvés à des fins thérapeutiques présentent une hépatotoxicité ; par conséquent, la recherche de nouveaux médicaments semble nécessaire et bénéfique. Dans ce contexte, de nombreux scientifiques

s'intéressent aux plantes médicinales en tant que sources naturelles à activités biologiques avec peu d'effets secondaires (**Rinnerthaler et al., 2015**).

Plusieurs critères ont guidés notre choix, parmi lesquels :

Le but de notre travail s'inscrit donc dans le cadre de la continuation des recherches dans ce domaine en essayant d'identifier les molécules bioactives contenus dans *Sonchus oleraceus L.* poussant en Algérie et d'évaluer leurs activités biologiques. D'autre part, cette espèce Algérienne n'as pas été étudiée auparavant tant au niveau de sa toxicité, qu'au niveau de ses diverses propriétés pharmacologiques (anti-cholinestérasique et dermatoprotecteur). Notre présent travail s'articule sur l'utilisation de différentes méthodes d'extraction avec des solvants de polarités différentes pour l'isolement des métabolites secondaires, suivie de l'identification des composés majoritaires dans un mélange complexe de produits et enfin la détermination de leur potentiel biologique et toxicologique.

Notre travail décrit dans ce manuscrit est divisé en trois parties :

✓ Dans la première partie, nous présenterons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Astéraceae et sur le genre *Sonchus*. Nous aborderons largement les métabolites secondaires qui sont les principaux constituants de la famille d'Astéraceae et du genre. On donne également un aperçu général sur les activités pharmacologiques et l'effet toxicologique.

✓ La deuxième partie sera consacrée au matériel utilisé et au travail personnel qui commencera par un screening phytochimique de l'espèce étudiée *Sonchus oleraceus L.*, la suite de l'étude consistera à l'identification des composés obtenus. Nous présenterons également les protocoles suivis de l'évaluation biologique expérimentées (activités antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-cholinestérasique, dermatoprotecteur, antiproliférative) et toxicologique (toxicité aigüe et subaiguë) des différents extraits de l'espèce.

✓ L'interprétation des résultats au regard de la littérature et la détermination structurale des composés identifiés seront détaillés dans la troisième partie.

À la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Capitre I

Aperçu bibliographique sur la
famille des Astéraceae et sur
l'espèce *Sonchus oleraceus*

I.1. Présentation des Astéraceae : morphologie et distribution

I.1.1. Introduction

Les Astéraceae ou Compositae constituent une famille extrêmement vaste et répandue de plantes à fleurs avec plus de 25,000 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres actuellement acceptées, réparties sur 1620 genres et 13 sous-familles répandues sur toute la planète (**Kuete et al., 2017**).

Les composées sont relativement moins abondantes dans l'ancien continent que dans l'Amérique du Nord où elles forment environ un huitième de la flore vasculaire (**Moreau, 1960**). Elles sont probablement apparues à la fin du Cétacé ou au début de l'Eocène, et le point d'origine paraît être la région andine de l'Amérique du Sud où elles constituent aujourd'hui un quart de la flore vasculaire (**Moreau, 1960**).

Les traits saillants de la distribution géographique de cette immense famille ont une grande portée biologique. Les tribus des Astérées et des séneçonées sont toutes cosmopolites ou à peu près. Les Cichoriées, les Cynarées et les Anthémidées appartiennent surtout à l'hémisphère nord. Les Calendulées et les Arctotidées sont africaines. Les Vernoniées, les Eupatoriées, les Hélianthées, les Hélieniées et les Mutisiées sont essentiellement américaines. La grande tribu des Inulées appartient surtout à l'ancien monde. Les espèces extra-tropicales communes aux deux hémisphères ne sont guère plus d'une quarantaine (**Moreau, 1960**).

L'Afrique, l'Australie et l'Amérique occidentale paraissent posséder les représentants les plus anciens du groupe. L'Afrique offre la plus grande variété de témoins isolés des types éteints. L'Amérique andine possède quelques espèces qui se rapprochent du type que l'on peut considérer comme le type primitif de la famille entière. Une distribution géographique sauvage importante de cette famille existe aussi en Turquie, Canada, Inde, Iran et les pays Baltes (**Ivancheva & Tsvetkova, 2003**).

Les composées sont largement répandues dans presque tous les habitats terrestres à l'exception de l'Antarctique avec une large diversification écologique. Toutefois, elles sont abondantes principalement dans les régions tropicales et subtropicales bordant les zones semi-arides et désertiques, elles sont moins fréquentes dans les forêts tropicales. Les genres les plus importants du point de vue nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). D'après Quezel et Santa, en

Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces et elle est considérée comme la famille de loin la plus importante de notre territoire (Quézel *et al.*, 1962).

I.1.2. Description botanique des Astéraceae

Les *Astéraceae* sont des plantes ordinairement herbacées dans nos régions mais pouvant être arborescentes ou arbustives (Filleul, 2019). Les *Astéraceae* sont caractérisées par la disposition des fleurs en capitule c'est à dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige ou entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre (Hadj Salem, 2009). Les fleurs sont de deux types : fleurs tubulées (tubuliflores) et fleurs ligulées (liguliflores). Le tout donnant à l'ensemble l'apparence d'une seule fleur (Kueté *et al.*, 2017).

L'inflorescence est ordinairement un capitule compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées sous-tendu par un involucre de bractées disposées sur un ou plusieurs rangs. Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre (Usher, 1966).

Deux tribus principales sont distinguées : – les *Cichorioideae* à capitules normalement homogames (fleurs toutes stamino-pistillées) constitués de fleurs uniquement ligulées ou toutes tubulées (capitules discoïdes), – les *Asteroideae*, capitules polygames (fleurs stamino-pistillées et unisexuées) composés entièrement de fleurs tubulées (capitules disciformes) ou avec en périphérie des fleurs ligulées (capitules radiés) (Filleul, 2019).

Les feuilles sont le plus souvent alternes, moins souvent opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette) et rarement verticillées. Les fruits sont des akènes généralement surmontées d'une aigrette de poils (Pappus) apparaissant sous la forme d'écailles, de soies, d'arêtes ou d'une couronne qui favorise leur dispersion par le vent et contenant chacun une seule graine (Kueté *et al.*, 2017). L'ornementation joue un rôle important dans la reconnaissance des genres et espèces. Les caractères du fruit sont généralement identiques pour les diverses espèces du même genre (Filleul, 2019).

I.1.3. Principaux métabolites secondaires de la famille des Astéraceae

I.1.3.1. Introduction

Les plantes produisent une gamme impressionnante de substances chimiques. La plupart de ces produits sont basés sur le carbone et connus sous le nom de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont communs pour toutes les espèces et peuvent être subdivisés aux protéines, lipides, glucides et acides nucléiques qui alimentent les grandes voies du métabolisme central (Sell, 2007). Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante, ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures et peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaque de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV) (Hadj Salem, 2009). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. On trouve ces métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles, cette distribution varie d'une plante à l'autre (Epifano *et al.*, 2007).

L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires des végétaux pour le développement de nouveaux médicaments (Hadj Salem, 2009).

I.1.3.2. Principaux métabolites secondaires des Astéraceae

Dernièrement, un grand intérêt était orienté vers les études chimio-systématiques et chimio-taxonomiques basées sur les métabolites secondaires présents dans les plantes supérieures ; parmi ces études on compte plusieurs (Emerenciano *et al.*, 2001) renfermant la famille des Astéraceae.

La plante étudiée appartient à la famille des Astéraceae, cette famille biosynthétisent une variété de substances naturelles ; tel que les triterpènes, les stéroïdes, les coumarines, les anthocyanes, les lignanes, les alcaloïdes, les polyacétylènes, les flavonoïdes et les

sesquiterpènes. Mais les sesquiterpènes lactones (STLs), occupent la classe la plus étudiée parmi ces métabolites, et sont considérées comme des marqueurs chimio-taxonomiques dans la famille des compositeae (Al-Easa & Rizk, 1992).

Une caractéristique chimique typique de cette famille est la présence de polyfructanes (en particulier d'inuline) comme glucides de stockage (au lieu de polysaccharides) dans les taxons vivaces. Les principaux constituants chimiques des Astéraceae expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques (Ghorbanpour *et al.*, 2017).

I.1.3.3. Les lactones sesquiterpéniques

➤ Structure

Les lactones sesquiterpéniques sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même origine, elles sont issues de la cyclisation d'un précurseur terpène, le farnésyl-pyrophosphate (Zhang *et al.*, 2005). En s'appuyant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de lactones sesquiterpéniques : les germacranolides, les élémanolides, les eudesmanolides, les guaianolides et les pseudoguaianolides. Cependant la structure de sesquiterpènes lactones peut supporter plusieurs arrangements (Shizukanolides, érémosphilanolides ...) (Yoshioka *et al.*, 1973).

Elles sont caractérisées, comme l'indique le nom, par la présence d'une γ -lactone qui peut être Cis-12,6 ; Cis-12,8 ; Trans-12,6 et, c'est le cas fréquent ; Trans-12,8. En règle générale elle est du type α -méthylène- γ -lactone (Yoshioka *et al.*, 1973 ; Seaman , 1982).

L'incorporation des groupes hydroxyles que ce soit libres ou estérifiés, ainsi que des époxydes est communément fréquent, il s'ajoute à ces variations structurales la détection des atomes d'halogènes et des sulfures dans quelques structures. L'abondance naturelle rare de lactones sesquiterpéniques aussi bien sous la forme glycoside que sous la forme de dimères (Yoshioka *et al.*, 1973 ; Seaman, 1982).

➤ Intérêt thérapeutique des lactones sesquiterpéniques

De nombreuses recherches ont été prouvées que la diversité large des activités biologiques est liée directement à la grande variété de structures chimiques (Picman, 1986). Durant la recherche consacrée aux composés anti-tumoraux isolés des plantes, les lactones sesquiterpéniques prennent une importance croissante notamment grâce à leurs activités sur

différents types d'organismes et systèmes. En effet, elles forment un des plus large groupes des composés cytotoxiques et anti-tumoraux d'origine végétale, dont la majorité a été isolé de la famille des « Astéracées ».

Elles sont également présentes dans les familles « Magnoliacée », « Apiacée » et quelques moisissures (**Picman, 1986**). La plupart de ces lactones déjà connues, possèdent des activités cytotoxiques in vitro contre les cellules cancéreuses KB et celles de leucémie P388, cette dernière activité a été évaluée in vivo (**Hartwell, 1976**).

De nombreuses publications ont mis en évidence l'existence de relations : Structure-Activité cytotoxique dans le cas des lactones sesquiterpéniques (**Kupchan, 1970 ; Kupchan et al., 1971 ; Lee et al., 1971**).

Ainsi, les études chimiques ont montrés que tous les sesquiterpènes lactones agissent avec les thiols, à titre d'exemple : la cystéine, selon une addition rapide de type Michael, ces réactions sont chimiquement liées aux structures des carbonyles insaturés tel que le groupe α -méthylène- γ -lactone, le groupe cyclopentanone α , β -insaturé, ou l'ester conjugué (**Schmidt, 1997**).

Ces résultats proviennent d'études expérimentales qui ont montrés encore que les lactones sesquiterpéniques, inhibent la croissance des tumeurs par l'alkylation sélective des macromolécules biologiques régulatrices de croissance, comme les enzymes clés qui contrôlent la division cellulaire, ce qui permet aux cellules de subir le phénomène d'apoptose naturelle (**Shmidt, 1999**).

La différence d'activité entre les lactones sesquiterpéniques individuelles peut être expliquée par le nombre différent des groupes structuraux alkylants (**Schmidt, 1997 ; Heilmann et al., 2001**) mais d'autres facteurs, comme la lipophilie, la géométrie moléculaire et l'environnement chimique ou le groupe sulfudryle ciblé peuvent encore influencer l'activité de lactones sesquiterpéniques (**Kupchan, 1970 ; Kwok et al., 2001**).

Diverses drogues renfermant ce type de composés existent, à titre d'exemple : le parthénolide, une molécule anti-leishmanienne ; isolée de *Tanacetum parthenium* (L) *Schultz-Bip*, (ou grande camomille) appartenant à la famille des astéracées, ce principe actif a été décrit comme un inhibiteur de la transcription du facteur NF-K β (facteur impliqué dans l'activation du processus inflammatoire) qui inactive l'oxyde nitrique synthétase (iNOS). Il peut aussi inhiber la formation d'œdème sur des rats et des souris en inhibant la réponse inflammatoire et montre une propriété antidouleurs (**Heinrich et al., 2004**).

Dans l'autre côté, on trouve l'artémisinine, un excellent anti-malarique, le principe actif a été isolé d'*Artemisia annua* (Armoise annuelle) appartenant à la même famille (Astéracées) par les scientifiques chinois en 1972, l'artémisinine, une sesquiterpène lactone renfermant un motif d'un peroxyde endo dans leur structure (**Bentamène et al., 2005**).

Le costunolide, récemment isolé du *Centaurea acaulis*, toujours de la même famille des astéracées, exerce des effets inhibiteurs sur la fonction tueuse des lymphocytes T cytotoxiques (**Taniguchi et al., 1995**). D'autres études ont également montré que le costunolide inhibe la synthèse de l'oxyde nitrique (NO), déclencheur chimique de l'inflammation et déprime la croissance des cellules cancéreuses (**Lee et al., 1999**).

II. Aperçu bibliographique sur le genre *Sonchus*

II.1. Généralités

Parmi les différentes Astéraceae étudiées précédemment, une espèce a été choisie pour une étude plus poussée. Il s'agit de laiteron maraîcher (*Sonchus oleraceus* L.) un sous-arbrisseau utilisé en médecine traditionnelle africaine pour des applications variables. En Algérie, où son emploi est fréquent pour les maladies hépatiques, les tradipraticiens l'appellent « *Tilfaf* ». Cette plante est considérée comme comestible et rare selon l'appréciation d'abondance de la nouvelle flore de Quezel et Santa (**Quezel et al., 1962**), en montrant que la spécificité d'habitat, l'originalité taxonomique et la persistance temporelle des espèces constituent aussi des critères utiles dans la classification des plantes comme la rareté...etc (**Véla & Benhouhou, 2007**).

Outre son intérêt en médecine traditionnelle, sa distribution et d'après l'étude bibliographique que nous avons menée, *S.oleraceus* L. possède le grand avantage de n'avoir jamais été investiguée auparavant en Algérie, nos travaux sur les criblages chimiques, biologiques et toxicologiques se sont avérés prometteurs.

II.2. Description de la plante

S. oleraceus L. (Astéraceae) est une plante herbacée annuelle. Elle est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie, elle se développe et se reproduit avec succès dans un large éventail d'habitats (**Puri et al., 2018**). Les tiges sont de couleur vert ombragé avec une touche violet rougeâtre. La plante a des tiges creuses qui exsudent du latex, si elles sont

endommagées. Elles sont creuses avec cinq angles, de couleur vert foncé et émettent une sève laiteuse une fois coupées. Le système racinaire est constitué d'une racine pivot solide.

S. oleraceus L. a une racine pivotante courte et des feuilles profondément lobées. Les feuilles sont lancéolées à oblongues, glabres et de couleur vert foncé avec des veines blanches pâles à violettes (Mawalagedera, 2014). Les feuilles les plus anciennes forment une rosette basale près du sol, mais les feuilles formées plus tard se trouvent sur la tige florale, qui se termine par une inflorescence. Les premières feuilles sont orbiculaires avec une marge légèrement dentelée. Les feuilles mûres sont pontifiées aux bords irrégulièrement dentés et deviennent de plus en plus lobées à maturité se terminant par de petites épines molles, atteignant 10 à 36 cm de long et 12 cm de large (Cici et al., 2009). Les fleurs auto-compatibles développent des akènes une semaine après la floraison. Elles sont de couleur jaune et abondante, atteignant 7 mm de diamètre. La floraison a généralement lieu au printemps et en été. Les bractées florales à la base du capitule sont lisses et minces d'un vert terne, glabres et se chevauchent en série verticale. Les graines contenant des vaisseaux qui sont coiffées par une grappe de poils, ou pappus, comme la plupart de cette grande famille de composites (Mawalagedera, 2014).

II.3. Classification botanique

D'après la nouvelle classification de l'APG 3 (Angiosperms Phylogeny Group 3, 2009) (Goldie, 1905), la plante *Sonchus oleraceus* L. est classée et présentée dans le tableau 1 comme suite :

Tableau 1 : Classification systématique de *Sonchus oleraceus* L.(Goldie, 1905).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Phanerogamae</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Astéridae</i>
Ordre	<i>Astérales</i>
Famille	<i>Astéraceae (Compositae)</i>
Genre	<i>Sonchus</i>
Espèce	<i>oleraceus</i> L.

II.4. Usage ethnobotanique

Les utilisations traditionnelles de différentes espèces du genre *Sonchus* ont été citées dans plusieurs travaux, en particulier :

- Utilisation du *Sonchus* comme galactagogue, fébrifuge, sédatif, vermifuge (Goldie, 1905 ; Best, 1905) et contre la phtisie (Ahmad *et al.*, 2015).
- Traitement des troubles hépatiques, des ulcères et cicatrisant (Khare, 2007) et du vitiligo (Resende *et al.*, 2015), ainsi que le traitement des troubles gastriques ; Bell, 1890).
- Application contre le cancer et comme agent cathartique (Liu & Zhao, 2010).
- Leurs propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires et anti-rhumatismales (Vendruscolo *et al.*, 2006 ; Agra *et al.*, 2007).
- Prévention de l'hémorragie lors de l'accouchement et utilisation comme salade en Italie, l'Asie et l'Afrique (Hussain *et al.*, 2010).

II.5. Travaux antérieurs sur le genre *Sonchus*

II.5.1. Constituants chimiques

Divers groupes de métabolites secondaires ont été identifiés dans la plante comme : les lactones sesquiterpéniques (eudesmanolides et guaianolides), flavonoïdes, flavonoles, proanthocyanidines, phénols totaux, saponines et les alcaloïdes totaux (Mawalagedera, 2014). Les feuilles de la plante *S.oleraceus* L. contiennent de la vitamine C, caroténoïdes, acide oxalique, éléments variés et acides gras à chaîne courte (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1990 ; Guil-Guerrero *et al.*, 1998) (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques métabolites isolés de différentes espèces du genre *Sonchus*.

Espèces	Métabolites	Références
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Sesquiterpène glycosides ; sonchusides A, B, C et D. glucozaluzanin C; macrocliniside A ; crepidiaside A et picrisides B; monoterpene loliolide ; 15-O-β-glucopyranosyl-11β,13-dihydrourospermal A ; Ursolic acid ; lupéol ; β-sitostérol-3-O-β-glucopyranoside. luteolin; luteolin-7-O-β-D-glucoside ; apigenin ; apigenin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester ; apigenin-7-O-β-D-glucuronide ethyl ester ; apigenin-7-O-β-D-glucopyranuronide ; germanicyl	Miyase & Fukushima, 1987 ; Elkhayat, 2009 ; Xu & Liang, 2005 ; Bai <i>et al.</i> , 2008 ; Fouad <i>et al.</i> , 2015 ; Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1990 ;

	<p>acetate ; 3 β-hydroxy-6β, 7α, 11 β-H-eudesm-4-en-6,12-olide ; oleanolic acid ; 1-cerotol.</p> <p>α-amyrin ; β-amyrin; betulinic acid ; ethyl linoleate ; (E) 9-Octadecenoic ; acid ethyl ester.</p> <p>Carotenoids ; α-linolenic acid ; linoleic acid ; palmitic acid ; acide monoénoïque saturé.</p> <p>Glycosides : glucozaluzanin C ; macrocliniside A ; crepidiaside A ; picrisides B.</p> <p>Sesquiterpènes lactones ; taraxasterol ; guaianolide.</p> <p>2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl ; β-D-glucopyranosiduronic acid (luteolin 7-β-D-glucosiduronic acid) : Luteolin 7-O-glucuronide,</p> <p>Quinones ; anthracenosides ; flavylum ; anthocyanoside ; β-sitosterol ; β-sitosterol glycoside ; 1-hexacosanol ; hexadecanoic methyl ester (methyl palmitate) ; 1,3,4,5-tetra-(p-Hydroxyphenylacetyl)quinic acid</p>	<p>Bondarinko et al., 1983 ;</p> <p>Elkhayat, 2009 ;</p> <p>Li & Yang, 2018 ;</p> <p>Abhijet et al., 2018 ;</p> <p>Guarrera & Savo, 2016 ;</p> <p>Bondarinko et al., 1983 ;</p> <p>Fouad et al., 2015.</p>
<i>Sonchus asper</i>	<p>α-linolenic acid ; linoleic acid; palmitic acid; Sesquiterpene lactones, taraxasterol ; guaianolide.</p> <p>15-O-β-D-Glucopyranosylurospermal A ;</p> <p>15-O-[6'-(p-hydroxyphenylacetyl)]-β-D-glucopyranosylurospermal A ; sonchuside G, E, I, H et F.</p>	<p>Li & Yang, 2018 ;</p> <p>Hellal et al., 2000 ;</p> <p>[1]</p>
<i>Sonchus tenerimus</i>	<p>Linoleic acid ; palmitic acid ; sesquiterpènes lactones ; taraxasterol ; guaianolide.</p>	<p>Li & Yang, 2018 ;</p> <p>Hellal et al., 2000.</p>
<i>Sonchus uliginosus</i>	<p>Type d'eudesmane sesquiterpénoïde : (1β,6α) 1,6,14-trihydroxyeudesm-3-en-12-oic acid γ-lactone ; (1 β,6α)1,6,14-trihydroxyeudesma-3,11(13)-dien-12-oic acid γ-lactone. (1β,6α)-1,6-dihydroxy-14-O [(4hydroxyphenyl)acetyl]eudesma-3,11(13)-dien-12-oic acid γ-lactone.</p> <p>Dérivés de phenylpropanes : 4-hydroxy-γ,3,5-trimethoxybenzenepropanol.</p> <p>γ,3,4,5-tetramethoxybenzenepropanol.</p> <p>γ,3,4,5-tetramethoxybenzenepropanol acetate.</p>	<p>Zhang et al., 2006.</p>
<i>Sonchus arvensis</i>	<p>Sesquiterpène lactone ; taraxasterol; guaianolide ; isoetin 7-glucoside ; sonchoside A ; luteolin 7-glucosylglucuronide ; isocynaroside : luteolin 7-β-D-glucopyranoside ; quercimétrin.</p> <p>1,3,4,5-tetra-(p-Hydroxyphenylacetyl) quinic acid ;</p> <p>1,3,4-tri-(p-Hydroxyphenylacetyl) quinic acid ;</p>	<p>Hellal et al., 2000 ;</p> <p>Bondarenko et al., 1978 ;</p>

	3,4,5-tri-(p-Hydroxyphenylacetyl) quinic acid methyl ester ; 1 β -Hydroxy-15-O-(p-hydroxyphenylacetyl)-5 α ,6 β H-eudesma-3-en-12,6 α -olide ; 1 β -O- β -D-Glucopyranosyl-(6'-O-p-methoxyphenyl acetyl)-15-O-(p-hydroxyphenylacetyl)-5 α ,6 β H eudesma-3,11(13)-dien-12,6 α -olide ; Sonchoside ; 7- β -D-glucopyranosyloxy-3',4',5,6'-tetrahydroxyflavone ; 3,7-Bis(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4',5,6'-tetrahydroxy flavone.	Xu et al., 2008 ; Gatto et al., 2011 ; Bondarenko et al., 1978.
<i>Sonchus</i> sp.	ω -3 fatty acids ; vitamin C ; carotenoids ; flavonols ; phenolics ; proanthocyanidins ; oxalate ; isoetin.	Guarrera & Savo, 2016.
<i>Sonchus macrocarpus</i>	[3aS-(3 α ,5 α β ,6 β ,9 α ,9 α ,9 β)]-decahydro-6-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-5a-methyl-3-methylenenaphtho[1,2-b]furan-2(3H)-one.	[1]
<i>Sonchus Transcaspicus</i>	1 β -O- β -D-Glucopyranosyl-5 α ,6 β H-eudesma-3-en-12,6 α -oliide ; 1 β -O- β -D-Glucopyranosyl-15-O-(p-hydroxyphenyl acetyl)-5 α ,6 β H-eudesma-3,11(13)-dien-12,6 α -olide ; 1 β -O- β -D-Glucopyranosyl-(6'-O-p-hydroxyphenyl acetyl)-15-O-(p-hydroxyphenylacetyl)-5 α ,6 β H-eudesma-3,11(13)-dien-12,6 α -olide ; 1 β -hydroxy-15-O-(p-methoxyphenylacetyl)-5 α ,6 β H-eudesma-3,11 (13)-dien-12,6 α -olide;	Han et al., 2005.
<i>Sonchus erzincanicus</i>	Corchoionoside C 6'-O-sulfate ; corchoionoside C ; 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxyflavone ; quercetin 3-O- β -D-glucoside ; luteolin 7-O-glucuronide ; luteolin 7-O- β -glucoside ; apigenin 7-O-glucuronide.	Ozgen et al., 2010.

II.6. Activités biologiques

Plusieurs recherches scientifiques s'intéressaient par les propriétés biologiques et pharmacologiques des espèces du genre *Sonchus*, le tableau 3 récapitule la majorité des activités liées aux différentes espèces de *Sonchus* y compris la plante choisie *Sonchus oleraceus* L.

Tableau 3 : Les activités biologiques du genre *Sonchus*.

Espèce	Activités biologiques	Références
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Activité antioxydante (inhibition de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂), chélation de Fe ²⁺ et DPPH,	Schaffer et al., 2005 ; Nehir & Karakaya, 2004 ;

	<p>pouvoir réducteur, activité de piégeage des radicaux hydroxyles (HRSA : hydroxyl radical scavenging activity).</p> <p>Test de DPPH (2,2-diphénylpicrylhydrazyl) avec l'activité antioxydante cellulaire (CAA : cellular antioxidant activity) a été utilisé.</p> <p>Activité antioxydante a été déterminé par la capacité antioxydante équivalente au (TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity), et capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC : oxygen radical absorption capacity).</p> <p>Activité antidiabétique, anxiolytique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antinociceptive, anti-tumeur et cytotoxique.</p>	<p>Yin et al., 2007 ; McDowell et al., 2011 ; Teugwa et al., 2013 ; Vilela et al., 2009b ;</p> <p>Li et al., 2017 ;</p> <p>Vilela et al., 2010 ; Vilela et al., 2009a ; Karar et al., 2017 ; Alves-da-Silva et al., 2009 ; Huyan et al., 2016 ; McDowell et al., 2011.</p>
<i>Sonchus asper</i>	<p>Activité anti-cancer.</p> <p>Activité hépatoprotectrice et génoprotectrice</p> <p>Activité antioxydante</p> <p>Activité antibactérienne</p> <p>Cytotoxicité</p> <p>Activité néphroprotectrice</p> <p>Phytotoxicité</p> <p>Activité anticholinestérasique</p> <p>Activité antidiabétique</p> <p>Effet protecteur sur la thyroïde.</p>	<p>Li & Yang, 2018 ; Alkreathy et al., 2014 ; Khan et al., 2012 a ; Xia et al., 2010 ; Conforti et al., 2011 ; Teugwa et al., 2013 ; Khan et al., 2012 a ; Khan et al., 2010 ; Khan et al., 2012 b ; Mohammadi, 2017 ; Khan, 2012 c.</p>
<i>Sonchus arvensis</i>	<p>Activité anti-cancer</p> <p>Activité antioxydante</p> <p>Activité cardioprotectrice</p> <p>Activité antibactérienne</p> <p>Inhibition de la xanthine oxidase (XO) et activité anti-hyperuricémique</p> <p>Activité hépatoprotectrice et génotoxicité.</p>	<p>Li & Yang, 2018 ; Xia et al., 2010 ;</p> <p>Widyarini et al., 2015 ;</p> <p>Alkreathy et al., 2014.</p>

<i>S.brachyotus</i> DC	Activité antioxydante et antibactérienne	Li & Yang, 2018 ; Xia <i>et al.</i> , 2010.
<i>S. lingianus</i>	Activité antioxydante et antibactérienne	Li & Yang, 2018 ; Xia <i>et al.</i> , 2010.
<i>S. uliginosus</i>	Activité antioxydante et antibactérienne	Li & Yang, 2018 ; Xia <i>et al.</i> , 2010.
<i>S.transcaspicus</i>	Test de cytotoxicité	Han <i>et al.</i> , 2005.

Chapitre I I

Généralités sur les

composés

phénoliques

I. Définition

Le règne végétal constitue une source importante de polyphénols. Ces derniers sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents organes et tissus. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols (**Middleton *et al.*, 2000**).

Plus de 8000 molécules produites dans les plantes sont identifiées et qui constituent trois grandes classes : les composés phénoliques, les terpénoïdes, et les alcaloïdes (**Wink, 2003**). Ces molécules sont pourvues de différents rôles dans la plante, notant les agressions climatiques ; stress biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Ils contribuent aussi à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli *et al.*, 2000**). Ils représentent une large gamme potentielle d'agents thérapeutiques, largement exploitée par l'homme dans différents domaines comme la santé et l'alimentation (**Croteau *et al.*, 2000**).

I.1. Structure et catégories des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal, ce sont des métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. L'élément fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique (aromatique), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside en raison de leur réactivité et toxicité en vue de la plante elle-même (**Boizot & Charpentier, 2006**).

I.2. Classification

Les polyphénols peuvent être subdivisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, stilibénoïdes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénoliques, xanthones et autres phloroglucinols (**Jensen, 1991**). Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...). Les acides phénols et les flavonoïdes font l'objet d'une description plus détaillée.

I.2.1. Acides phénols (acides phénoliques)

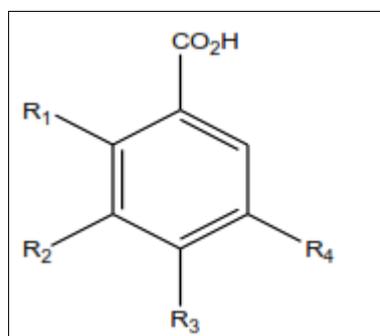
Ces molécules sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique ce qui constituent les deux sous classes :

A – Acide hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline ou enzymatique. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides (**Macheix et al., 2005**).

Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et salicylique (**Chanforan, 2010**).

La figure 1 illustre la structure de quelques exemples de ce groupe.



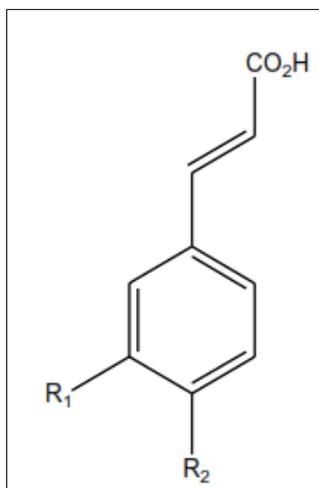
$R_1=R_2= R_3=H, R_4=OH$	acide p-hydroxybenzoïque
$R_1= R_4=H, R_2= R_3=OH$	acide protocatéchique
$R_1= R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$	acide vanillique
$R_1=H, R_2= R_3= R_4=OH$	acide gallique
$R_1=OH, R_2= R_3= R_4=H$	acide salicylique

Figure 1 : Structure d'acides hydroxybenzoïques communs (**Chanforan, 2010**).

B- Acide hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure possède un cycle aromatique associé à trois carbones C6- C3 (figure 2) ; par exemple : l'acide

caféique, l'acide férulique, p-coumarique (ses isomères *o*- et *m*-coumariques), et l'acide sinapique. Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides (Balasundram *et al.*, 2006).



$R_1 = R_2 = H$	acide cinnamique (non phénolique)
$R_1 = H, R_2 = OH$	acide p-coumarique
$R_1 = R_2 = OH$	acide caféique
$R_1 = OCH_3, R_2 = OH$	acide férulique

Figure 2 : Structure des principaux acides hydroxycinnamiques communs (Chanforan, 2010).

I.2.2. Rôles et propriétés thérapeutiques des acides phénoliques

Les acides phénoliques sont réputés aussi pour leur caractère anti-oxydant en neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antifongiques, anti-inflammatoires, antivirales, anticancéreuses ainsi que leur faible toxicité (Ravn *et al.*, 1989).

Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique et l'acide férulique qui empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris (Psotová *et al.*, 2003).

L'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2005), L'acide rosmarinique, est fortement anti-inflammatoire. Les acides phénoliques sont connus aussi pour leur baisse du facteur de risque pour de nombreuses affections telles que l'infarctus et le cancer (Fiuza *et al.*, 2004).

➤ **Chez les plantes**

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

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

➤ **Chez les humains**

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

I.3. Les Flavonoïdes

I.3.1. Structure

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composé naturels polyphénoliques. Ils sont largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement dans l'alimentation. Ils sont retrouvés également dans les plantes médicinales (**Bruneton, 1999**).

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (figure 3) (**Pietta, 2000**).

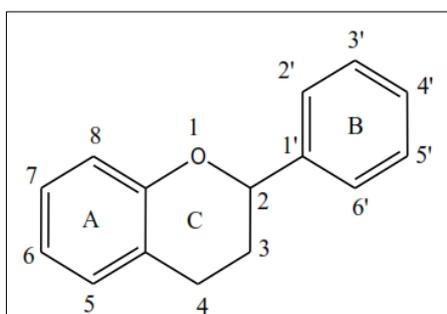


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes (**Pietta, 2000**).

I.3.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une sous classe des polyphénols ; ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés (**Harborne & Williams, 2000**). Structurellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs groupes, dont les plus importants sont : flavones (apigénine, lutéoline), flavonols (quercétrine, kaempférol, myricétine et catéchine), flavanones (naringénine), dihydroflavonols, flavanes, flavanonols, flavan-3-ols (epicatéchine), flavylum, chalcones, aurones et anthocyanines (pélargonidine, cyanidine et péonidine), les chalcones (butéine et phlorétine) et les isoflavonoïdes (isoflavones, rotonoïdes) et les coumaranochromones (**Bruneton, 1999**).

I.3.3. Rôles et propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes, ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Jensen, 1992**). C'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (**Marfak, 2003**).

Sur le plan thérapeutique, leurs propriétés sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti tumorales, anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques, et antioxydantes (**Harborne & Williams, 2000**). Par exemple : l'apigénine une flavone trouvée dans de nombreuses plantes appartient à la famille des astéracées, possède encore des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Shukla & Gupta, 2010**).

Chapitre III

Généralités sur les activités pharmaco- toxicologiques de la plante

Introduction

Les composés phénoliques confèrent aux plantes du genre *Sonchus* leurs vertus pharmacodynamiques. Plusieurs méthodes existent pour étudier les activités biologiques des plantes médicinales.

Dans ce chapitre, nous décrivons les méthodes d'étude chimique comme l'HPLC (chromatographie liquide à haute performance) et biologiques comme les activités antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, anticholinestérasiques, dermatoprotectrice (facteur de protection solaire 'FPS' ou Sun Protection Factor 'SPF'), toxicité aigüe, subaigüe et antiproliférative déterminées pour la plante de notre étude.

I. Méthodes d'analyse des extraits de plantes

La séparation, la détection, l'identification et la quantification des molécules s'effectuent par plusieurs méthodes analytiques et spécialement chromatographiques.

Actuellement, les méthodes chromatographiques couplées à divers détecteurs occupent la plus importante place dans le screening moléculaire car elles permettent de caractériser simultanément un éventail très large de molécules avec une meilleure spécificité et une plus grande sensibilité comparées aux méthodes anciennes.

Elles sont applicables à tous les milieux biologiques, quelle qu'en soit la nature, après une étape d'extraction rendue nécessaire du fait de la complexité de ces matrices.

Les propriétés physico-chimiques des analytes conditionnent la détection par chromatographie, ce qui explique qu'il n'y a aucune méthode chromatographique qui permette la détection de toutes les substances et qu'une bonne stratégie impose la disposition de plusieurs méthodes colorimétriques, spectrophotométriques et chromatographiques complémentaires.

L'analyse des extraits et fractions de plante reste une étape importante, cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques comme la chromatographie liquide à haute performance 'HPLC' (Bendif, 2017).

I.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance est indiquée pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse (HPLC-MS) (**Bendif, 2017**).

L'identification précise des composés phénoliques peut être une tâche complexe car ils contiennent une grande variété de structures. Dans ce contexte, l'HPLC-MS s'est avéré être un outil très utile dans la caractérisation des produits naturels (**Bendif, 2017**).

L'ionisation par électrospray (ESI), en particulier, a été largement appliquée, car il s'agit d'une technique d'ionisation douce aboutissant à la fois à des molécules protonées et déprotonées. La mesure précise de la masse de petites molécules est utilisée pour déterminer la formule élémentaire, facilitant ainsi l'identification des substances inconnues (**Careri, 1998**).

La spectrométrie de masse (SM) repose alors sur deux éléments essentiels (**Alkhatib, 2010**) :

- La possibilité, par différentes méthodes, de fragmenter une molécule en différents ions, positifs ou négatifs, de rapports m/z (masse/nombre de charges élémentaires) différents.
- La détection de ces fragments. Là encore, différentes techniques existent (déflexion par champ magnétique, filtre de masse quadripolaire, trappe ionique, temps de vol) mais leur nature influe essentiellement sur la précision des résultats.

Chaque molécule peut être caractérisée par un profil de fragmentation pour une technique de fragmentation donnée. De plus, la formation d'un ion moléculaire (M^+) ou pseudomoléculaire $[M+H]^+$, informe sur la masse de la molécule étudiée, ce qui permet son identification. La spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF – MS : Quadripole time-of-flight-mass spectrometry) combine alors une sensibilité et une précision de masse élevées pour les ions précurseurs et les produits, fournissant la composition élémentaire des ions parents et fragments. Cette caractéristique contribue à identifier les composés de manière approfondie et à les différencier sur la base de la prédiction de la formule chimique à partir d'une mesure précise de la masse ionique et d'un motif isotopique caractéristique (**Quirantes-Piné et al., 2013**). Cette technique permet l'analyse simultanée d'un grand nombre de molécules dotées de propriétés physico-chimiques très variables, surtout en terme de polarité, de poids moléculaire et de stabilité thermiques. C'est une méthode de séparation

robuste, facile d'emploi, avec des principes de séparation bien connus, et qui permet l'analyse d'un grand nombre de molécules avec une bonne sensibilité et sélectivité ajustable. Le couplage de l'HPLC-QTOF avec la spectrométrie de masse donne plus de précision et de caractérisation au profilé établis par l'HPLC seule (Quirantes-Piné *et al.*, 2013).

De plus, le volume d'échantillon requis pour l'analyse est très faible. Par conséquent, il est indiqué comme un outil très puissant pour l'identification des espèces et peut être très utile lorsque les standards de référence ne sont pas disponibles. Il offre aussi une excellente sensibilité de scan complet, ce qui le rend approprié pour un dépistage à grande échelle dans les enquêtes médico-légales (Quirantes-Piné *et al.*, 2013).

L'application réussie de la technique Q-TOF-MS dans le dépistage de nombreuses familles différentes de médicaments a été rapportée par de nombreux chercheurs (Justyna & Agata, 2016). Cette technique utilise une phase stationnaire et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse des constituants individualisés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (Namiki, 1990).

II. Activités biologiques des extraits de plantes

II.1. Activité antioxydante

II.1.1. Introduction

L'oxygène (O₂) est le premier élément essentiel pour les organismes multicellulaires, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie (Dalton, 1995). Par contre l'O₂ est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif. Celui-ci peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels et à des dégâts cellulaires irréversibles (Sanchez-Moreno, 2002) ». Récemment, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et

la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Dupont & Guignard, 2007).

II.1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques

Radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), stress oxydatif et antioxydants, deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels et même pour le grand public. Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

Par définition, un radical libre est tout atome, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron (ou plus) non apparié « célibataire », sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réapparier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules et initie ainsi une réaction en chaîne, c'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène, incluent des ERO comme l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) produit au cours du métabolisme mitochondrial, le radical hydroxyle (OH°) qui réagit avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose, c'est un dérivé de l'anion superoxyde, le radical hydroperoxyde (HO_2°), le radical peroxyde (RO), et le radical alkoxyde (RO°) (Favier, 2003).

Aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène, sont non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet (1O_2) et le peroxydinitrite (ONOO-). Ces composés ne sont pas réactifs mais peuvent être des précurseurs de radicaux (Desceemaeker, 2004).

Par ailleurs, tous les radicaux libres ne sont pas des dérivés de l'oxygène, les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ERO. Ils peuvent, à leur tour, réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Citerons par exemple, les

acides gras peroxydés qui sont le résultat de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO, générant des molécules réactives et nocives (**Desceemaeker, 2004**).

On distingue deux types de production de radicaux libres :

-Production endogènes comme les réactions enzymatiques (NADPH oxydase, lipoxygénase et la xanthine oxydase (enzyme dans le foie), mitochondries, phagocytoses, peroxysomes, métaux de transition, exercice physique, inflammation, choc...etc).

-Production exogènes comme la pollution, l'alcool, les médicaments, le soleil, la fumée de tabac, les rayons UV et les produits chimiques (**Favier, 2003**).

Par contre, les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes ; en fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs endogènes et exogènes (**Rahman, 2002**).

II.1.3. Dommages oxydatifs des radicaux libres

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme humain. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Valko et al., 2006**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN. Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (**Smith et al., 1996**). Parmi les, on cite, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (**Jha et al., 1995**), les maladies inflammatoires et cardiovasculaires (**Georgetti et al., 2003**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau et le cancer (**Halliwell & Gutteridge, 1990**).

II.1.4. Antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation de ces substrats et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO (**Rice-Evans et al., 1996**).

Les antioxydants sont fréquemment utilisés, ils couvrent un large nombre de molécules et filières très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique ; et peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Rice-Evans *et al.*, 1996**).

a. Modes d'action des antioxydants

D'après Halliwell et Gutteridge (1990), les modes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO.

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents :

-Défenses non enzymatiques : comme les vitamines E (α -tocophérol) et vitamines C (acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...etc). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (**Favier, 2003**).

-Défenses enzymatiques : sont des systèmes de défense très efficaces parce que les enzymes ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), catalase (métabolise l' H_2O_2), glutathion peroxydase (action réductrice sur l'hydrogène et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH) (**Favier, 2003**).

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- **Système de défense primaire :** la catalase, le glutathion, ces antioxydants préviennent la production d'ERO en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation, ils agissent donc en prévention (**Favier, 2003**).

- **Système de défense secondaire :** les tocophérols, ces molécules sont dites «chain-breaking», elles réagissent avec les ROO° et/ou les R° , bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O^{2-}) à très réactives (OH°) (**Favier, 2003**).

b. Différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle, les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (**Favier, 2003**).

c. Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories :

- Enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme : superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase, catalase, lipase, protéase, endonucléase (éliminent les molécules oxydées), albumine, ferritine (complexent les ions divalents).
- Nutriment antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation : vitamine E, taurine -vitamine C, caroténoïdes (lycopène, lutéine...), polyphénols, minéraux et oligo-éléments.

Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Favier, 2003**).

Les polyphénols sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Favier, 2003**).

II.1.5. Moyens de défense contre les radicaux libres

Parmi les moyens de défense, on peut citer les composés phénoliques qui sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al., 1995**). Vu leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Smith et al., 1996 ; Ali et al., 2008**).

II.1.6. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, soit de manière *in vitro* comme le cas de notre travail par de nombreuses méthodes.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et des systèmes biologiques (Sanchez-Moreno & Larrauri, 1998). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Dupont, 2007). Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Miller *et al.*, 1993). Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle (-OH), des anions superoxyde (O^{o2}), du peroxyde (ROO^o) et de l'oxyde nitrique (NO^o) (Dupont, 2007).

Ces techniques sont différentes les unes des autres par les réactifs utilisés, les conditions d'application, leurs protocoles ainsi le mécanisme d'action par lequel l'extrait ou la molécule testée se manifeste dans le milieu et la forme d'expression des résultats (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de sept tests chimiques, à savoir : DPPH^{*}, ABTS^{*+}, CUPRAC, chélation des métaux, phénanthroline, galvinoxyle et blanchiment de β-carotène.

Les techniques citées témoignent l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à neutraliser les radicaux libres par transfert d'électron et/ou de proton issus de phénomènes d'oxydations (Prior *et al.*, 2005).

Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante (BHA, quercétine, BHT, rutine...etc) (Prior *et al.*, 2005).

II.2. Effet antimicrobien

Récemment, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives d'origine végétale, constitue une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. En particulier, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoides, les tanins, ...etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques (Prasad & Seenayya, 2000).

II.2.1. Mécanisme de l'effet antimicrobien

Le mécanisme de l'effet antimicrobien est sans doute très complexe, et peut impliquer de multiples modes d'actions tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien (Milane, 2004), la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique (ce qui cause une fuite des composants cellulaires), l'influence sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN (Zhang *et al.*, 2009), des protéines et des lipides (Pieboji, 2007). Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être la conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe. C'est dans cette optique que nous envisageons dans ce présent travail, d'étudier l'activité antibactérienne des différents extraits isolés à partir des parties aériennes de *Sonchus oleraceus* L. et de mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des germes pathogènes pour l'homme (staphylocoques et entérobactéries).

II.3. Activité anti-inflammatoire

II.3.1. L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse, indispensable à son intégrité (**Rahmani et al., 2016**). La réaction inflammatoire est responsable de phénomènes locaux caractérisés par 4 signes cardinaux : Œdème, rougeur, chaleur et douleur et par une série de processus cellulaires et biochimiques : afflux leucocytaire, plaquettaire et macrophagique, libération de dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines dont les PGE2, thromboxanes et leucotriènes), de facteur d'activation plaquettaire (PAF), d'hémoglobine, d'amines vasodilatatrices telles que l'histamine, la sérotonine et les kinines, des enzymes protéolytiques et des ions superoxydes (**Yam et al., 2009**). Cette réponse immunitaire protectrice peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, des anomalies de régulation et de production des cellules intervenant dans l'inflammation (**Weill & Batteux, 2003**). Ces processus inflammatoires sont impliqués dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies humaines tel que l'arthrite, le diabète, l'asthme, les allergies et le cancer (**Viladomiu et al., 2016**).

II.3.2. Les anti-inflammatoires

L'inflammation et ses pathologies associées constituent de plus en plus un problème majeur de santé tant par la majorité de personnes qui en souffrent qu'aussi par les différentes formes sous lesquelles elles se manifestent. Leur traitement est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires, non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes (AIS : anti-inflammatoires stéroïdiens). Ces molécules présentent des effets secondaires néfastes à l'organisme surtout en cas d'utilisation à longue durée, particulièrement dans le traitement des inflammations chroniques (**Chiolero et al., 2000**). La prise des anti-inflammatoires présente souvent des risques gastrointestinaux (ulcère gastroduodénaux, perforation, sténose), des risques rénaux tels que l'insuffisance rénale aiguë et parfois des complications cardiaques (**Soubrier et al., 2013**).

La recherche de nouvelles molécules médicales sans risques d'effets secondaires s'avère indispensable pour les traitements des sujets. C'est pourquoi, l'accent est de plus en plus mis sur la recherche de nouvelles molécules douées d'activités anti-inflammatoires dans les plantes médicinales. Par ailleurs, très peu d'étude sur l'activité anti-inflammatoire de *Sonchus*

oleraceus L. ont été réalisées. C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire par la méthode de dénaturation protéique des différents extraits des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

II.3.3. Méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire

II.3.3.1. Dénaturation protéique

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire sous l'effet de certaines substances, tel que l'acide ou la base forte, concentré en sel organique, un dissolvant organique ou la chaleur. La plupart des protéines perdent leur fonction biologique une fois dénaturées. La dénaturation de ces molécules est une cause bien documentée de l'inflammation. En tant qu'élément de la recherche sur le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire (Leelaprakash & Dass, 2011). On observe souvent la présence de ces protéines modifiées chez les patients présentant la maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, et le cancer (Sakat *et al.*, 2010). La dénaturation des protéines est une cause de l'inflammation. La production des autoantigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation *in-vivo* de la protéine. Le mécanisme de la dénaturation comporte probablement le changement dans la liaison électrostatique, hydrogène, hydrophobe et bisulfure (Banerjee *et al.*, 2011).

II.4. Activité anti-cholinestérasique (anti-Alzheimer)

II.4.1. Histoire

En 1901, la maladie d'Alzheimer a été initialement décrite par le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer, à travers le cas de l'un de ses patients (Auguste Deter) de 50ans. Alzheimer continua à la suivre jusqu'à sa mort en 1906 et décrivit les altérations anatomiques observées sur son cerveau (Berchtold & Cotman, 1998). Après sa mort, Alzheimer pratiqua l'autopsie du cerveau et mit alors en évidence dans le cortex cérébral deux types de lésions caractéristiques : des plaques séniles à la surface des neurones et une dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale. En 1906, lors de la 377ème Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, il présenta publiquement ses observations cliniques et histologiques. L'un de ses confrères, le psychiatre Emil Kraepelin, proposa par la suite que cette pathologie cérébrale porte le nom de son découvreur (Alzheimer, 1907).

II.4.2. Définition

La Maladie d'Alzheimer constitue la cause la plus fréquente de démence ; elle représente un véritable problème de santé publique.

La définition anatomo-clinique de la maladie d'Alzheimer ou la démence sénile du type Alzheimer (DSTA) se caractérise par un trouble neurodégénératif progressif mais irréversible provoquée par la perte de neurones et de synapses dans le cortex cérébral et certaines régions sous-corticales (**Alzheimer, 1911**). C'est la forme la plus fréquente de démence chez l'être humain. La fréquence de la MA augmente avec l'âge, on estime qu'environ 10% des personnes de plus de 65 ans et 50% de ceux de plus de 85 ans souffrent de la MA (**UI-Haq et al., 2010**). Sauf s'il y a nouveaux traitements sont développés pour réduire le risque, le nombre de personnes atteintes de la MA pourrait atteindre les 81 millions en 2040, notamment à cause du vieillissement de la population (**Ferri et al., 2005**).

II.4.3. Les traitements pharmacologiques

A ce jour, il n'existe pas sur le marché de médicaments pour traiter la maladie d'Alzheimer de façon curative. Ceci est dû au fait que la physiopathologie n'est pas encore complètement déterminée, mais également que la maladie est diagnostiquée de façon trop tardive, à un stade où les lésions irréversibles sont déjà présentes. Les traitements sont essentiellement symptomatiques et leur but est d'améliorer temporairement les symptômes de la maladie en augmentant les taux de neurotransmetteurs au niveau cérébral. Ils ne permettent pas d'empêcher la progression de la maladie et leur efficacité est qualifiée de modérée. On distingue aujourd'hui deux classes de médicaments qui sont les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et les antagonistes des récepteurs NMDA (**Marfai, 2013**).

A. Les Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les cholinestérases (ChEs) sont une famille d'enzymes qui partagent une homologie étendue de séquence (65%). Les ChEs chez les vertébrés ont été classés en deux types, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), sur la base des spécificités de substrat et de l'inhibiteur des sensibilités distinctes. L'AChE est un élément clé des synapses cholinergiques du cerveau et des jonctions neuromusculaires. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme présente dans le tissu neuronal qui permet la régulation de l'influx nerveux : en dégradant l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission, elle libère la fente

synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations. Selon l'hypothèse cholinergique, les troubles de la mémoire chez les patients atteints de DSTA résulte d'une déficience de la fonction cholinergique dans le cerveau. Plus précisément, de faibles quantités de l'ACh dans l'hippocampe et le cortex sont généralement considérés comme la cause de la MA (Perry *et al.*, 1977), ce qui explique les troubles cognitifs observés.

Bien que le rôle exact de la BChE n'est pas encore complètement compris, il est rapporté d'être impliqués dans la morphogénèse, la cytogénèse et la tumorigénèse, la régulation de la prolifération cellulaire et l'apparition de différenciation au cours du développement neuronal précoce, comme fixateur à la détoxification de certaines substances chimiques, et le métabolisme des lipoprotéines. En outre, les données biologiques appuient le rôle de la BChE dans la perturbation de la neurotransmission cholinergique observée dans la MA (Perry *et al.*, 1977).

L'une des solutions pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Figure 4).

C'est sur la base de cette hypothèse que sont apparus sur le marché les inhibiteurs de l'AChE. Depuis, il a été mis en évidence que cette enzyme, en plus de son rôle dans la dégradation cholinergique, accélère la formation des plaques amyloïdes ; ceci renforce l'intérêt de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Grossberg, 2003).

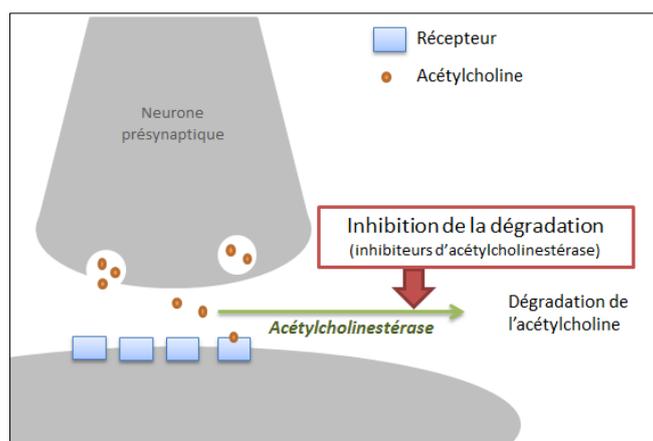


Figure 4 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Grossberg, 2003).

De nombreuses molécules d'origine naturelle se sont révélées inhibitrices de l'activité de l'AChE lors de tests *in vitro*, que ce soit des alcaloïdes ou d'autres classes de composés ; ces molécules proviennent en grande partie de plantes, mais également d'organismes marins tels

que des coraux ou des éponges, ou encore de microorganismes. Néanmoins, peu de ces métabolites ont fait l'objet de tests sur des modèles animaux (Hostettmann *et al.*, 2006).

II.4.4. Les méthodes de détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Afin de détecter de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'acétylcholinestérase, plusieurs méthodes sont disponibles. Les principales reposent sur des tests colorimétriques, telles que la méthode d'Ellman et la méthode bioautographique au Fast Blue B.

II.4.4.1. Mesure de l'activité anticholinestérase

La méthode d'Ellman est la méthode standard utilisée pour détecter et surtout quantifier une inhibition de l'AChE, elle utilise un analogue de substrat naturel de l'AChE, l'acétylthiocholine (ATC), hydrolysée en acétate et thiocholine (Ellman *et al.*, 1961).

Elle est basée sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE ; cette réaction produit de la thiocholine qui réagit alors à son tour avec le 5,5'dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 414 nm. L'activité de l'enzyme peut être déterminé à partir de la variation de cette absorbance (Ellman *et al.*, 1961).

Cette méthode, en plus de quantifier l'inhibition sous forme d'IC₅₀ (concentration diminuant l'activité enzymatique de moitié), permet également d'étudier les paramètres cinétiques et par conséquent le type d'inhibition. De nombreuses adaptations ont été apportées à la méthode originelle. Initialement utilisée dans des cuves, cette réaction a été adaptée depuis pour un usage en microplaques à 96 puits, permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons tout en réduisant la quantité de réactifs (Ingkaninan *et al.*, 2000).

II.5. Activité photoprotectrice ou dermatoprotectrice (détermination in vitro du facteur de protection solaire « FPS »)

II.5.1. Définition de la peau

La peau fait partie du système tégumentaire, qui comprend également des structures accessoires telles que les cheveux, les ongles et les glandes. La peau a deux couches tissulaires principales, le derme et l'épiderme, et repose sur l'hypoderme, également connu sous le nom de

tissu sous-cutané, qui se compose de tissu conjonctif lâche avec des fibres de collagène et d'élastine (Seeley *et al.*, 2006).

La fonction du derme est de fournir une résistance structurelle à la peau. Elle se compose de tissu conjonctif avec des fibroblastes, de quelques cellules adipeuses et de macrophages, et comporte deux couches : la couche réticulaire plus profonde et la couche papillaire plus superficielle. La couche la plus superficielle de la peau est l'épiderme et elle est séparée de la couche papillaire du derme par une membrane basale.

L'épiderme n'a pas de vaisseaux sanguins et est nourri par la diffusion des capillaires de la couche papillaire, elle se compose d'un épithélium pavimenteux stratifié et la plupart des cellules sont des kératinocytes, étant responsables de la résistance structurelle et de la perméabilité caractéristique de cette couche. Sur l'épiderme, il y a aussi des mélanocytes (qui contribuent à la couleur de la peau), les cellules de Langerhans (fait partie du système immunitaire) et les cellules de Merkel (détection du toucher léger et de la pression superficielle) (Seeley *et al.*, 2006).

Chaque année, environ un million de personnes reçoivent un diagnostic de cancer de la peau et environ 10 000 meurent d'un mélanome malin. La plupart des cancers de la peau surviennent dans les zones du corps les plus fréquemment exposées au soleil, comme le visage, le cou, la tête et le dos des mains (Sax, 2000). Les effets nocifs du rayonnement solaire sont principalement causés par la région ultraviolette (UV) du spectre électromagnétique. Le spectre du rayonnement solaire du soleil a un intervalle de 100 nm à 1 mm qui peut être divisée en cinq régions :

- Ultraviolet C ou UV C (de 100 nm à 290 nm) ;
- Ultraviolet B ou UV B (de 290 nm à 320 nm) ;
- Ultraviolet A ou UV A (de 320 nm à 400 nm) ;
- Champ de lumière visible (de 380 nm à 780 nm) qui est visible à l'œil nu ;
- L'infrarouge (de 780 nm à 1600 nm) (Dutra *et al.*, 2004).

Les radiations ultraviolettes ont été impliquées comme facteur causal du cancer de la peau.

En raison de ces faits, les substances des écrans solaires sont désormais incorporées dans les produits de tous les jours tels que les hydratants, les crèmes, les lotions, les shampooings, les mousses et autres préparations pour les cheveux et la peau. L'utilisation régulière de ces produits peut aider à réduire le risque d'effets nocifs des rayons ultraviolets (Sax, 2000).

Les UV A, UV B et UV C peuvent alors provoquer des coups de soleil, un photo-vieillessement, un érythème et une inflammation. Pour protéger la peau du soleil, nous devons appliquer des produits solaires pour éviter tous les effets néfastes susmentionnés (**Latha et al., 2013**).

II.5.2. Facteur de protection solaire (FPS)

Les écrans solaires ont un facteur de protection solaire individuel (FPS), cette valeur peut être défini, comme le proposait la FDA comme le rapport de la dose érythémale minimale de la peau protégée par un écran solaire (MEDp) à la dose érythémale minimale de la peau non protégée (MEDu), comme le montre l'équation 1 (**Sax, 2000**).

FPS = Minimal erythemal dose in sunscreen protected skin (MEDp)/Minimal erythemal dose in unprotected skin (MEDu).

Plus le FPS est élevé, plus le produit est efficace pour prévenir les coups de soleil. Néanmoins, il est nécessaire de standardiser les méthodes pour déterminer le FPS des produits (**Schalka & Reis, 2011**).

Les agents de protection solaire utilisés sur les préparations appliquées localement sur la peau peuvent être divisés en agents organiques et inorganiques. Les formulations disponibles dans le commerce comprennent une combinaison de ces agents pour couvrir un large spectre de rayonnement UV. L'action de cet écran solaire peut varier du blocage, de la réflexion et de la diffusion de la lumière solaire. Les écrans solaires chimiques absorbent les rayons UV, tandis que les écrans solaires physiques réfléchissent ou diffusent la lumière. Un agent solaire idéal doit être sûr, chimiquement inerte, non irritant, non toxique, photo-stable, et devrait fournir une protection complète à la peau (**Latha et al., 2013 ; Schalka & Reis, 2011**).

II.5.2.1. Les méthodes de mesure de l'activité dermatoprotectrice (photoprotectrice)

La photoprotection offerte par les écrans solaires topiques contre l'exposition au rayonnement ultraviolet solaire peut être déterminée *in vivo* ou *in vitro*, et elle est idéalement déterminée par un photo-test sur des volontaires humains. Ce type de test est utilisé depuis de nombreuses années et malgré qu'utile et précis, il s'agit d'un processus long, complexe et coûteux, notamment lorsque des informations concernant la protection contre les longues longueurs d'onde (UVA) sont requises (**Azevedo et al., 1999**). En conséquence, beaucoup

d'efforts ont été consacrés au développement de techniques *in vitro* pour évaluer la photoprotection des composés de protection solaire.

Les méthodes *in vitro* sont en général de deux types :

- ❖ Méthodes qui impliquent la mesure de l'absorption ou de la transmission du rayonnement UV à travers des films de produits de protection solaire dans des plaques de quartz ou des biomembranes ;
- ❖ Méthodes dans lesquelles les caractéristiques d'absorption des agents de protection solaire sont déterminées sur la base d'une analyse spectrophotométrique de solutions diluées (**Pissavini *et al.*, 2003**).

Dans la nature, la lumière UV induit l'accumulation de flavonoïdes et d'autres composés phénoliques dans les tissus épidermiques de la plante. Des recherches précédentes se concentrent sur l'utilisation de flavonoïdes et de phénols absorbant la lumière UV comme antioxydants dans les écrans solaires pour assurer une protection contre la lumière. Cela ouvre un nouveau domaine d'utilisation d'antioxydants naturels dans la prévention des maladies à médiation UV (**Strack, 1997**).

Les herbes ont des propriétés antioxydantes potentielles et la plante sélectionnée pour la présente étude est également riche en activité antioxydante (**El-Ghorab *et al.*, 2003**). Malgré une littérature abondante sur l'activité antioxydante de la plante choisie, aucune donnée absolue n'était disponible sur le FPS, ce qui nous a poussée à adresser cette activité comme l'un des buts du présent travail.

III. Généralités sur la toxicité

III.1. Introduction

Un toxique est toute substance biologiquement active et susceptible, à fortes ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. C'est le cas particulier des produits végétaux riches en métabolites secondaires (**Ouedraogo *et al.*, 2001**).

Les composés chimiques peuvent conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses par voie générale, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir toxique pour une adaptation rationnelle de la thérapie traditionnelle surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses

digestives (bouche, estomac, intestin, etc.). De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait végétal est primordiale pour situer les limites de tolérance de la plante pour toutes les expérimentations (**Ouedraogo et al., 2001**).

L'effet néfaste d'une substance toxique est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion. Un effet aigu se fait sentir dans un temps relativement court, tandis qu'un effet chronique ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (**Lapointe et al., 2004**). Cependant, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxine) provenant des microorganismes, des animaux ou des plantes (**Ouedraogo et al., 2001**).

III.1.2 Evaluation des effets toxiques

Les tests « *in vivo* » ne sont pas les seuls qui doivent être réalisés pour l'évaluation des effets toxiques d'une substance. De nombreux autres aspects pharmaco-toxicologiques doivent être abordés pour déceler un impact éventuel : • Effet sur le foie • Effet sur les reins • Effet sur les poumons • Effet sur l'œil (**Derache, 1986**).

Donc, l'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurables) ou quantitatives (mesurables). Il existe plusieurs types d'études permettant d'évaluer les effets d'un toxique :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ;
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris) ; Certains organismes de réglementation préconisent l'utilisation d'au moins deux espèces animales, dont l'une appartenant aux rongeurs ;
- Les études expérimentales *in vitro*, biochimiques ou cellulaires, les études théoriques par modélisation (exemple : structure-activité) (**Lapointe et al., 2004**).

Concernant ces différentes méthodes d'évaluation, l'OMS rappelle que les données *in vivo* sur les animaux sont plus indicatives de la toxicité et peuvent être considérées comme des marqueurs d'innocuité (**Lapointe et al., 2004**).

a. La toxicité aiguë

La toxicité des plantes peut être directe (composés de la plante-organe) ou indirecte via la genèse d'interactions avec les médicaments allopathiques ou de phytothérapie (composés de plante-métabolisme d'autres médicaments/ xénobiotiques).

Les tests de la toxicité *in vivo* comprennent plusieurs formes :

- La toxicité aiguë est habituellement définie comme l'ensemble des effets néfastes se produisant immédiatement ou peu de temps après une exposition unique sur une période de moins de 24 heures à une ou plusieurs substances (**Walum, 1998**).
- La toxicité aiguë permet de connaître la plus petite dose qui, administrée en une seule prise entraîne la mort de 50% des animaux dans les 24 à 48 heures après le traitement, la durée maximale d'observation étant de 15 jours. Elle permet de déterminer la dose létale 50 (DL₅₀) (**Dubick et al., 1993**).

La méthode classique d'étude de la toxicité orale aiguë d'une substance (**Trévan, 1927**) consiste en une administration de la dite substance à différentes doses, par voie orale, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience (généralement des rats ou des souris des deux sexes), à raison d'une dose par groupe. Les animaux traités sont observés de près durant les premières 24 heures et ensuite quotidiennement pendant 2 semaines et les éventuels changements de l'apparence et du comportement, ainsi que la létalité (DL₅₀) sont notés. Des questions se posent encore concernant l'utilisation de l'évaluation pathologique élargie en tant que partie d'une étude de toxicité aiguë. Cependant, l'autopsie macroscopique est le minimum requis par la plupart des corps de régulations gouvernementaux, comme le sont les déterminations du poids corporel pendant deux semaines (**Walum, 1998**).

La valeur absolue de la DL₅₀ d'un composé varie beaucoup entre les laboratoires, et ces variations ont été attribuées aux différences, par exemple, dans les détails protocolaires, les souches animales, l'encagement, et la source de la substance chimique d'essai. Le résultat de ces discussions intensives des autorités ne demandent habituellement pas des tests de DL₅₀ classiques impliquant un grand nombre d'animaux. Au contraire, les lignes directrices n°420 (**OCDE, 2001a**), n°423 (**OCDE, 2001b**), n°425 (**OCDE, 2008b**) de l'OCDE et la méthode de Lorke (1983) décrivent des méthodes alternatives bien établies et validées qui réduisent les souffrances des animaux et/ou utilisent beaucoup moins d'animaux que la méthode classique de Trevan. Cette dernière a été officiellement abrogée en décembre 2002 par l'OCDE, l'Union Européenne et les États-Unis d'Amérique (**Schlede et al., 2005**).

b. La toxicité subaiguë et chronique

Dans le cas de l'évaluation de la toxicité subaiguë et chronique, la durée d'administration de la substance expérimentale dépendra de la durée d'utilisation clinique prévue. La durée dans

le cadre de l'étude de toxicité variera d'un pays à l'autre, selon la réglementation en vigueur (OMS, 2000).

- La toxicité subaiguë ou subchronique, permet de déceler les troubles de croissance, d'alimentation, les troubles biochimiques et histologiques secondaires à l'administration continue d'une substance (Diezi, 1992).
- La toxicité chronique, permet d'avoir des renseignements sur le degré de toxicité des médicaments qui sont habituellement utilisés de façon répétée par des patients (Cheftel *et al.*, 1989).

Concernant la dose, il est recommandé de prévoir des groupes pour au moins trois niveaux de dose différents : une dose n'engendrant aucun effet toxicologique (dose sans effet) et une dose entraînant des effets toxicologiques. Dans cette fourchette, l'adjonction d'au moins un autre niveau de dose augmente la possibilité d'observer une relation dose-réaction. Toutes les études doivent inclure un groupe témoin d'animaux d'expérience chez lequel on n'administre que le véhicule (OMS, 2000).

III.2. Activité antiproliférative des substances naturelles

III.2.1. Introduction

Le cancer est devenu un véritable problème de santé par le monde : il représente la 2ème cause de mortalité dans les pays développés et devient également un problème majeur de santé dans les pays en développement. En effet, sur le total de décès enregistrés au niveau mondial, 15 % de ces décès étaient imputables au cancer, soit plus que la proportion de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis. Dans les pays industrialisés, il constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (OMS, 2006). Selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de décès dû au cancer va connaître une augmentation considérable dans les pays en développement, aussi bien en Asie, en Afrique qu'en Amérique Latine et ce, principalement en raison du vieillissement constant de la population humaine et de l'augmentation de la pollution (Rastogi *et al.*, 2004). Avec l'urbanisation, les niveaux de cancers plus élevés deviennent plus apparents, et une étude récente en 2019 a montré qu'il y a plus de cas de cancer chez les femmes à 60% que chez les hommes à 56,4% respectivement (Macharia *et al.*, 2019). Il existe donc un engagement

mondial pour trouver de nouvelles entités médicamenteuses qui sont efficaces pour réduire la prolifération des cancers (Colditz *et al.*, 2012).

Dans la recherche de nouveaux produits pharmaceutiques dérivés de plantes, le médicament candidat doit faire preuve de sélectivité en présentant de faibles niveaux de toxicité pour les lignées cellulaires normales et une cytotoxicité supérieure pour les lignées cellulaires cancéreuses (Amin *et al.*, 2009). En général, les produits naturels ayant des effets pharmacologiques peuvent devenir des structures phares dans la préparation de médicaments semi-synthétiques et synthétiques. À cet égard, les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle restent des sources de telles structures. Par ailleurs, une grande partie des plantes médicinales ne disposent pas de données scientifiques permettant de justifier leurs utilisations traditionnelles (Shah *et al.*, 2013). Cette médecine traditionnelle utilise plusieurs molécules anticancéreuses proviennent de plantes médicinales.

L'inflammation est considérée comme une réaction biologique complexe, apparaissant par le biais de divers mécanismes pour protéger un hôte qui est stimulé ou endommagé par des toxines ou d'autres irritants dangereux (Zielińska *et al.*, 2017). Fondamentalement, une inflammation modérée peut aider à combattre l'infection. Cependant, une réponse inflammatoire exagérée a été proposée comme un facteur étiologique (Du *et al.*, 2015 ; Tamura *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2019). L'inflammation sera également nocive si elle devient chronique puisqu'elle peut contribuer à toutes les phases de la tumorigenèse, y compris l'initiation, la promotion et la métastase de la tumeur (Maiorov *et al.*, 2013). L'inflammation est donc un élément essentiel de la progression de la tumeur. De nombreux cancers sont dus à des sites d'infection, d'irritation chronique et d'inflammation (Coussens & Werb, 2002).

Les cellules inflammatoires peuvent en outre sécréter des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui favorisent les mutations, conduisent à l'échec de la réparation de l'ADN, à l'activation d'oncogènes et finalement au cancer (Trinchieri, 2012). (Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). Les cytokines sont des acteurs très importants de la régulation immunitaire et peuvent être divisées en cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les facteurs pro-inflammatoires comprennent TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ et ainsi de suite (Boshtam *et al.*, 2017). Parmi eux, le TNF- α ainsi que l'IL-6 stimulent également les macrophages comme le LPS (lipopolysaccharide), incitant les macrophages et les cellules immunitaires à produire davantage de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que de médiateurs inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine E2 (PGE2), par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique

synthase (iNOS) et de la cyclooxygénase (COX)-2, respectivement (Fan *et al.*, 2013), ce qui aggrave encore l'inflammation (Arulselvan *et al.*, 2016).

De nos jours, un certain nombre de médicaments commerciaux ont été largement utilisés pour prévenir et traiter le stress oxydatif ou les maladies associées à l'inflammation, et ont obtenu de bons résultats. Toutefois, ils ont également observé que ces drogues de synthèse provoquaient certains effets secondaires tels que des hémorragies et des ulcérations gastriques (Liang *et al.*, 2020). En ce qui concerne les effets secondaires, on observe une tendance croissante à développer des produits naturels plus sûrs pour traiter ces maladies. Les macrophages sont donc considérés comme un modèle cellulaire idéal pour l'évaluation de l'activité antiproliférative des composés bioactifs. La recherche de nouveaux anticancéreux d'origine végétale est la motivation de plusieurs chercheurs. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative de la plante *S.oleraceus L.*

La technique du MTT est couramment utilisée pour déterminer la viabilité cellulaire de molécules ou d'extraits de plantes sur de nombreux types cellulaires (Joshi *et al.*, 2000). Nous avons utilisé cette technique pour tester l'effet antiprolifératif de notre plante d'étude sur la lignée cancéreuse de macrophage de murin J774.A1. Le protocole expérimental de la technique du MTT, seront présentés dans la partie Matériels & Méthodes. Les résultats de ces essais seront exposés dans les chapitres qui suivent.

Partie I I

Matériel et

Méthodes

Chapitre I

Caractérisation

phytochimique

I.1. Critères de sélection du matériel végétal

La sélection du matériel végétal est la première étape dans une étude phytochimique. Les critères suivants peuvent guider le phytochimiste lors de la récolte des plantes :

- utilisations traditionnelles des plantes par la population locale ;
- observation des plantes dans leur environnement naturel ;
- aspects botaniques et chimiotaxonomiques.

Cependant, le chercheur peut également décider de procéder à une récolte aléatoire. Dans la pratique, plusieurs de ces approches sont généralement combinées et l'aide d'un botaniste connaissant bien la flore locale est indispensable. Bien sûr, les espèces végétales protégées sont exclues d'une telle démarche et les patrimoines culturels et naturels des pays concernés par les récoltes de plantes doivent absolument être respectés.

Avant d'entreprendre l'étude phytochimique à proprement parler, le chercheur devra encore se renseigner sur d'éventuels travaux scientifiques antérieurs (études phytochimiques, enquête ethnobotaniques, etc.) (Ferrari, 2002).

I.1.2. Utilisations traditionnelles du matériel végétal

Bien que les aspects traditionnels et scientifiques semblent souvent s'opposer dans notre culture, il peut être très profitable de tirer des renseignements des utilisations traditionnelles de certaines plantes aussi bien comme médicament que comme poison. En effet, certains usages profitent de plusieurs siècles d'observations empiriques et ne sont pas à négliger. Il ne faut cependant pas oublier que cette approche est limitée du fait que les méthodes de diagnostic diffèrent grandement entre les médecines occidentales et traditionnelles.

Cependant, il existe des cas pour lesquels une utilisation traditionnelle peut révéler un potentiel intéressant à exploiter en médecine occidentale. Il s'agit des usages des plantes comme antibiotiques, anticancéreux, analgésiques, psychotropes, etc., pour lesquels une preuve scientifique peut être apportée au travers de tests sur une cible appropriée (microorganisme, animal, organe, culture cellulaire, système enzymatique) (Ferrari, 2002).

Notons encore que la famille des Astéraceae, étudiées dans le présent travail a également des usages variés dans les diverses médecines traditionnelles africaines.

I.1.3. Travaux scientifiques antérieurs

Dans l'optique d'augmenter les chances d'isoler de nouveaux produits naturels issus des plantes, le chercheur sera souvent tenté de s'intéresser aux espèces qui n'ont pas, ou très peu, été étudiées jusque-là. Cependant, le scientifique averti pourra également faire des découvertes dignes d'intérêt en investiguant une plante largement étudiée sous un angle nouveau : autre organe ou extrait, technique analytique nouvelle, cible biologique différente...etc. Dans les deux cas, une recherche de littérature approfondie devra précéder le début des processus d'extraction (Ferrari, 2002).

I.2. Matériel végétal

La plante ayant fait l'objet de notre étude a été choisie sur la base d'une recherche bibliographique méticuleuse qui a montré que cette espèce végétale n'est pas étudiée en Algérie.

Les parties aériennes de la plante *Sonchus oleraceus* L. ont été récoltées au mois de Janvier 2018 dans la commune de Boumahra ahmed (36°27' 16.8" Nord, 7°32' 55.6" Est), Latitude : **36.480932**, Longitude : **7.603097**, cité de Guelma, localisé dans le Nord-est de l'Algérie. La plante a été identifiée par le botaniste Prof. Gérard De Belair (Faculté des Sciences, Université d'Annaba) ; où un échantillon de référence a été déposé au niveau du laboratoire de Biologie, Eau et Environnement de la Faculté SNV & STU, Université 8 Mai 1945, Guelma, Algérie sous la référence 'LBEE.22.01.18'.

Les parties aériennes de la plante *Sonchus oleraceus* L. ont été séchées à l'abri de la lumière à température ambiante. Après séchage, le matériel végétal a été broyé en une poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique (KWCG-102, Chine). La poudre ainsi obtenue est conservée dans un bocal en verre hermétique à une température ambiante et à l'abri de la lumière (Figure 5).



Figure 5 : Photos de *Sonchus oleraceus* L. (Janvier 2018 ; Lieu : Boumahra Ahmed-Guelma, Est Algérie).

I.2.1. Méthode d'extraction

Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction. Les solvants d'extraction ont été choisis de manière à solubiliser un maximum de composés. Les solvants d'extraction qui ont été testés sont : l'eau, le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH), chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol, qui possèdent une différence de polarité et qui vont permettre d'obtenir respectivement des extraits polaires et moyennement polaires ou non polaires (Bruneton, 1993).

I.2.1.1. Extraction à froid ou macération

Une quantité de 200 g de la poudre végétale des parties aériennes de *Sonchus oleraceus* L. (SO) ont été macérées de manière exhaustive dans une solution hydro-méthanolique (80%) pendant 72h, trois fois à température ambiante. Après filtration par papier filtre (Wattman N°1 de diamètre 0.2 μ m), les filtrats ont été combinés et évaporés sous pression dans un évaporateur rotatif (BUCHI, R-215) à 40 °C pour obtenir l'extrait brut (EBr). Une partie du résidu a été dissoute dans de l'eau distillée et soumise à une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant différents solvants de polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. Les solvants ont été ensuite éliminés dans un évaporateur rotatif tandis que la fraction aqueuse a été ensuite soumise au processus de lyophilisation. Les solutions organiques ont été concentrées sous vide (jusqu'à 40 °C) pour obtenir les extraits suivants : l'extrait chloroformique (ECh), extrait acétate d'éthyle (EAe), extrait butanolique (EBu) et l'extrait en phase aqueuse (EPa). L'extrait sec a été ensuite récupéré, pesé, étiqueté et conservé à +4°C

jusqu'à l'utilisation (Bruneton, 1993). La figure 6 résume les différentes étapes de cette extraction :

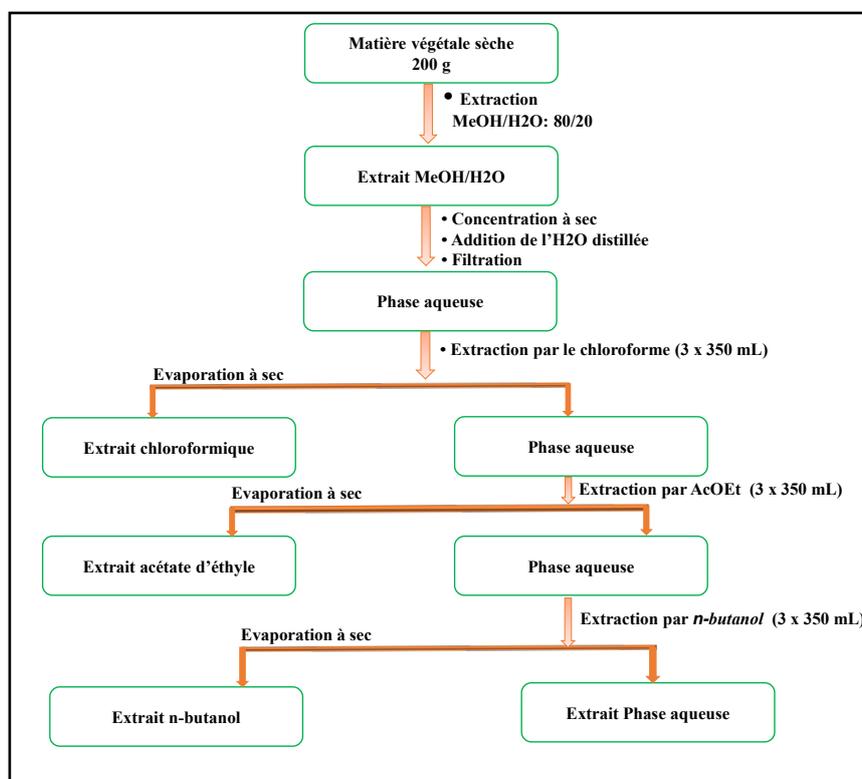


Figure 6 : Protocole d'extraction par macération du *Sonchus oleraceus* L. (Bruneton, 1993).

MeOH : méthanol ; AcOEt : acétate d'éthyle.

L'éthanol à 95% et l'eau distillée ont été sélectionnés comme solvants d'extraction pour les extraits éthanoliques et aqueux macérés respectivement. L'extraction a été effectuée à partir de 20 g et 50 g respectivement avec 500 mL d'éthanol et d'eau distillée pendant 24 h sous agitation constante. Les deux solvants ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre (Wattman N° 1 de 0,2 µm), et concentrés dans un évaporateur rotatif à 35 °C. Les extraits éthanoliques (EE) et aqueux macérés (EAM) ont été séchés, pesés et conservés à 4°C pour une analyse plus approfondie (Effa *et al.*, 2018).

I.2.1.2. Extraction à chaud

L'extraction à chaud a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Pour l'extrait aqueux décocté, 20 g de la plante sèche a été extraite avec de l'eau distillée (100 mL) à 55 °C pendant 4 heures jusqu'à l'ébullition. Le résidu est ensuite filtré et centrifugé (2000 xg,

15 min). Le surnageant a été séché à l'aide d'un lyophilisateur. L'extrait aqueux décocté (EAD) a été conservé dans un endroit sec (Smach *et al.*, 2015).

I.2.1.3. Extraction des alcaloïdes totaux

Les alcaloïdes ont été choisis à cause de leurs propriétés toxiques ou médicamenteuses. L'extraction des alcaloïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par (Dehmlow *et al.*, 1999). 100 g de la poudre séchée a été mis à macérer dans le méthanol. Le solvant a ensuite été éliminé sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. 4% de l'acide acétique (500 mL) a été ajouté au résidu et extrait trois fois par l'éther de pétrole (100 mL à chaque fois) pour éliminer les composés neutres. 120 ml d'ammoniac ont été versés sur la couche aqueuse pour l'alcaliniser jusqu'à ce que le pH devient 11 et extrait à nouveau avec de l'éther de pétrole (50 mL x 10). La phase organique a été évaporée pour donner l'extrait alcaloïde total (EAT).

I.2.2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction en pourcentage (%) est défini comme étant le rapport entre le poids de l'extrait sec en gramme et le poids de la plante sèche en poudre. Il est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{M0}}{\text{M1}} \times 100$$

M0= masse en gramme de l'extrait sec ;

M1= masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

I.3. Criblage phytochimique

La première étape était la recherche des grandes classes de composés chimiques appartenant aux métabolismes secondaires de la plante étudiée, afin de choisir l'extrait le plus actif et qui fera l'objet d'une étude phytochimique bioguidée.

En effet, Le changement d'intensité de couleur ou la formation de précipité par des réactions chimiques spécifiques ont été utilisés comme indication de réponse positive ou négative à ces tests.

Le criblage phytochimique des différents extraits (EBr, ECh, EAe, EBU, EPa, EAD, EE, EAM, EAT) a été effectué selon les protocoles standards. Le criblage a été effectué pour les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les phytostérols (stéroïdes et terpénoïdes), les

tanins, les glycosides d'antraquinones, les glucides (composés réducteurs), les saponosides, les lipides, les coumarines, les gommés et mucilages.

Cette caractérisation chimique préliminaire se fait dans des tubes à essais en utilisant différents protocoles avec plusieurs produits chimiques.

Les résultats qualitatifs sont classés en :

- Réaction très positive +++ : Présence confirmée ;
- Réaction positive ++ : présence modérée ;
- Réaction plus au moins positive + : présence en tant que trace ;
- Réaction négative - : absence.

➤ **Test des composés phénoliques**

- **Test au chlorure ferrique** : Un volume de 2 mL d'extrait de plante a été amené à l'eau et réchauffés à 45-50 °C. Ensuite, 2 mL de 0,3% de FeCl₃ ont été ajoutés. La formation d'une couleur vert foncé ou bleu indique la présence de phénols (**Trease & Evans, 1987**).

➤ **Test des flavonoïdes**

- **Test de réactif alcalin** : Le test consiste à traiter les échantillons avec quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium. Une formation de couleur jaune intense, qui devient incolore lorsque nous avons ajouté 2 gouttes d'acide dilué au mélange, indique la présence de flavonoïdes (**N'Guessan et al., 2009**).

➤ **Test des alcaloïdes**

Les extraits ont été dissous individuellement dans de l'acide chlorhydrique dilué et filtrés. Le test suivant a été effectué.

- **Test de Mayer** : Les filtrats ont été traités avec quelques gouttes de réactif de Mayer (iodure mercurique de potassium). La formation d'un précipité de couleur jaune indique la présence d'alcaloïdes (**N'Guessan et al., 2009**).

➤ **Test de phytostérols (terpénoïdes et stéroïdes)**

- a- **Test de Salkowski** : Les extraits ont été traités avec du chloroforme (CHCl₃) suivi de l'ajout de quelques gouttes de H₂SO₄ concentré (2 mL), une coloration brun rougeâtre de l'interface indique la présence de terpénoïde (**Ayoola et al., 2008**).

b- Test de Liebermann-Burchard : une quantité de chaque échantillon a été agité avec du chloroforme ; Les filtrats ont été traités avec quelques gouttes d'anhydride acétique, bouillis et refroidis. H₂SO₄ concentré (0,5 mL) a été ajouté. La formation d'un anneau brun à la jonction de deux couches et le virage de la couche supérieure au vert montre la présence de stéroïdes tandis que la formation d'une couleur rouge foncé indique la présence de triterpénoïdes (**Joshi et al., 2013**).

➤ **Test des tanins**

- **Test au chlorure ferrique** : L'échantillon a été bouilli dans de l'eau distillée dans un tube à essai, puis filtré. Quelques gouttes de chlorure ferrique à 0,1% ont été ajoutées et l'observation d'une coloration vert ou bleu-verte indique la présence des (tanins catéchiques) ou une coloration bleu-noir (tanins galliques) (**Trease & Evans, 1987**).

➤ **Test des glycosides**

Les extraits ont été hydrolysés avec L'HCl dilué, puis soumis à un test de glycosides.

- **Glycoside d'antraquinone (test de Borntrager)** :

H₂SO₄ à 5% (1 mL) a été ajouté à la solution d'extrait (1 mL). Le mélange a été bouilli dans un bain-marie puis filtré. Le filtrat a ensuite été secoué avec un volume égal de chloroforme et maintenu au repos pendant 5 minutes. Ensuite, la couche inférieure de chloroforme a été secouée avec la moitié de son volume avec de l'ammoniac dilué.

La formation de couleur rose à rouge de la couche ammoniacale donne une indication des glycosides d'antraquinone (**Joshi et al., 2013**).

➤ **Test des glucides**

Les échantillons ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée et filtrés. Les filtrats ont été utilisés pour tester la présence de glucides.

- **Test de Fehling** : Les filtrats ont été chauffés avec les solutions A & B de Fehling et de l'eau distillée. La formation de précipitation rouge brique indique la présence de sucres réducteurs (**Deba et al., 2008**).

➤ **Test des saponosides**

- **Test de mousse** : La détection des saponines est réalisée en mélangeant 0,5 g d'extrait de plante avec 2 mL d'eau distillée. Par la suite, cette solution a été agitée dans un cylindre gradué pendant 15 minutes. La présence de saponines a été indiquée par la

formation et la persistance d'une couche de mousse de 1 cm après les 15 minutes (**Banso & Adeyemo, 2006**).

➤ **Test des lipides**

Sur un papier filtre, déposez quelques gouttes de chaque extrait, le papier est ensuite séché. La présence de taches translucides au niveau des gouttelettes indique la présence de lipides (**Bruneton, 2009**).

➤ **Test des coumarines**

1g d'échantillon est placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert d'un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté au bain-marie pendant quelques minutes. 0,5 mL de NH₄OH dilué est ensuite ajouté et deux taches sont posées sur un papier filtre. Le papier est examiné sous U.V, la fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

➤ **Test des gommages et mucilages**

100 mg d'extrait sont dissout dans 10 mL d'eau distillée, et 25 mL d'alcool absolu a été ajouté sous agitation constante. Un précipité blanc ou nuageux indique la présence de gommages et de mucilages (**BeMiller & Whistler, 2012**).

I.4. Quantification des polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux

Les analyses quantitatives des polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux des différents extraits sont déterminées, la raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués.

I.4.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) des échantillons de *S.oleraceus L.* a été évaluée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu comme décrit par (**Singleton & Rossi, 1965**) avec de légères modifications par la méthode des microplaques comme décrit par (**Müller et al., 2010**).

Une solution méthanolique de l'extrait à la concentration de 1 mg/ml a été utilisée dans l'analyse. En bref, 20 µL d'extraits de la plante ont été mélangés avec 100 µL de (1:10) FCR Folin-Ciocalteu et 75 µL de solution de carbonate de sodium (7,5%) dans une microplaque à 96 puits. Après 2 h d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée dans le lecteur de microplaques (Multimode Plate Reader de PerkinElmer, Inc,

EnSpire®, Massachusetts, USA) à 765 nm contre un blanc. Toutes les lectures ont été effectuées en triplicata. Une courbe d'étalonnage a été effectuée en utilisant la densité optique (DO) de l'étalon d'acide gallique (AG). La concentration des phénols totaux (CPT) est estimée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (10 à 100 µg / mL) ($R > 0,99$).

L'équation de régression déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique permet de déterminer la teneur en phénols totaux exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG /mg d'extrait).

I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux (TFT) des différents échantillons a été déterminée en utilisant la méthode des microplaques décrite par (Topçu *et al.*, 2007).

Un volume de 50 µL de l'échantillon (1 mg/mL dans du méthanol) a été mélangé avec 130 µL de MeOH suivi par l'addition de 10 µL d'acétate de potassium et 10 µL de nitrate d'aluminium. Après 40 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 415 nm par un lecteur de microplaques. La courbe d'étalonnage des flavonoïdes a été effectuée en utilisant la quercétine à une concentration allant de 25 à 200 µg / mL ($R > 0,99$). Le TFT est déterminée suite à l'équation de régression linéaire déduite à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg de QE / mg d'extrait).

I.4.3. Dosage des flavonols totaux

La teneur en flavonols totaux (TFIT) a été estimée par la méthode de (Kumaran & Karunakaran, 2007).

Brièvement, un volume de 50 µL d'échantillon (1mg/ml dissoute dans l'eau distillée ou méthanol) a été mélangé avec 50 µL de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et 150 µL d'acétate de sodium. Après deux heures et demi d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 440 nm par un lecteur de microplaques. La courbe d'étalonnage des flavonols a été effectuée en utilisant la quercétine à une concentration allant de 25 à 200 µg / mL ($R > 0,99$). Le TFIT est déterminée suite à l'équation de régression linéaire ($y = 0,211x - 0,193$; $R^2 = 0,996$) déduite à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg de QE / mg d'extrait).

I.5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire par ionisation par électrospray (HPLC–ESI–QTOF–MS)

La détermination de la constitution phytochimique des extraits les plus efficaces (extrait brut, chloroformique, acétate d'éthyle et n-butanol) a été réalisée par les analyses HPLC-QTOF-MS à l'aide d'un système de chromatographie en phase liquide Agilent 6520 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) équipé avec un échantillonneur automatique standard.

La colonne d'HPLC était ZORBAX EPC-18 (Eclipse plus C18) (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) d'Agilent Technologies. Le volume d'injection était de 2 µL et la température de la colonne était de 40 °C, ce qui a été réalisé avec un programme d'élution en gradient à un débit de 0,25 mL/min. Les phases mobiles A et B étaient constituées d'eau ultra purifiée plus 0,1% d'acide formique (A) et 5% d'acétonitrile (B). Le gradient d'élution a été appliqué comme suit : 0 min, 5% B ; 36 min, 95% B ; 41 min, 95% B ; 41,1 min, 5% B ; 48 min, 5% B.

Le système d'HPLC était couplé à un détecteur quadripolaire à temps de vol 'QTOF : Quadrupole-Time-of-Flight' (technologies Agilent), équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI : electrospray ionization source) fonctionnant en mode d'ion positif.

Les valeurs optimales des paramètres ESI-MS étaient les suivantes : azote utilisé comme gaz de séchage à une température de 325 °C, flux de gaz de séchage, 10 L/min ; pression du gaz de nébulisation, 30 psi ; potentiel de tension capillaire, 4000 V et enfin, une tension de fragmenteur de 175 V a été choisie et appliquée aux échantillons. La détection MS a été effectuée dans un intervalle de masse de 100 à 1100 m/z à l'aide d'un analyseur de masse quadropole-ion trap contrôlé par le logiciel Analyst 5.0.

Les quadropoles ont été définis dans une résolution bien définie. Le détecteur MS a été programmée pour l'enregistrement en deux modes consécutifs : l'analyse de la MS (EMS) et de l'analyse de l'ion produit (EPI). L'analyse de la masse a été utilisée pour montrer les spectres de balayage complets, afin d'obtenir un aperçu de tous les ions dans l'échantillon.

Pour l'analyse des échantillons, des extraits (4 mg) ont été dissous dans du méthanol de qualité HPLC à température ambiante. Les échantillons ont été filtrés en passant à travers un disque filtre en nylon millipore (0,22 µm) par un injecteur pour éliminer les particules. Les

données de masse précises des ions moléculaires ont été traitées à l'aide du logiciel «Agilent mass Hunter Qualitative analysis B.05.00 software» (Bruker Daltoniks).

Les spectres ont été enregistrés en mode ion positif entre m/z 100 et 1100. Les composés ont été identifiés en comparant l'information obtenue (leurs données MS) avec les données disponibles rapportées dans la bibliographie.

Chapitre I I

Méthodes

expérimentales des

activités biologiques

I. Tests biologiques

I.1. Activités antioxydantes

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger l'effet antioxydant global d'un extrait, d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (**Cao & Prior, 1998**).

C'est pour cela que l'activité antioxydante des différents extraits a été testée par sept méthodes : le piégeage du radical libre DPPH[•], Galvinoxyle et radical hydroxyle par phénanthroline, décoloration du radical ABTS^{•+} et du β-carotène, chélation des ions ferreux, et réduction cuprique (CUPRAC).

I.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical libre stable de forme synthétique : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]) (figure 7), qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Ce dernier est réduit pour donner du diphénylpicrylhydrazine et un radical phénoxy en acceptant un atome d'hydrogène (**Chaabi, 2008**).

Le piégeage du radical DPPH[•] se traduit par le changement de la couleur de la solution «violette» à une couleur «jaune», ce qui permet de suivre la décoloration et la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde de 517nm (**Chaabi, 2008**).

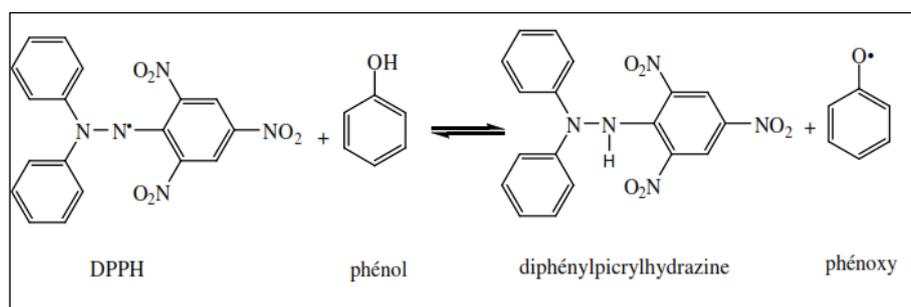


Figure 7 : Réaction d'inhibition du radical DPPH[•] avec un phénol (**Chaabi, 2008**).

La capacité de piégeage des extraits de plante vers le DPPH[•] a été déterminée en utilisant la méthode de (**Blois, 1958**) avec des modifications impliquant l'utilisation d'un système de microplaques à haut débit. Dans une microplaque à 96 puits, 160 μL de la solution méthanolique de DPPH[•] ont été mélangés avec 40 μL de différentes concentrations des extraits et fractions

de (12,5 à 800 µg/mL). Après 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance a été enregistrée à 517 nm contre un blanc en utilisant un lecteur de microplaques (Multimode Plate Reader de PerkinElmer, Inc, EnSpire®, Massachusetts, USA).

BHA, BHT et α -tocophérol ont été utilisés comme contrôle ou standard positif. Le % d'inhibition de l'activité anti-radicalaire a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$IC_{50} (\%) = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}/A_{\text{contrôle}}) \times 100 ; \text{ (équation 1)}$$

Où :

$A_{\text{contrôle}}$: est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait.

$A_{\text{échantillon}}$: est l'absorbance du composé à tester.

Les résultats sont la moyenne des analyses en triplicata, ils ont été enregistrés en moyenne \pm écart type. La concentration d'extrait fournissant une inhibition de 50% (IC_{50}) a été calculée à partir du graphique de DPPH. Une faible valeur de l' IC_{50} indique une forte capacité à neutraliser le radical libre DPPH•.

I.1.2. Test de piégeage des radicaux libres Galvinoxyles

I.1.2.1. Principe

Le DPPH, galvinoxyle et l'ABTS sont des radicaux libres relativement stables couramment utilisés dans les essais antioxydants. Leurs maximum d'absorption caractéristiques dans la région visible disparaissent lorsqu'ils sont piégés, et donc la diminution de ces radicaux peut être facilement surveillée par un spectrophotomètre (Prior *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2001).

Les radicaux DPPH et galvinoxyle acceptent qu'un radical électronique ou hydrogène pour devienne des molécules diamagnétiques stables. De plus, ils sont souvent utilisés comme substrats pour évaluer la capacité antioxydante d'un antioxydant (l'électron non apparié est délocalisé sur l'atome N et sur l'atome O, respectivement).

La DPPH est un radical stable N-centré. La meilleure façon de mesurer l'activité de piégeage des radicaux libres (activité antiradicalaire) serait d'utiliser le radical stable O-centré galvinoxyle (figure 8) qui est plus étroitement lié aux radicaux oxygènes physiologiquement plus actifs que le DPPH (Gunars & Grzegorz, 2010).

Ce radical stable (galvinoxyle) est commercialement disponible ; ses solutions ont le maximum d'absorbance dans la région visible ($\lambda_{\text{max}} = 432 \text{ nm}$) et il est recommandé pour les études avec des composés donneurs d'électrons et d'hydrogène (Shi *et al.*, 2001). Comparé au DPPH, le galvinoxyle est plus réactif envers les composés phénoliques.

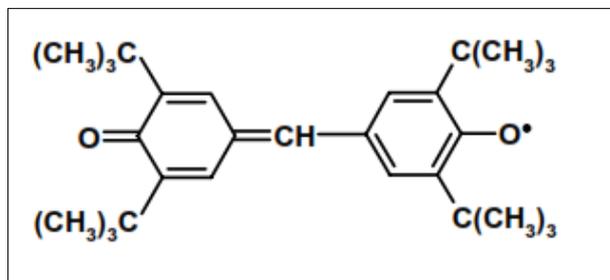


Figure 8 : Structure chimique de galvinoxyle (Gunars & Grzegorz, 2010).

Le galvinoxyle est réduit par des piègeurs de radicaux libres comme les donneurs d'hydrogène comme indiqué dans la **réaction 1** :



Où :

G \cdot : signifie galvinoxyle ; GH : galvinoxyle réduit ; IH : piègeur de radicaux libres donneur d'hydrogène ; et I \cdot : radical correspondant de IH (Shi *et al.*, 2001).

I.1.2.2. Mode opératoire

Ce test est basé sur la mesure de la capacité de piégeage des antioxydants vers le radical stable galvinoxyle (Gox \cdot). Le radical libre Gox \cdot est réduit en GoxH lorsqu'il réagit avec les donneurs d'hydrogène. Cette activité a été évalué par la méthode de Shi *et al.*, (2001).

Brièvement, 160 μL de radical galvinoxyle (0,1 mM) ont été mélangés avec 40 μL de chaque échantillon à différentes concentrations. La réaction a été incubée à température ambiante pendant 2h. La diminution de la concentration en radicaux galvinoxyles a été contrôlée en mesurant l'absorbance à 428 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards positifs. Le % d'inhibition de l'activité anti-radicalaire a été calculé en utilisant l'équation 1 précédente (Shi *et al.*, 2001).

I.1.3. Test de décoloration du radical ABTS^{•+} (Acide 2,2-azino-bis-3-(ethylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)

Le test de décoloration des cations radicalaires ABTS^{•+} a été réalisé selon la méthode décrite par (Re *et al.*, 1999) avec de légères modifications.

La solution d'ABTS⁺ a été préparée en dissolvant l'ABTS dans l'eau à une concentration de 7 mM avec 2,45 mM de persulfate de potassium et en laissant le mélange dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 h avant utilisation ; ce mélange a été ensuite dilué dans l'éthanol ou l'eau distillée pour obtenir une absorbance égale à $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm.

Chaque puits de microplaque contient 40 μ L de l'échantillon testé dans du méthanol à différentes concentrations et 160 μ L de solution ABTS⁺ diluée. Après 10 minutes, l'absorbance à 734 nm a été enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits, puis le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant « **l'équation 1** ». Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards positifs. L'expression des résultats (IC_{50}) sont déterminées sur le même mode que celui décrit pour le test DPPH (Re *et al.*, 1999).

I.1.4. Test de blanchiment du β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

I.1.4.1. Principe

Le β -carotène est physiologiquement un composé antioxydant important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009). Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres oxydent le β -carotène qui est extrêmement sensible entraînant, ainsi, la disparition de sa couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement. La présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et, donc, prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kartal *et al.*, 2007).

I.1.4.2. Mode opératoire

La capacité des extraits à inhiber le blanchiment de l'émulsion de β -carotène–acide linoléique a été déterminé en utilisant la méthode de (Marco, 1968).

La solution mère A est préparée en dissolvant 0,5 mg de β -carotène dans 200 μ L de Tween 40, 25 μ L d'acide linoléique et 1 mL de chloroforme ont été ensuite ajoutés (mixture émulsifiante). Le solvant (chloroforme) a été complètement évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif. 50 mL d'eau distillée oxygénée ont été ajoutés au mélange précédant (résidu), l'émulsion résultante est agitée vigoureusement et l'absorbance a été ajustée à 0,8-0,9 à 470 nm. A 160 μ L de ce mélange, 40 μ L de chaque extrait ont été ajoutés dans les puits des

microplaques. Un blanc sans extrait et sans antioxydant a été utilisé comme contrôle négatif. BHT et BHA ont été utilisés comme contrôle positifs. La microplaque a été incubée à 45 °C et a été mesurée à 470 nm toutes les 30 minutes pendant 2 h (0, 60, 90, 120 min). L'activité antioxydante a été mesurée selon l'équation suivante :

$$AA (\%) = [1 - (A_{t=0} - A_{t=120}) / (Ac_{t=0} - Ac_{t=120})] \times 100$$

Où :

AA(%) : représente l'activité antioxydante ;

$A_{t=0}$: représente l'absorbance des échantillons à 0 min ;

$A_{t=120}$: représente l'absorbance des échantillons à 120 min ;

$Ac_{t=0}$: représente l'absorbance du contrôle négatif (éthanol sans extrait) à 0 min ;

$Ac_{t=120}$: représente l'absorbance du contrôle négatif à 120 min.

La concentration d'extrait fournissant une inhibition de 50% (IC_{50} (t = 120)) a été obtenue en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la solution d'extrait (Marco, 1968).

I.1.5. Activité chélatrice des ions ferreux

L'activité de chélation des ions ferreux (Fe^{2+}) a été mesurée en utilisant la méthode de Ferène ($C_{16}H_{11}N_4NaO_8S_2$) de (Decker & Welch, 1990), qui consiste à suivre l'inhibition de la formation du complexe fer (II)-Ferene.

Le test consiste à préparer tout d'abord les solutions S1 et S2 qui sont composées de :

- $m = 4 \text{ mg } (Fe^{+2}) [0,2 \text{ Mm } FeCl_2, 2H_2O] + 100 \text{ mL } (H_2O) \rightarrow S1$
- $m = 2,5 \text{ mg } (0,5 \text{ Mm Ferène}) + 10 \text{ mL } (H_2O) \rightarrow S2$

Le test a été réalisé en mélangeant 40 μL de MeOH et 40 μL de la solution d'échantillons à différentes concentrations avec 40 μL de Fe^{2+} (0.2 mM) (S1) et 80 μL de ferène (0.5 mM) (S2). L'absorbance a été mesurée après 10 min à 593 nm. Le control est le mélange de $FeCl_2$ et de Ferène, L'EDTA (Éthylène-diamine-tétra-acétique) est utilisée comme un standard antioxydant. Le standard EDTA est testé à des concentrations variant de 12,5 à 800 $\mu\text{g/mL}$. L'activité chélatrice du standard (EDTA) et des différents extraits est exprimée en pourcentage en utilisant « l'équation 1 » (Decker & Welch, 1990).

L' IC_{50} (concentration inhibitrice de 50 %) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour chélater 50% de fer ferreux, calculée graphiquement par des pourcentages

d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits et du standard (Decker & Welch, 1990).

I.1.6. Piégeage des radicaux hydroxyles par le test d'oxydation de la phénanthroline-Fe (II)

I.1.6.1. Principe

Ce test est basé sur la réaction de l'ion ferreux (Fe) avec la 1,10-phénanthroline. L'ion ferreux forme spécifiquement un complexe de tri-phénanthroline rouge-orange qui absorbe au maximum à 508-510 nm (Kolthoff *et al.*, 1950).

Cette méthode a été utilisée régulièrement pour la mesure du fer dans de nombreux types d'échantillons et est considérée comme très sensible pour le même. Elle est très sensible en tant qu'action de piégeage et peut être détectée dans une très faible concentration de piégeur, spécifique, reproductible et surtout capable de détecter la propriété de piégeage d' H_2O_2 des antioxydants phénoliques et non phénoliques.

En termes de chimie, le principe est facile à comprendre (figure 9) :

- Si le peroxyde d'hydrogène est ajouté au tube avant l'ajout de 1,10-phénanthroline, l' H_2O_2 oxyde tous les ions ferreux en ions ferriques qui sont incapables de former un complexe rouge-orange avec la 1,10-phénanthroline et une nette réduction de l'absorbance peut être vue. Ce concept a été exploité pour la détermination d' H_2O_2 dans les échantillons.
- Après l'ajout d'ions ferreux, le piégeur est ajouté et suivi par une quantité connue d' H_2O_2 pendant quelques minutes. Si le piégeur est suffisamment capable de piéger l' H_2O_2 ajouté dans l'échantillon, aucune conversion ferreux en ferrique ne se produirait et ne serait détectée par l'addition de 1,10-phénanthroline qui donne un complexe rouge-orange.
- Inversement, si le piégeur est incapable de piéger l' H_2O_2 , alors l' H_2O_2 convertit tous les ions ferreux en ferrique qui est incapable de former un complexe coloré avec la 1,10-phénanthroline. Par conséquent, la génération du complexe ferreux-triphénanthroline rouge-orange sera directement proportionnelle à la capacité et à la concentration du piégeur (Afşar *et al.*, 1990 ; Bailey & Boltz, 1959).

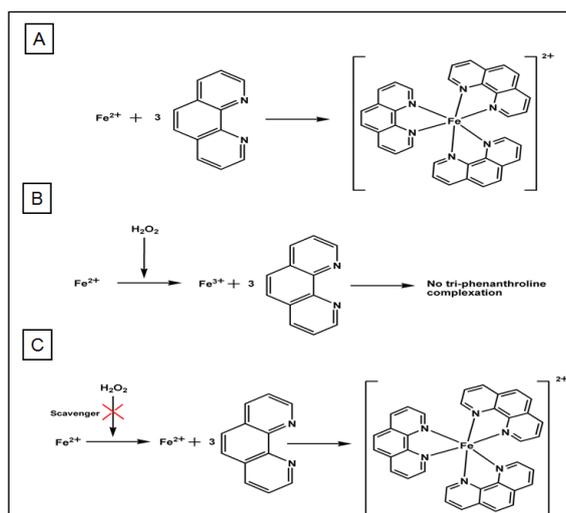


Figure 9 : Illustration schématique de la voie de réaction menant à la détection de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les antioxydants (Debanjan *et al.*, 2016).

- (A) Réaction entre le fer ferreux et la 1,10-phénanthroline et formation d'un complexe de tri-phénanthroline de couleur rouge-orange ;
- (B) Oxydation de l'ion ferreux en ferrique par l' H_2O_2 conduisant à la non-complexation de la 1,10-phénanthroline ;
- (C) L'ajout de piègeur provoque une minimisation de l'effet d' H_2O_2 entraînant la formation d'un complexe de tri-phénanthroline de couleur rouge-orange (Debanjan *et al.*, 2016).

L'effet inhibiteur sur le radical hydroxyle est donc un indice important reflétant l'anti-oxygénation des composés. Dans le dosage de la phénanthroline- $\text{Fe}(\text{II})$, les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) produits dans le système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ peuvent oxyder le phénanthroline- Fe^{2+} en phénanthroline- Fe^{+3} , et le pic d'absorption à 532 nm (A_{532}) a été considérablement réduit. Lorsque les échantillons ont été ajoutés dans le système, le changement d' A_{532} peut être atténué, de sorte que l'étendue de l'atténuation pourrait être le critère d'estimation de la force relative d'anti-oxydation de l'extrait (Zhou & Li, 2009 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

I.1.6.2. Mode opératoire

La méthode de Szydłowska-Czerniak *et al.*, (2008) a été adoptée pour ce test. Le principe repose sur la formation du complexe O-Phénanthroline- Fe^{2+} et sa perturbation en présence d'agents chélatants. Le mélange réactionnel contient 10 μL de diverses concentrations d'échantillons, 30 μL de (0,5%) de la solution de 1,10-phénanthroline dans le méthanol, 50 μL de chlorure ferrique FeCl_3 (0,2%) et 110 μL de MeOH qui ont été incubés dans l'obscurité pendant 20 min à 30°C. L'absorbance du mélange réactionnel a été notée à 510 nm. Le BHT est utilisé en tant que chélateur de métal classique.

En conséquence, le calcul de la capacité des composés ayant une activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été calculé en utilisant l'équation 2 (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008):

$$\% H_2O_2 \text{ scavenging activity} = \frac{A \text{ échantillon}}{A \text{ blanc}} \times 100 \quad \text{équation 2}$$

Où :

A blanc : est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait ;

A échantillon : est l'absorbance du composé à tester ayant une activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène attendue.

I.1.7. La réduction cuprique (CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity assay)

CUPRAC est une méthode antioxydante simple et polyvalente utile pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxy-cinnamiques, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanes, les thiols, les antioxydants synthétiques et les vitamines C et E. En outre, elle ressemble à celle de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dont le cuivre (Cu) est utilisé au lieu de fer (Fe) qui donne en présence du néocuproïne le complexe Cu(II)-Nc. Elle permet de mesurer la réduction des ions cuivriques Cu(II) en ions cuivreux Cu(I) en présence des extraits à tester. Le réactif de cette méthode est beaucoup plus stable que d'autres radicaux, tels que le DPPH et l'ABTS. La présence des composés réducteurs dans les échantillons provoque la réduction de Cu(II) dans le complexe Cu(II)-Nc afin de donner la forme réduite Cu(I)-Nc (Özyürek *et al.*, 2011).

L'activité antioxydante par réduction cuprique (CUPRAC) des différents échantillons a été évaluée selon la méthode de CUPRAC (Apak *et al.*, 2004).

Brièvement, le test comprend le mélange de 40 µL d'extrait à différentes concentrations avec 60 µL du tampon aqueux d'acétate d'ammonium (ACNH₄) à (pH 7.00, 1M), 50 µL de solution alcoolique néocuproïne (7.5 mM), et 50 µL de solution de chlorure de cuivre (II) (CuCl₂, 10mM) dans une microplaque à 96 puits. Après une heure de temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm contre un blanc. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme standards. Les valeurs d'absorbance A_{0,5} (µg / mL) « équation 2 »

ont été calculées à partir de la courbe d'absorbance. La couleur jaune-orange est due au composé Cu(I)-Nc formé (Apak *et al.*, 2004).

I.2. Activité antibactérienne

La technique de diffusion sur milieu solide a été utilisée pour étudier le pouvoir antibactérien des extraits testés, et ce selon la méthode décrite par (Perez, 1990). C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche microbienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. Le support microbien est composé d'*Escherichia coli* ATCC 25922, de *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 MRSA, de *Klebsiella pneumoniae*, qui proviennent du laboratoire de bactériologie, Hôpital Ibn Zohr de Guelma, Algérie.

I.2.1. L'aromatogramme

L'étude du pouvoir antibactérien des différents extraits végétaux est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques (Benzeggouta, 2005).

a- Repiquage des espèces bactériennes et préparation de l'inoculum

Chaque souche bactérienne est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive par la méthode des stries, puis incubées pendant 24 h à 37°C. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées furent prélevées et mises en suspension dans l'eau physiologique (10 mL). Puis cette suspension est ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une DO entre 0,08 à 0,13 à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ $1-2 \times 10^8$ UFC/ mL (0,5 Mc Farland) (Bonnet *et al.*, 2013).

b- Préparation des extraits et imprégnation des disques

Des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol ou DMSO sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif. Les différents extraits sont utilisés à différentes doses : 50, 100 et 200 mg /mL. Une fois les géloses Muller – Hinton (MH) sont inoculés avec la souche, les disques ont été imbibés de chaque extrait (10 µL de chaque concentration) et placé sur la surface de la gélose MH à l'aide d'une pince stérilisée au bec benzen. Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs sont : Ampicilline (AMP), Céfalexine (CN), Pénicilline .G (P), Vancomycine (VA) ; ils sont déposés également à la surface de la gélose inoculée au préalable.

c- Incubation et Lecture du résultat

Après un temps de latence ou incubation à 37°C, si la molécule est toxique pour l'espèce microbienne, il se forme une zone ou un halo d'inhibition autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible. Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé. Les diamètres des zones d'inhibition 'DZI' formées au tour des disques sont mesurés et enregistrés à l'aide d'un pied à coulisse (Benzeggouta, 2004).

I.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in-vitro*

I.3.1. Méthodes d'anti-dénaturation de l'albumine (dénaturation du BSA)

I.3.1.1. Principe

Le modèle de la dénaturation de l'albumine a été choisi pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires *in-vitro* des différents extraits de la plante. Le principe de cette technique est basé sur la capacité des extraits à empêcher la dénaturation thermique de l'albumine bovine sérique. La dénaturation de l'albumine sous l'effet de la chaleur aboutit à un mime de l'expression d'antigènes associés à une hypersensibilité de Type III, réaction impliquée dans des maladies telles que les maladies sériques, la glomérulonéphrite... etc (Verma *et al.*, 2011).

I.3.1.2. Mode opératoire

L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* des différents extraits est déterminée par la méthode de (Kandikattu *et al.*, 2013) avec de légères modifications.

- 1) Le mélange réactionnel (1mL) est constitué de 0,5 mL de chaque extrait à différentes concentrations (100, 500 et 1000 µg/mL) et 0,5mL de la solution aqueuse du sérum bovine d'albumine (BSA : Bovine serum albumin) 0,2%, préparé dans Tris HCl pH : 6,6). Chaque concentration est répétée 3 fois.

2) Préparation des blancs

- ✚ Pour chaque concentration d'extrait de plante un blanc extrait est préparé dans lequel 0,5 mL d'extrait est ajouté à 0,5 mL de Tris-HCl (Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus).
- ✚ Un blanc BSA contenant 0,5 mL de la solution de BSA ajouté à 0,5 mL du solvant utilisé pour les extraits (le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA en absence de substance inhibitrice).

Les tubes préparés au-dessus sont incubés à 37°C pendant 15 min. puis chauffés à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement, la turbidité des échantillons a été mesurée par spectrophotomètre à 660 nm. Le diclofénac de sodium (250 µg/mL) est utilisé comme standard (contrôle positif). L'expérience a été réalisée en triple. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right] * 100$$

Abs_{contrôle} : Variation d'absorbance à 660nm du contrôle.

Abs_{échantillon} : Variation d'absorbance à 660nm de la BSA en présence de l'extrait de *Sonchus* (essai).

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

I.4. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) a été mesurée par la méthode spectrophotométrique légèrement modifiée d'Ellman *et al.*, (1961) dans un lecteur de microplaques à 96 puits. L'iodure d'acétylthiocholine a été utilisé comme substrats de la réaction avec le DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) pour la mesure de l'activité cholinestérasique.

Brièvement, 150 µL de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 8,0), 10 µL d'échantillon à différentes concentrations dans le méthanol (3,125-200 µg/mL) et 20 µL de l'enzyme AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 25°C. Par la suite, la réaction a été initiée en ajoutant 10 µL de DTNB (0,5 mM) et 10 µL de la solution de substrat d'iodure d'acétylthiocholine (ACI) (0,71 mM). L'hydrolyse du substrat a été surveillée spectrophotométriquement par la formation d'anion jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate résultant de la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine, à une longueur d'onde de 412 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96- puits (Perkin Elmer, Enspire).

Un blanc avec du tampon Tris et d'éthanol au lieu d'une solution enzymatique a été utilisé. L'absorbance a été mesurée toutes les 5 min pendant 15 min. Un mélange témoin (contrôle) a été préparé, en utilisant l'éthanol au lieu de l'extrait et a été considéré comme une activité à 100%. Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme AChE a été déterminé par

comparaison de la réaction de l'échantillon comportant l'extrait par rapport à l'échantillon à blanc à l'aide de la formule suivante:

$$I(\%) = (E - S)/E * 100.$$

Où :

E : est l'activité de l'enzyme sans extrait ;

S : est l'activité de l'enzyme à la présence de l'extrait.

Les mesures ont été effectuées en triplicata et la Galantamine a été utilisée comme contrôle positif. La concentration d'extrait fournissant une inhibition de 50% (IC₅₀) a été déterminée en traçant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de la solution d'extrait.

I.5. Activité photoprotectrice (détermination *in-vitro* du facteur de protection solaire FPS ou sun protection factor 'SPF')

I.5.1. Principe

L'activité FPS est déterminée par la méthode de Mansur *et al.*, (1986). Les extraits ont été dilués dans le méthanol pour obtenir une concentration de 2 mg/mL. 200 µL des différents échantillons ont été mis dans une microplaque à 96 puits et ont été mesurés par spectrophotomètre entre 290 à 320 nm, à des intervalles de 5 nm, en prenant le méthanol comme blanc. Toutes les lectures ont été prises en triplicata à chaque point. La valeur du FPS a été calculée par l'application de l'équation mathématique développée par Mansur *et al.*, (1986) :

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Où :

EE (λ) : est le spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum) ;

I (λ) : est le spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum) ;

Abs (λ) : est l'absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product) ;

CF : est le facteur de correction (correction factor : 10).

Les valeurs de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ sont des constantes, et elles ont été déterminées par (Sayre *et al.*, 1979) (tableau 4).

Tableau 4 : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF (Mansur *et al.*, 1986).

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

Le tableau 5 ci-dessous montre les calculs du SPF par le logiciel XL-stat 2010, en tenant compte que la valeur du CF qui est égale à 10.

Tableau 5 : Calcul de la SPF par l'application de l'équation mathématique de (Mansur *et al.*, 1986 ; Dutra *et al.*, 2004).

λ (nm)	Ab1	Ab2	Ab3	CFx EE(λ) x I(λ)x Ab (λ)1	CFx EE(λ) x I(λ)x Ab (λ)2	CFx EE(λ) x I(λ)x Ab (λ)3		
290	2,079	2,007	2,191	0,31185	0,30105	0,32865		
295	2,117	2,042	2,223	1,729589	1,668314	1,816191		
300	2,158	2,083	2,273	6,202092	5,986542	6,532602		
305	2,226	2,152	2,338	7,296828	7,054256	7,663964		
310	2,355	2,287	2,484	4,38972	4,262968	4,630176		
315	2,595	2,53	2,731	2,172015	2,11761	2,285847		
320	2,978	2,91	3,052	0,53604	0,5238	0,54936	Moyenne	SD
			Somme (SPF)	22,64	21,91	23,81	22,79	0,95

Le tableau 6 permet de classer les résultats du SPF comme : faible, moyenne, haute et très haute protection de nos échantillons selon les recommandations de la Commission Européenne 2006 (More *et al.*, 2013 ; Mishra *et al.*, 2011 ; Verheugen, 2006).

Tableau 6 : Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la Recommandation de la Commission Européenne 2006 (More *et al.*, 2013 ; Mishra *et al.*, 2011 ; Verheugen, 2006).

Catégorie Indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré	Facteur de protection UVA minimal recommandé	Longueur d'onde critique minimale recommandée
« Faible protection »	6	6 - 9,9	1/3 du facteur de protection solaire indiqué sur l'étiquette	370 nm
	10	10 - 14,9		
« Protection moyenne »	15	15 - 19,9		
	20	20 - 24,9		
	25	25 - 29,9		
Haute » « protection »	30	30 - 49,9		
	50	50 - 59,9		
« Très haute protection »	50+	60 ≤		

I.6. Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait brut et acétate d'éthyle de *Sonchus oleraceus* L.

I.6.1. Toxicité aiguë

I.6.1.2. Matériel animal

Afin d'éviter la variabilité intersexe, nous n'avons utilisé que des souris femelles adultes de souche Wistar (*Mus musculus*) pesant entre 21 et 36 g. Les animaux ont été fournis du laboratoire de l'Institut Pasteur d'Alger, et hébergés à « l'Animalerie de Département de biologie, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie » dans des conditions expérimentales standard, où ils ont été marqués deux fois par semaine afin de préserver leur identité dans chaque lot. Les animaux ont été répartis en plusieurs lots et conservés dans des cages en polypropylène avec copeaux de bois et d'une porte étiquette où sont mentionnés le nom du lot, le traitement subi, ainsi que les dates d'expérimentation. Les souris sont soumises pendant 7 jours à une période d'adaptation avant chaque expérimentation, où elles ont un accès libre à l'eau ad libitum (à volonté) et à l'aliment sous des conditions de lumière et de température contrôlées (cycle de lumière/obscurité de 12 h à 27±2°C). Les expériences ont été menées

conformément aux directives internationalement acceptables pour l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des médicaments à base de plantes (OECD, 2008).

I.6.1.3. Détermination de la (DL₅₀) de l'extrait brut et acétate d'éthyle de *Sonchus oleraceus* L.

La toxicité aiguë se manifeste rapidement après une prise unique à court terme. L'étude de la toxicité orale aiguë des extraits bruts et acétate d'éthyle (EBr, EAe) de la plante *S.oleraceus* L., a été menée suivant la méthode décrite par Lorke (Lorke, 1983). Elle consiste à déterminer la dose létale 50 % (DL₅₀), qui est la dose d'une substance chimique capable de tuer, par la voie d'administration choisie, la moitié des animaux mis en expérience. Elle s'exprime en milligramme de matière active par kilogramme d'animal ; plus la DL₅₀ est petite, plus la substance est toxique (Odula *et al.*, 2007).

I.6.1.4. Préparation des solutions à base d'extrait brut et d'extrait acétate d'éthyle

Les animaux ont été mis à jeun de nourriture et non d'eau pendant une nuit (12 h) avant l'administration des doses. Ils sont pesés et marqués juste avant l'administration des extraits. C'est le poids à jeun qu'on utilise pour le calcul de la quantité d'extrait à administrer. La concentration est en fonction du poids des animaux, du volume à injecter et de la dose. Les concentrations des deux extraits (EBr, EAe) (10, 100, 1000, 1600, 2900 et 5000 mg/kg) sont préparées extemporanément. Les extraits sont dilués dans le DMSO à 1% et l'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%), respectivement en fonction de la concentration désirée (Parimelazhagan, 2015).

La DL₅₀ des extraits (EBr et EAe) de *Sonchus oleraceus* L. n'est pas connue dans la littérature consultée ainsi la recherche d'une éventuelle toxicité de la plante est nécessaire. Pour ce faire, deux solutions à différentes concentrations des deux extraits de la plante, sont préparées séparément et administrées à raison d'un volume de 1 mL/kg par gavage à l'aide d'une sonde à sept lots de six souris (n=6). Un septième lot servant de témoin est gavé à l'aide de la (solution DMSO ou l'eau physiologique) sans extrait (Parimelazhagan, 2015).

I.6.1.5. Méthode d'étude

La procédure s'est déroulée en deux phases.

Dans la première phase, les souris (n = 6, chaque dose) ont reçu oralement EBr et EAe à des doses de (10, 100 et 1000 mg/kg p.c). Toutes les souris ont été maintenues dans les mêmes

conditions et surveillées pour les signes de toxicité ou la mortalité pendant 24 h. De plus, un quatrième groupe a été utilisé comme groupe témoin ne recevait que du DMSO à 1% pour l'EBr et que du NaCl 9‰ pour l'EAc. Par la suite, les symptômes possibles sont observés et le nombre de morts au bout du temps imparti (les premières 15 min, ensuite les 1^{ère} h, 2^{ème} h, 4h, 6h et 24 h) (**Lorke, 1983**). Le lendemain on note les signes de mortalités puis on réalise la 2^{ème} phase.

La deuxième phase implique l'utilisation de 18 souris pour chaque extrait. Ils ont été divisés en trois groupes de 6 souris et ont reçues les deux extraits (1600, 2900 et 5000 mg/kg p.c). Elles ont été observés périodiquement au cours des premières 24 heures pour tout effet toxique (diarrhée, fatigue, signe de douleur, difficulté à se déplacer,...etc), puis une fois par jour pendant 14 jours, en notant les variations de poids, le taux de mortalité et toutes modifications physique et comportementale (**Lorke, 1983 ; Malone & Robichaud, 1962**).

La toxicité aiguë a été exprimée par la dose requise/kg de poids corporel (DL₅₀) (**Lorke, 1983**). La LD₅₀ est calculée par la formule suivante :

$$LD50 = \sqrt{D0 \times D100}$$

D_0 = dose la plus élevée sans mortalité,

D_{100} = dose la plus faible ayant entraînée la mortalité.

I.6.2. Evaluation *in vivo* de la toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë concerne les effets nocifs dus à la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes (**OCDE, 1979**). La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés (**OCDE, 2008**).

I.6.2.1. Principe de l'essai

Pour la détermination de la toxicité subaiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par les directives 407 d'OCDE (**OCDE, 2008**). La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de souris, à raison d'un niveau de dose par groupe, pendant une période de 28 jours. La sélection des doses

a été faite sur la base d'une étude de toxicité orale aiguë selon les lignes directrices 425 de l'OCDE (OCDE, 2008). Chaque jour au cours de cette période, les souris sont examinées soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les souris qui meurent et même les survivantes sont autopsiées. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voie orale. L'expérience sur les animaux a été réalisée dans le strict respect des normes éthiques des lignes directrices internationales pour l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des plantes médicinales (Organisation de coopération et de développement économiques 'Organisation for Economic Co-operation and Development') (OCDE, 2008).

I.6.2.2. Mode opératoire

Le protocole consiste à suivre les étapes suivantes :

A. Répartition des souris en lots

Les souris femelles âgées de 5 à 7 semaines, ont été réparties selon l'homogénéité de leur poids sur 5 Lots (n=6 femelles) de 30 souris chacun. Chaque lot reçoit des différentes doses à raison d'un niveau de dose par groupe :

Groupe 1 (lot témoin) : les souris ont reçu uniquement de l'eau physiologique (0.9% de la solution de NaCl) pour l'EAE ou le DMSO pour l'EBR ; alors que les groupes 2-5 ont reçu 250, 500, 1000 et 2000 mg/kg d'extrait des parties aériennes de *S. oleraceus L.*, respectivement, par voie orale une fois par jour pendant 28 jours. Le temps de dosage (approximativement à 11h) pour les animaux a été maintenu tout au long de l'étude afin de minimiser la variation biologique entre les animaux (OCDE, 2008).

B. Administration de l'extrait

Lors de cette étude, les souris ont été laissées à jeun la veille du teste. L'administration des extraits [EBR, EAE] de *S. oleraceus L.* ont été effectuée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, quotidiennement sept jours sur sept, sur une période de 28jours (OCDE, 2008).

C. Étude observationnelle

Toutes les souris ont été observées individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes, périodiquement pendant les 24 premières heures, avec une attention particulière pendant les 4 premières heures, et quotidiennement par la suite, pendant un total de 28 jours. Les paramètres d'observation directe comprenaient les changements de comportement, la consommation alimentaire, l'activité motrice, la réponse au toucher, la réponse à la douleur. Les tremblements, les convulsions, le réflexe de redressement, le tordage, l'urination, la salivation et la couleur de la peau des souris étaient les autres paramètres observés tout au long de l'étude (Hor *et al.*, 2012).

D. Etude de l'évolution pondérale des souris

Le poids corporel des souris utilisées dans cette étude a été mesuré, avant l'administration de l'échantillon, puis chaque 7 jour après l'administration à l'aide d'une balance électronique de précision KERN, ABJ-NM (ABS 220-4N) (OCDE, 2008). Le poids des animaux est obtenu à J0 (P_0) avant toute administration, puis chaque semaine sur 28 jours donnant donc le poids à Jn (P_n). Pour les organes, ils ont été prélevés et pesés après le sacrifice des animaux donnant pour chaque organe. Ainsi, le poids des organes des animaux traités a été comparé à celui des animaux témoins.

L'expression du gain ou de la perte du poids des animaux ou des organes s'exprime en pourcentage (P %), et est déterminé selon (Galtier *et al.*, 1974).

I.6.2.3. Sacrifice des animaux et observation macroscopique

A. Poids des organes

À la fin de la période d'observation, tous les animaux ont été pesés puis sacrifiées par dislocation cervicale. Cette étape a été suivie de la dissection des animaux sur une surface de travail après avoir fixé les pattes ainsi que la peau à l'aide d'épingles. Par la suite, une incision a été faite tout le long de la ligne médiane ventrale à l'aide d'une paire de ciseaux.

Le foie, ainsi que d'autres organes (la rate, le cœur, les poumons et les reins) ont été rapidement prélevés, rincés avec de l'eau physiologique (NaCl à 0.09%) et observés macroscopiquement *in situ* pour des changements pathologiques (aspect, taille et couleur) à l'aide d'un microscope de dissection Leica Optika B-192 après d'être extraits du corps des souris, puis pesés avec une microbalance pour ensuite être mis dans des boîtes de prélèvement contenant le fixateur qui est le formol à 10%.

Ils ont été conservé pour une évaluation histopathologique dans le centre de Recherche en Biotechnologie «Crbt» Constantine-Algérie. Le poids relatif des organes de chaque animal a ensuite été calculé en rapportant le poids absolu des organes et le poids corporel de l'animal le jour du sacrifice. Les poids de ces organes ont également été pris et les rapports moyens pondéraux organe-corps ont été calculés et comparés à ceux du groupe témoin (Lorke, 1983).

I.6.2.4. Préparation du plasma et analyse biochimique

A. Dosage des paramètres biochimiques sériques

L'analyse biochimique a été investiguée à la fin de la période d'expérimentation. Les animaux jeûnaient 4 h puis étaient sacrifiés par décapitation. Les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes d'héparine puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Le sérum est récupéré puis conservé au froid (4 °C) en vue des analyses biochimiques.

Les paramètres biochimiques plasmatiques : glycémie, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, lipoprotéines de haute densité (HDL : high density lipoprotein), lipoprotéines de basse densité (LDL : low density lipoprotein), alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT), phosphatase alcaline (PAL), protéines totales, bilirubine totale (bilirubine directe et indirecte), et acide urique, ont été analysés colorimétriquement en utilisant un analyseur automatique des laboratoires. Les mesures sont effectuées à une longueur d'onde caractéristique pour chaque dosage. Le dosage des paramètres analysés est accompli par des kits spéciaux prêts à l'emploi.

B. Dosage des paramètres hématologiques

Les échantillons de sang d'animaux traités et témoins ont été collectés dans des tubes EDTA pour une étude hématologique. Les paramètres suivants : Mesure des cellules de globules blancs (GB : globules blanc ou WBC : white blood cells), neutrophiles (N), lymphocytes (L), éosinophiles (E), monocytes (M), basophiles (B), paramètres CBC, globules rouges totaux (GR : globules rouge ou RBC : red blood cells), hémoglobine (Hb), volume corpusculaire moyen 'VCM' (MCV : mean corpuscular volume), l'hémoglobine corpusculaire moyenne (MCH : mean corpuscular hemoglobin), la concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire (MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration), la numération plaquettaire (platelet count), le volume plaquettaire moyen (MPV : mean platelet volume), ont été déterminés à l'aide d'un humalyzer au niveau du laboratoire d'analyse.

I.6.2.5. Etude histopathologique

A. Préparation des blocs et fixation des pièces

Les étapes suivantes ont été réalisées au niveau du laboratoire d'histologie et de cytogénétique sur les produits chimiques au Centre de Recherche en Biotechnologie 'Crbt' de Constantine, Algérie.

Les organes vitaux préalablement fixés dans le formol à 10 % sont disposés dans des cassettes qui sont ensuite placées dans un automate (Leica Optika B-192). Les fragments des organes sont d'abord déshydratés par submersion dans des bains d'éthanol à des concentrations croissantes (60 %, 70%, 90%, 95% et 100%) pour une durée d'une heure chacune. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion (Alturkistani *et al.*, 2016).

Les échantillons subissent deux bains de xylène pendant 2h. Cette étape élimine toute trace d'éthanol dans l'échantillon (Alturkistani *et al.*, 2016).

L'inclusion (imprégnation), a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine fondue à 56°C pendant 12h. Le xylène occupe la place de l'eau et par conséquent facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. A l'aide d'un appareil d'inclusion, Les 3 organes (foie, rein et poumons) sont placés dans des moules métalliques et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

B. Enrobage et confection des coupes

Les échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis mis dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide. Après cela, les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine pour la réalisation des coupes. Par la suite, les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés dans un microtome (Leica Optika B-192) afin de confectionner des coupes d'environ 5 µm d'épaisseur. Ces rubans ont été déposés sur des lames marquées, puis immergées un court instant dans un bain marie de 60°C. Après cela, les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pendant une durée de 30 minutes, avant d'être immergées dans un solvant (bain de xylène) pendant la même durée de temps afin d'éliminer toute trace de paraffine, et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

C. Coloration et montage des lames

La coloration des lames s'est faite suivant le protocole de coloration à l'Eosine/Hématoxyline de Mayer (HE : l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (Kierszenbaum, 2006).

Brièvement, pour mettre en évidence les cellules des organes, les coupes sont d'abord déparaffiner et réhydratées par submersion successive dans les bains suivants : bain de xylène (20 min), bains d'éthanol (20 min à 100%, 10min à 90%, 10min à 70%). Après rinçage dans de l'eau de robinet (3 min), les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline (4 min) pour colorer les noyaux. L'excès de colorant est enlevé par un bain d'eau de robinet (3min), puis passer à l'alcool acide (10 min) et subir un rinçage avec l'eau de robinet. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (1 min) pour colorer le cytoplasme et l'excès de colorant est enlevé par l'eau courante 3 fois. La lame est déshydrater en la passant dans l'alcool absolu (EtOH 5min 70%, 10min 100%), ensuite la plonger dans un bain de xylène pendant 10mn, égoutter les lames et les faire sécher à l'aide d'une gaze.

Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles à l'aide d'une solution permettant l'adhésion (résine) sur la lame et les lames sont prêtent à l'observation au microscope optique à différents grossissements.

D. Observation microscopique

Les analyses des différents organes ont été réalisées à l'aide d'un microscope Optika B-192B500Ti-5 (10 et 40 ×) (Leica Optika B-192) afin de vérifier les altérations des tissus. Les images numériques ont été obtenues à l'aide d'un appareil photo (Martey *et al.*, 2010).

I.7. Evaluation de l'activité antiproliférative

L'effet anti-prolifératifs ou anti-cancéreux des extraits étudiés repose sur la méthode décrite par (Mosmann, 1983), il est déterminé par le test MTT *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophage monocyte de murin J774.A1 (sarcome des cellules du réticulum).

I.7.1. Test au MTT

Ce test basé sur l'estimation du taux de croissance globale des cellules permet de déterminer la viabilité cellulaire par colorimétrie. Le MTT ou (bromure de 3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) est un colorant jaune de type tétrazolium qui est réduit par les enzymes mitochondriales (la succinate déshydrogénase notamment) en cristaux de formazan coloré en bleu et insoluble dans l'eau (figure 10). La dissolution des cristaux de formazan dans le DMSO donne alors une solution dont la coloration bleu violet est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Arnould *et al.*, 1990). La réduction du MTT semble dépendre majoritairement de l'activité des déshydrogénases mitochondriales, mais aussi

des activités des déshydrogénases cytoplasmiques étroitement associées à la glycolyse. Seules les cellules dont les mitochondries sont viables vont donner cette réaction ; en conséquence, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle au degré d'intégrité des mitochondries. Il s'agit d'un test utile pour détecter des composés cytotoxiques (**Mosmann, 1983**).

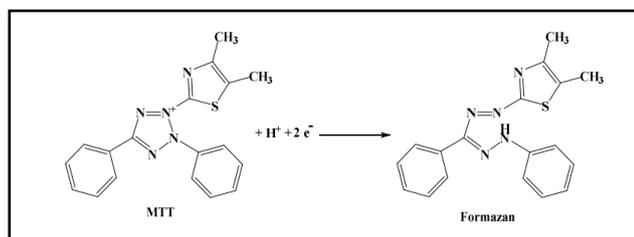


Figure 10 : Schéma de la transformation du bromure de 3(4,5diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) en formazan par les cellules métaboliquement actives (Arnold *et al.*, 1990).

I.7.2. Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées

La lignée cellulaire de macrophage de murin (J774.A1) a été achetée à l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) et utilisée pour évaluer l'activité antiproliférative des différents extraits des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.* Tous les milieux et sérums ont été achetés à HyClone (Euroclone, Paignton, Devon, UK) ; le MTT [3 (4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-phényl-2H-tétrazolium bromide] a été acheté à Sigma Chemicals (Milan, Italie). La culture cellulaire a été maintenue à 37°C dans un incubateur à CO₂ humidifié de Hera Cell (Laboratoire Kandro, Allemagne) avec 5% de CO₂.

I.7.3. Test antiprolifératif de MTT

Les cellules (J774.A1) ont été mises en suspension dans des milieux de culture complets. Elles ont été cultivées en adhérence sur des boîtes de Pétri et maintenues avec le milieu (DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium), (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (FCS : foetal calf serum), 25 mM d'HEPES, 2 mM de glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine à 37°C dans un incubateur à CO₂ humidifié de Hera Cell (Laboratoire Kendro, Hanau, Allemagne) avec 5 % de CO₂. Environ 100 mL de la suspension cellulaire avec une concentration de 3.4×10^4 cellules/puits, ont été placées sur une microplaque à 96 puits et laissées à adhérer à 37°C dans 5% de CO₂ et 95% d'air pendant 24 h. Par la suite, le milieu a été remplacé par 90 µL de milieu frais, et une aliquote de 10 µL de dilution en série de chaque extrait à tester à une

concentration de (12,5 à 100 µg/mL) ont été solubilisés dans du DMSO (max 5% (V/V) puis dilué dans du DMEM, ensuite ajoutée et les cellules ont été incubées pendant le temps du test.

L'incubation a été effectuée pendant 24 h dans l'obscurité et à la fin de la période, 25 µL de MTT à une concentration de 5 mg/mL a été ajouté à chaque puits. Après 3 heures d'incubation, les cellules ont été lysées et les cristaux bleu foncé de formazan ont été dissous par 100 µL d'une solution de tampon de lyse contenant 50% (v:v) de N,N-diméthylformamide, 20% (w:v) de SDS avec un pH ajusté à 4,5. La viabilité cellulaire a été évaluée par un essai de conversion MTT (Bianco *et al.*, 2012). La densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre à microplaques ELISA (Titertek Dasit, Cornaredo, Milan, Italy) (Marzocco *et al.*, 2015) équipé d'un filtre de 620 nm (longueur d'onde de référence). Les puits avec des cellules non traités sont considérés comme témoins. Une diminution de l'absorbance de la solution indique une diminution de la viabilité cellulaire et donc une cytotoxicité du composé testé.

La concentration d'essai qui inhibe 50% de la population cellulaire (IC₅₀) a été obtenue par analyse de probits (SPSS Version 12.0.1, Chicago, IL, USA). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. La viabilité de chaque lignée cellulaire en réponse au traitement avec des concentrations graduées des différents extraits de *Sonchus* ont été calculés en :

$$\% \text{ de cellules vivantes} = 100 - (\text{DO traité} / \text{DO de contrôle}) \times 100.$$

Des courbes ont été tracées, le pourcentage de survie en fonction des concentrations testées pour tous les extraits testés, les valeurs des IC₅₀ pour chaque lignée cellulaire ont été déterminées graphiquement pour les obtenir, nous extrapolons entre deux concentrations connues qui encadrent l'IC₅₀ (Carmichael *et al.*, 1988).

I.8. Analyse statistique

Les tests statistiques et les graphes ont été faits grâce à un logiciel informatique d'analyses statistiques nommé logiciel IBM SPSS statistics V20 (SPSS Inc). Toutes les données expérimentales ont été enregistrées comme moyenne±SD ou SEM (moyenne de l'erreur type) d'au moins *triplicat* des expériences. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour analyser la différence entre deux groupes indépendants (tests *in vivo*). L'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie du post-hoc test de Tukey, la différence de moindre importance (LSD : Least Significance Difference), les tests post-hoc Dunett's et le test d'homogénéité des variances par le test de Levene ont été effectués pour la comparaison de trois

groupes indépendants ou plus. Le test non paramétrique de Dunnett's a été utilisé pour la comparaison de la variance des témoins à celle des autres lots ainsi que de la comparaison de la variance des paramètres à J0 par rapport aux autres jours. L'analyse statistique a été effectuée par l'analyse du test de variance et des comparaisons multiples ont été faites par le test de Bonferroni pour le test de MTT. La différence entre deux variances était significative, si $p < 0,05$.

Partie III

Résultats et

discussion

Chapitre I

Etudes phytochimiques

de l'espèce *Sonchus*

oleraceus L

I.1. Rendement de l'extraction par différents solvants

Le rendement des différents solvants d'extraction ont été calculés pour les parties aériennes de *S.oleraceus L.* (SO). Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport au poids de la poudre végétale. Ces éléments sont présentés dans le tableau 7.

Les rendements de l'extraction varient de 0,14 à 41,73 %, dans laquelle l'extrait de phase aqueuse et l'extrait éthanolique ont donné les rendements les plus élevés avec des valeurs de 41,73 % et 33,10%, suivi par l'EBr, EBU, EAD, EAT et EAM. Les pouvoirs d'extraction des extraits acétate d'éthyle et chloroformique ont les plus faibles rendements d'extractions avec un pourcentage de 1,86% et 0,14% respectivement (Tableau 7).

Tableau 7 : Rendement d'extraction (%) de *S.oleraceus L.* par différents solvants.

Extraits	Couleurs/Aspects	Rendements (%)
EBr	Pate marron	28.55
ECh	Poudre jaune	0.14
EAc	Pate marron foncé	1.86
EBu	Pate visqueuse marron foncé	18.31
EPa	Pate visqueuse marron	41.73
EAM	Poudre marron foncé	06.50
EAD	Pate marron foncé	10.92
EE	Pate verte foncé	33.10
EAT	Pate verte foncé	07.82

Les échantillons sont : « EBr : extrait brut, ECh : extrait chloroformique, EAe : extrait acétate d'éthyle, EBU : extrait butanolique, EPa : extrait phase aqueuse, EAM : extrait aqueux macéré, EAD : extrait aqueux décocté, EE : extrait éthanolique et EAT : extrait alcaloïde total.

Le rendement d'extraction de *S. oleraceus L.* est fortement influencé par la méthode et le solvant d'extraction. Le solvant le plus polaire, l'éthanol possédait le rendement le plus élevé tandis que le chloroforme entraînait le rendement le plus faible. Le rendement d'extraction a été déterminé comme indicateur des effets des différents types de solvants sur les conditions d'extraction (Dhanani *et al.*, 2017).

La présente étude a montré que la polarité la plus élevée de solvants comme la combinaison d'eau et de méthanol possédait un rendement élevé significatif ; indiquant que

l'efficacité d'extraction favorise les solvants les plus polaires. Les résultats d'étude de (Makkawi *et al.*, 2010) sur *S.oleraceus* ne sont pas en accordance avec nos résultat, où l'extrait aqueux chaud avait un rendement plus élevé que l'EE. (Khan *et al.*, 2012a) ont montré que l'EBr possède le plus haut rendement par rapport à d'autres extraits de la même plante, ce qui est en accord avec notre étude. Nos résultats sont en accordance également avec l'étude de (Chatha *et al.*, 2012), qui ont décrit que le rendement maximum en extrait était obtenu à partir d'une extraction aqueuse au méthanol. De même, le rendement en tige de *Ceiba pentandra* était le plus élevé en méthanol, tandis que l'extrait d'hexane qui est le solvant le moins polaire avait le plus faible pourcentage de rendement (Ibrahim *et al.*, 2017). Selon les résultats des auteurs (Truong *et al.*, 2019), dans les mêmes conditions d'extraction, le solvant a été reconnu comme l'un des paramètres les plus importants pour déterminer le rendement d'extraction. Sur la base des résultats actuels, nous pouvons conclure que l'utilisation combinée d'eau et de solvant organique, en particulier le méthanol, et l'éthanol pure sont les meilleurs solvants à utiliser pour l'extraction des métabolites secondaires pour obtenir un meilleur rendement ; en facilitant ainsi l'extraction de produits chimiques solubles dans l'eau et/ou le solvant organique.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, tels que la nature du solvant d'extraction, la taille des particules, la température, le temps d'extraction, le degré d'agitation et le coefficient de diffusion du solvant. Alors, l'utilisation d'un mélange hydro-alcoolique comme solvant donne des résultats satisfaisants dans un processus d'extraction (Perva-Uzunalić *et al.*, 2006).

I.2. Profils phytochimiques qualitatifs des extraits de *S.oleraceus* L.

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux de la mise en évidence des métabolites secondaires sur les différents extraits de la partie aérienne de la plante sont illustrés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Profils phytochimiques des différents extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus* L.

Phytocomposés	EBr	ECh	E Ae	EBu	EPa	EAD	EAM	EE	EAT
Polyphénols	+++	+	+	+	-	+	+	+	
Flavonoïdes	++	+	+	+	+	++	+	+	
Alcaloïdes	+	-	++	-	+	+	++	+	+++
Stérols et triterpènes	+++	-	+	-	-	+	+	+	
Tanins	+ T.G	-	+	+	-	+ T.C	-	+T.C	
Glycoside d'anthraquinone	+++	+	+	+	++	+	-	-	
Composés réducteurs	+++	-	+	+	+++	+++	-	+	
Saponosides	-	-	-	-	-	-	+	-	
Lipides	-	+++	-	-	-	-	+	-	
Coumarines	-	-	+	+	-	+	-	-	
Gommes et mucilages.	-	-	+	-	-	-	+	+	

+++ : Présence confirmée ; ++ : présence modérée ; + : présence en tant que trace ;

- : absence. TG : Tannin gallique, TC : Tannin catéchique.

Le tableau montre une richesse relative en métabolites secondaires analysés de l'extrait hydro-méthanolique (EBr) par rapport aux autres extraits. L'EBr renferme sept composés du métabolisme secondaires avec une présence plus au moins importante en : polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, stérols et triterpènes, tannins galliques, glycosides d'anthraquinones et composés réducteurs. Le screening chimique a montré également l'absence de quatre principes actifs dont l'importance en phytothérapie est non négligeable tels que, les saponosides, les coumarines, les lipides, les gommes et mucilages.

L'EAD contient aussi tous les phytoconstituants de l'EBr à l'exception de la présence des tannins catéchiques et les coumarines. Alors que, l'extrait EAM contient les polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, lipides, gommes et mucilages.

Les résultats révèlent la richesse des échantillons en ordre décroissant selon la présence des différents phytocomposés : EBr> EAe> EAD> EAM> EE> EBU> EPa>ECh, alors que l'extrait d'alcaloïde total contient seulement les alcaloïdes.

Les saponosides sont présents uniquement dans l'EAM, avec une formation de mousse dans le tube dépassant les 3 cm d'hauteur. Il ressort de l'analyse phytochimique que trois grands groupes de composés chimiques sont présents dans presque tous les échantillons. Il s'agit des polyphénols, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

Awaad et ses collaborateurs (2018), rapportent que l'extrait alcoolique total contient : les carbohydrates et/ou glycosides, flavonoïdes, stérols et/ou triterpènes, composés phénoliques et tannins, et l'absence de saponine, anthraquinones, alcaloïdes et cardénolides. L'étude de (Alrekabi & Hamad, 2018) confirme la présence des flavonoïdes dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique de la même plante, ce qui est en accordance avec notre étude. De même, l'EE de *S.arvensis* de l'étude de (Widyarini *et al.*, 2015) contient les flavonoïdes, saponines, stéroïdes/triterpénoïdes, contrairement à notre EE qui ne contient pas les saponines mais d'autres phytonutriments comme les tannins, alcaloïdes, gommages et mucilages.

Teugwa *et al.*, (2013) rapportent que l'EBr et l'EE de la même plante de Cameroun, contiennent une diversité de familles chimiques incluant : les polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes, stérols et saponines. Cependant, les anthocyanines et les lipides étaient absents, ces résultats sont en agreement avec la nôtre à l'exception de l'absence des saponines dans ces deux extraits.

Makkawi *et al.*, (2010) rapportent la présence des flavonoïdes et tannins seulement dans l'EE et non dans l'EAD, ce qui n'est pas en accord avec notre résultat. Donc l'absence de ces biomolécules dans l'EAD est due au chauffage de l'extrait et sa faible solubilité dans l'alcool.

I.3. Dosage des composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes (Tachakittirungrod *et al.*, 2007). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antivirale, antiallergique, antithrombotique qui peuvent être reliées à leur activité antioxydante (Gülçin *et al.*, 2010). C'est la raison pour laquelle, le dosage des phénols totaux de la plante investiguée a été effectué dans cette étude.

La teneur en phénols totaux des différents extraits de *S.oleraceus L.* a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations avec un coefficient de corrélation $R = 0,9972$ (Annexe 1).

Les résultats sont exprimés en μg équivalent acide gallique par mg d'extrait de la plante (μg EAG/mg d'extrait) et sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux des différents extraits des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

Extraits	Teneurs en Polyphénols totaux TPT ^A (μg EAG/mg)	Teneurs en flavonoïdes totaux TFT ^B (μg EQ/mg)	Teneurs en flavonols totaux TFLT ^B (μg EQ/mg)
EBr	89.980 \pm 7.834 ^b	44.097 \pm 1.387 ^a	181.340 \pm 1.985 ^a
ECh	23,313 \pm 2,207 ^b	15.883 \pm 0.625 ^b	141.247 \pm 6.078 ^{bf}
E Ae	259,197 \pm 23,510 ^c	128.333 \pm 1.100 ^c	233.733 \pm 0.880 ^c
EBu	167,533 \pm 4,567 ^d	112.850 \pm 7.823 ^d	221.383 \pm 3.411 ^d
EPa	35,080 \pm 4,851 ^{bc}	24.793 \pm 0.752 ^e	161.667 \pm 3.136 ^e
EAM	34,783 \pm 0,613 ^{bc}	22.987 \pm 1.414 ^e	137.207 \pm 11.796 ^f
EAD	40,863 \pm 3,843 ^e	20.973 \pm 0.523 ^e	151.573 \pm 3.661 ^{bc}
EE	28.510 \pm 2.464 ^{bc}	54.447 \pm 1.616 ^f	187.537 \pm 11.368 ^a
EAT	ND	ND	ND

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3).

A : polyphénols exprimés en μg équivalent acide gallique/mg d'extrait ; B : flavonoïdes et flavonols exprimés en μg équivalent quercétine/mg d'extrait. EAG : équivalent acide gallique, EQ : équivalent quercétine, EBr: extrait brut, ECh: extrait chloroformique, EAe: extrait acétate d'éthyle, EBu : extrait butanolique, EPa : extrait phase aqueuse, EAM: extrait aqueux macéré, EAD: extrait aqueux décocté, EE : extrait éthanolique.

^{a-f} : les résultats avec différentes lettres étaient significativement différents au seuil de ($p < 0,05$). Une différence entre les résultats a été considérée comme significative pour une valeur de $p < 0,05$ selon l'ANOVA suivie du LSD-test (least significance difference test).

Selon les résultats mentionnés dans le tableau 9 et la figure 11, les teneurs en polyphénols totaux révèlent que l'E Ae contenait la plus grande concentration en composés phénoliques (259,20 \pm 23,51 μg EAG/mg), suivie de l'EBu (167,53 \pm 4,57 μg EAG/mg). On remarque que l'extraction avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol a donné les teneurs les plus élevées. Cependant, le contenu phénolique le plus faible a été enregistré dans l'ECh (23,31 \pm 2,21 μg EAG/mg) tandis que le reste se situait entre (28,51 - 89,98 μg EAG/mg).

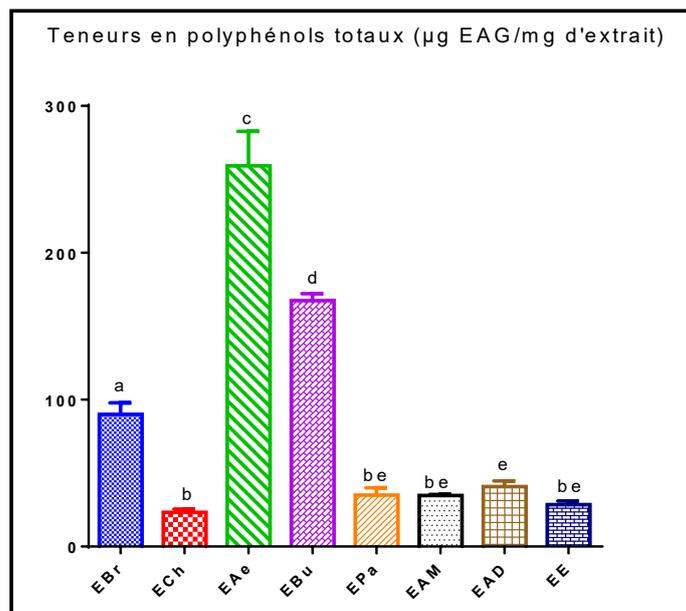


Figure 11 : Teneurs des polyphénols totaux dans les différents extraits de *Sonchus oleraceus L.*

I.4. Dosage des Flavonoïdes et flavonols totaux

Les flavonoïdes comme l'un des groupes les plus diverse et répandue des composés naturels, se sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires (Djeridane *et al.*, 2010).

La teneur en flavonoïdes et flavonols a été déterminée selon la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$, qui est une méthode simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Les résultats obtenus suite au dosage des flavonoïdes et flavonols totaux sont présentés dans la figure 12, tableau 9 et exprimés en µg équivalent de quercétine par mg d'extrait. La courbe d'étalonnage de la quercétine est représentée dans l'Annexe 2.

Les extraits EAe et EBU présentent aussi les teneurs les plus riches en flavonoïdes totaux qui sont de $128,33 \pm 1,0$ et $112,85 \pm 7,82$ µg EQ/mg respectivement. Les autres échantillons ont une valeur de la teneur totale en flavonoïdes entre 15,88 et 54,45 µg EQ/mg avec la plus faible quantité enregistrée pour l'ECh.

Pour la teneur totale en flavonol, les valeurs les plus élevées étaient toujours dans l'EAe ($233,73 \pm 0,88$ µg EQ/mg) et EBU ($221,38 \pm 3,41$ µg EQ/mg), mais cette fois-ci l'extrait aqueux macéré (EAM) comprenait la teneur la plus faible de flavonol avec 137.207 ± 11.796 µg EQ/mg.

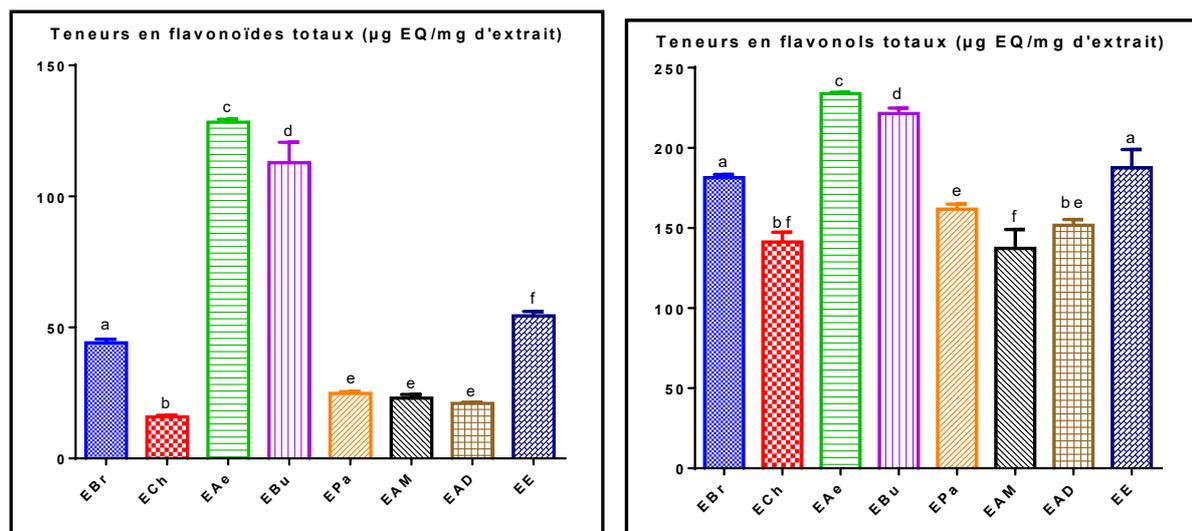


Figure 12 : Teneur en flavonoïdes et flavonols totaux dans les différents extraits de *Sonchus oleraceus L.* EQ : équivalent quercétine.

Nos résultats ont montré que les extraits acétate d'éthyle EAe et butanolique EBU sont les plus riches en composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols, malgré leurs faibles rendements d'extraction. Ces résultats n'étaient pas en accord avec Khan *et al.*, (2012) qui ont trouvé la plus grande quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique, tandis que la plus faible quantité des deux phytoconstituants a été obtenue dans les extraits d'acétate d'éthyle et hexanique.

Dans une autre étude portant sur les feuilles de (SO), les auteurs rapportent une teneur en TPT et TFT de 174.80 ± 1.70 mg EAG/g D.W et 143.30 ± 5.20 mg Catechol/g D.W respectivement de l'extrait brut (AL Juhaimi *et al.*, 2017). McDowell et ses collaborateurs (2011), ont trouvé des teneurs en phénols totaux de l'extrait brut des feuilles de (SO) de la Nouvelle-Zélande de $3500 \mu\text{Mol EAG}/100\text{g}$ de matière sèche. Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux que nous avons trouvés et ceci peut s'expliquer par le fait que ces teneurs se rapportent à la fraction d'acétate d'éthyle obtenue par extraction liquide-liquide de l'extrait brut et non à l'extrait brut hydrométhanolique lui-même.

Dans une étude réalisée par Teugwa *et al.*, (2013), la teneur totale en phénols des extraits hydroéthanoliques et méthanoliques de la plante entière de SO a été mesurée à $616,89 \pm 19,20$ et $182,25 \pm 16,76 \mu\text{g Eq cat/g}$ respectivement, ce qui était supérieur aux résultats actuels. Dans une autre recherche, des quantités élevées de TPT et de TFT avaient été obtenues à partir des parties aériennes de SO cultivées en Chine lorsque le méthanol était utilisé (Xia *et al.*, 2011). De plus, l'extrait méthanolique de SO cultivé en Corée avait la valeur la plus élevée de TPT, et

les valeurs les plus faibles ont été obtenues dans les extraits éthanoliques et aqueux (Yin *et al.*, 2007), ce qui est presque conforme à nos résultats. La littérature ne révèle aucun travail concernant la teneur en flavonols totaux de la plante.

D'un côté, la teneur des phénols totaux n'est pas stable, et se diffère d'une plante à une autre et entre les espèces du même genre. La différence dans le contenu phénolique (y compris les flavonoïdes et les flavonols) décrit dans la littérature peut être attribuée à plusieurs facteurs :

- 1- Facteurs climatiques et environnementaux : la localisation géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (Ebrahimi *et al.*, 2008) ;
- 2- Le patrimoine génétique (variété), la saison de culture, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas *et al.*, 2004) ;
- 3- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols, des flavonoïdes et des flavonols totaux (Lee *et al.*, 2003).

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante stimule la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols afin de s'adapter et survivre (Cushnie & Lamb, 2005).

En général, les solvants polaires intermédiaires tels que l'acétate d'éthyle et le butanol se sont révélés plus puissants pour extraire les composés phénoliques. Dans une étude, l'extrait acétate d'éthyle présentait le TPT le plus élevé. Les résultats ont été confirmés par la littérature dans laquelle l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant pour extraire sélectivement les polyphénols (Thavamoney *et al.*, 2018). De plus, la plupart des flavonoïdes sont connus pour être moins polaire ou semi-polaire de nature. Pour cette raison, une recherche a suggéré que l'hexane est un solvant plus pauvre pour la récupération des flavonoïdes par rapport à des solvants plus polaires tels que l'acétate d'éthyle et le butanol (Jan *et al.*, 2013).

Cela explique la valeur la plus élevée de TPT, TFT et TFLT dans l'EAE et l'EBU par rapport à d'autres solvants. De plus, les extraits d'acétate d'éthyle et butanol étaient plus efficaces pour extraire les composés phénoliques de l'extrait brut selon les recherches précédentes (Nakamura *et al.*, 2017). On pourrait suggérer que les composés phénoliques occupent principalement la fraction d'acétate d'éthyle par rapport aux autres fractions, ce qui entraîne un faible rendement d'extraction et un TPT élevé (Nakamura *et al.*, 2017). Ainsi, les extraits EAE et l'EBU ont une

meilleure puissance d'extraction des composés phénoliques que d'autres solvants organiques comme le chloroforme ce qui influence la teneur en ces phytoconstituants.

I.5. Investigation phytochimique des différents extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.* par LC/MS-QTOF.

La détermination de la composition phytochimique des extraits les plus efficaces (extrait brut, chloroformique, acétate d'éthyle et n-butanol) est basée sur les activités biologiques testées et la quantité de travaux phytochimiques antérieurs. Elle a été réalisée par les analyses HPLC couplée à un détecteur quadripolaire à temps de vol 'QTOF : Quadrupole-Time-of-Flight' ainsi qu'à un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI : electrospray ionization source) fonctionnant en mode ion positif.

Les résultats de l'analyse qualitative effectuée par LC-MS/QTOF des quatre extraits sont consignés dans l'Annexe 3 en illustrant les spectres chromatographiques respectifs.

Comme le laitron maraicher (*Sonchus oleraceus L.*) étant très peu étudiée, nous avons choisie d'analyser quatre extraits les plus actifs (brut, chloroformique, acétate d'éthyle et n-butanol). Les techniques LC-MS/QTOF ont permis d'obtenir des informations qualitatives sur la composition phytochimique de ces extraits par des chromatogrammes représentant les profils des extraits de la plante.

Les résultats ont clairement montré la richesse des extraits dont 42 pics 'principaux métabolites secondaires' ont été identifiés au moyen des données UV et MS (Annexe 4). Le tableau résume l'analyse qualitative des quarantes deux (42) composés identifiés au cours de la présente étude.

On note l'existence de plusieurs familles de molécules et leurs dérivés : telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes : (flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols), les dérivés phénylpropanoïdes (coumarines aglycone (hydroxycoumarines)), polyol, tannins hydrolisables, ainsi que les terpènes (les monoterpènes, sesquiterpènes lactones : eudesmanolides et ses dérivés, germacranolides, tri/terpénoïdes et les stérols).

Toutes ces molécules ont été identifiées et caractérisées d'une part grâce à la comparaison de leurs temps de rétention, les UV, la formule chimique et leurs MS obtenus par MS/QTOF en mode positif, et d'autre part par comparaison aux données rapportées dans la littérature. Les extraits EBr, ECh, EAe et EBU contiennent respectivement 10, 27, 17 et 12 composés différents.

I.5.1. Démarche d'identification des composés des extraits

Dans cette section, nous donnons les détails de l'identification de chacun des dix composés de l'extrait brut de la plante. Nous le rappelons, il s'agit des composés 1-10 présentés dans (Annexes 3 et 4). Ces composés sont l'Acide quininique ; l'aesculin ; 3- (acétyl-oxy) -1-méthoxy-1- (3,4,5-triméthoxyphényl) propane ; corchoionoside C ; sonchuside H ; loliolid ; mélampolide ; 15-O-β-D-glucopyranosyl-11β, 13-dihydro-urospermiq A ; tanacétine et macrocliniside A.

En ce qui concerne l'extrait chloroformique ECh, nous constatons qu'il est nettement plus riche en composés apolaires. Cela est probablement dû à l'extraction au chloroforme et il contient plusieurs composés en commun avec les autres extraits.

Le profil chromatographique des extraits acétate d'éthyle et butanolique (Annexe 3) a montré la présence de plusieurs pics de composés dans les deux extraits. Les composés ayant le même pic avec le même temps de rétention sont retrouvés à la fois dans l'extrait EAe et l'EBu : 3-6, 12, 19, 20, 37, 39 et 40. Ces composés sont : 3- (acétyl-oxy) -1-méthoxy-1- (3,4,5-triméthoxyphényl) propane ; corchoionoside C ; sonchuside H ; loliolid ; 15-Hydroxy-4β, 15,11β, 13- tétrahydroreynosine ; acide gallique ; catéchol ; ester méthylique d'apigénine-7-O-β-D-glucuronide ; D-(-)-Mannitol ; linoléate d'éthyle.

Il est à noter que les composés 5 et 6 ont été identifiés et retrouvés en commun dans les quatre extraits de la plante qui sont respectivement sonchuside H et loliolid. Le composé 5 (sonchuside H), a été détecté en mode ion positif ESI-QTOF en donnant l'ion $[M-H]^+$ à m/z 453.2086, conformément à la formule moléculaire $C_{21}H_{34}O_9$ (Annexe 4). La présence de loliolid a un ion $[M-H]^+$ à m/z 197.1164 avec une formule moléculaire de $C_{11}H_{16}O_3$.

I.5.2. Discussion

La littérature a rapporté que les composants bioactifs les plus importants des espèces de *Sonchus* sont caractérisée par la présence d'acides phénoliques, de flavonoïdes, de flavonols, de lactones sesquiterpéniques des structures eudesmanolides et guaianolides, des esters d'acide quininique, de proanthocyanidines, de saponines, d'alcaloïdes, des triterpènes, des stéroïdes, des coumarines et des saccharides (Helal *et al.*, 2000 ; Devkota, 2005 ; Alothman *et al.*, 2018).

Les études précédentes sur les feuilles et les parties aériennes du SO et d'autres espèces du même genre (Abhijeet *et al.*, 2018 ; Li & Yang, 2018) ont signalé la présence de nombreux

composés phénoliques. Nos données confirment ces preuves. En effet, la composition chimique du SO a été analysée par un appareil LC-MS/QTOF, l'aesculine et l'acide quininique ont été trouvés dans l'extrait brut, ce qui concorde avec les résultats cités par Xu *et al.*, (2008). De même, les travaux de (Miyase & Fukushima, 1987), sont en accord avec nos résultats, où les composés sonchusides A-D et macrocliniside A avaient été précédemment isolés et identifiés dans l'extrait méthanolique entier de SO.

L'analyse par HPLC sur les la plante entière et les racines de *S. asper* et *S. oleraceus* d'Égypte (Elkhayat 2009 ; Helal *et al.*, 2000) concordent avec nos résultats par la présence du composé 15-O- β -D-glucopyranosyl-11 β , 13-dihydro urospermal A, qui est une lactone sesquiterpène.

Les flavonoïdes sont un autre groupe important de composés phénoliques qui sont trouvé largement dans les parties du laiteron maraicher (Abhijeet *et al.*, 2018) . Parmi ceux-ci, l'acide gallique, le catéchol et l'apigénine 7-O-méthylglucuronide ont été cités dans la littérature (Li & Yang, 2018) et tous ont été trouvés et identifiés dans les extraits acétate d'éthyle 'EAe' et l'extrait butanolique 'EBu' alors que l'extrait chloroformique contenait seulement l'acide gallique et le catéchol. D'autres flavonoïdes : acide 2-(3,4-dihydroxyphényl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromène-7-yl β -D-glucopyranosiduronic, Luteolin 7- β -D-glucosiduronic acid, l'apigénine, l'acide sinapinique, la 3-hydroxyflavone ont été trouvés dans les extraits EAe et EBU. En outre, le 15-O- β -glucopyranosyl-11 β , du 13-dihydrourospermal A ; corchoionoside C et le sonchuside avaient été trouvés dans les échantillons de méthanol et d'acétate d'éthyle. Ils ont été isolés auparavant pour la première fois de *S. oleraceus*, *S. erzincanicus* et *S. arvensis* dans les travaux de (Bondarenko *et al.*, 1978 ; Elkhayat 2009 ; Ozgen *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'analyse quantitative de l'abondance des composés a révélé que l'EAe contenait la plus grande quantité de composés bioactifs (phénols, flavonoïdes et flavonols).

Quant aux dérivés de flavones présents dans les extraits, plusieurs composés ont été caractérisés. Ainsi, les composés 35 et 42 luteolin 7-glucuronide et 3-hydroxyflavone (4.869 et 18.544 min) ont montré un ion à m/z 463.0905 et 261.0517 respectivement. De la même manière, les pics 37 et 38 ont été attribués à l'apigénin (ou 4',5,7-trihydroxyflavone) et apigénin-7-O- β -D-glucuronide methyl ester, donnant un ion à [M-H]⁺ m/z 271.0581 et 461.1049 respectivement. D'autres composés bien connus appartenant à d'autres familles phénoliques différentes ont également été détectés (Annexe 4).

Selon la littérature, la composition chimique de l'ECh par LC-MS/QTOF de la présente étude n'a pas été étudiée auparavant.

Il a été démontré que l'espèce *Sonchus* contient des acides gras abondants, notamment les acides gras polyinsaturés (ω 3-PUFAs), qui sont des acides gras importants (**Guil-Guerrero et al., 1998**) et représentait des pourcentages élevés du total des acides gras dans *S. oleraceus* (44,37 %). L'acide α -linoléique (C18:3 ω 3) a également été détecté (43,58 %). La présence d'acide linoléique (C18:2 ω 6) et d'acide palmitique (C16:0) a également été signalée dans des proportions élevées. Il a été démontré que *S. asper*, *S. tenerrimus* et *S. oleraceus* contiennent des pourcentages similaires d'acides saturés et monoénoïques (**Li & Yang, 2018**). Cette étude concorde avec nos résultats où le palmitate de méthyle et l'oléate d'éthyle ont été détectés dans l'ECh, alors que le linoléate d'éthyle a été détecté dans l'EAc et l'EBu.

On note que les données obtenues par LC-MS/QTOF s'accordent avec ceux obtenus par le dosage spectrophotométrique. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux, en flavonoides et en flavonols sont identifiées dans les quatre extraits.

Chapitre I I

Activités biologiques

II. Test d'activité antioxydante *in vitro* des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

Les composés polyphénoliques sont les principaux constituants présents dans la plante et possèdent surtout des antioxydants puissants. Par conséquent, La capacité antioxydante peut être testée à l'aide d'une grande variété de méthodes (Chandra *et al.*, 2014) , qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse, les conditions expérimentales et les contributions différentes des antioxydants au potentiel antioxydant totale (Wojdylo *et al.*, 2007) . Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri *et al.*, 2009).

II.1. Test d'activité anti-radicalaire DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

La capacité anti-radicalaire des différents extraits de *S.oleraceus L.* a été évaluée comme décrit précédemment dans les pages (57-58). Les résultats de cinétique d'inhibition de DPPH sont illustrés dans la figure 13.

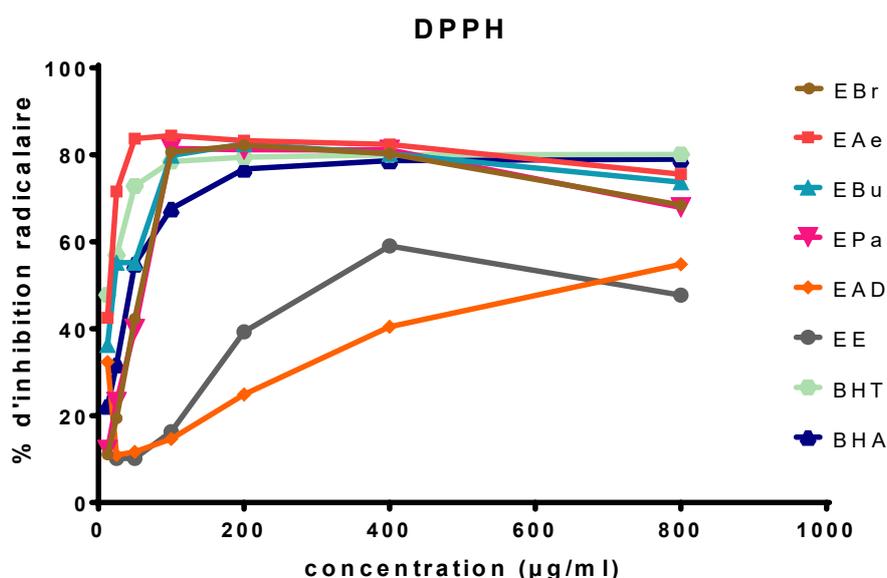


Figure 13 : Cinétique d'activité anti-radicalaire des extraits de *S.oleraceus L.* sur le radical DPPH.

Le tableau 10 représente les concentrations qui piègent 50% des radicaux libres ou concentrations effectrices (CI₅₀) et l'absorbance A_{0,5} des différents extraits et standards par les différents tests. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Boumarfegue *et al.*, 2012). À des fins comparatives plusieurs antioxydants standards sont utilisés ; BHT, BHA, α -tocophérol et l'EDTA. Les différences entre les extraits et les

antioxydants standards et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives ($p < 0,05$).

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Les extraits bruts 'EBr' et de la phase aqueuse 'EPa' ont montré des activités de piégeage radicalaires modestes et similaires vers le DPPH (valeurs de $59,79 \pm 1,86 \mu\text{g/ml}$ et $59,50 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$ respectivement), tandis que l'extrait EAe et EBu ont montrés une activité antioxydante plus élevée contre le DPPH (CI_{50} la plus faible : $13,41 \pm 0,15$ et $22,42 \pm 0,75 \mu\text{g/ml}$ à une concentration de $25 \mu\text{g/mL}$ respectivement) sans différence significative ($p < 0,05$). L'EAe présentait presque la même activité antioxydante du standard α -tocophérol avec une valeur d' CI_{50} $13,02 \pm 5,17 \mu\text{g/ml}$ pour une concentration de $25 \mu\text{g/ml}$. Par contre, l'extrait ECh, EAM et EAT ont une activité supérieure à $800 \mu\text{g/mL}$ contre le DPPH.

Selon les résultats obtenus par cette méthode et par comparaison avec les produits de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité comme suit :

BHA > BHT > α -tocophérol > EAe > EBu > EPa > EBr > EE > EAD.

Tableau 10 : Activité anti-oxydante des différents extraits de *S.oleraceus L.*

	DPPH CI ₅₀ µg ml ⁻¹	GOR CI ₅₀ µg ml ⁻¹	ABTS CI ₅₀ ⁽¹⁾ µg ml ⁻¹	β-carotène CI ₅₀ µg ml ⁻¹	métal chelat CI ₅₀ ⁽¹⁾ µg ml ⁻¹	Phén A _{0,5} ⁽¹⁾ µg ml ⁻¹	CUPRAC A _{0,5} ⁽¹⁾ µg ml ⁻¹
EBr	59,79±1,86 ^a b	96,37±5,61 ^{ab}	97,34±1,76 ^e	125,48±5,81 ^{abc}	185,86±5,84 ^b	97,55±9,35 ^c	45,92±2,19 ^f
ECh	NA	354,42±2,5 ^{ab}	263,30±0,99 ^a	404,12±9,91 ^{bc}	Na	NA	712,50±2,12 ^a
EAc	13,41±0,15 ^a b	23,37±1,17 ^{ab}	11,40±0,60 ^h	323,24±0,70 ^{abc}	Na	25,17±2,50 ^c	26,71±0,29 ^g
EBu	22,42±0,75 ^a b	34,60±1,09 ^{ab}	31,85±0,35 ^g	121,67±3,06 ^{abc}	429,40±1,01 ^a	42,89±0,10 ^d	28,19±0,69 ^g
EPa	59,50±0,70 ^a b	117,85±1,34 ^a b	77,33±0,56 ^f	48,33±8,25 ^{abc}	192,91±74,9 0 ^b	129,92±1,13 ^b	128,17±6,69 ^{de}
EAM	NA	541,61±11,7 ^{7ab}	157,13±1,82 ^c	376,20±20,97 ^a bc	100,28±2,16 ^b	NA	222,65±2,86 ^b
EAD	646,97±25, 41 ^b	682,47±0,58 ^b	136,33±2,72 ^d	312,58±0,34 ^{abc}	98,19±2,36 ^b	NA	206,13±8,49 ^c
EE	573,67±52, 21 ^b	418,54±2,59 ^a b	197,93±2,79 ^b	530,08±11,50 ^c	528,89±29,3 8 ^a	164,24±6,06 ^a	133,58±0,46 ^d
EAT	NA	NA	387,84±0,50 ^a	NA	118,62± 14,65 ^b	NA	121,70±2,29 ^e
BHT*	12,99±0,41 ^a b	6,82±0,49 ^a	1,29±0,30 ⁱ	0,91±0,01 ^a	NT	2,24±0,17 ^f	8,97±3,94 ^h
BHA*	6,14±0,49 ^a	6,82±0,49 ^a	1,81±0,10 ⁱ	1,05±0,03 ^{ab}	NT	0,93±0,07 ^f	5,35±0,71 ^h
α-Tocoph érol*	13,02 ±5,17 ^{ab}	NT	NT	NT	NT	NT	NT
EDTA *	NT	NT	NT	NT	8,80±0,47 ^b	NT	NT

*composés utilisés comme control positif. ^{a-i}: Différentes lettres montrent des différences significatives entre les substrats (par colonne). NA : n'a pas d'activité et NT : non testé. Les valeurs des paramètres⁽¹⁾ sont affichées sous forme de moyenne±SD (test d'ANOVA et de Tukey, $p < 0,0001$). Le DPPH, galvinoxyle et β-carotène sont présentés par moyenne±SD et le rang des moyennes (test de Kruskal-Wallis et Dunnett, $p < 0,0001$).

II.2. Test d'activité anti-radicalaire galvinoxyle

Les résultats obtenus dans ce test, nous permettent de tracer une courbe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (figure 14).

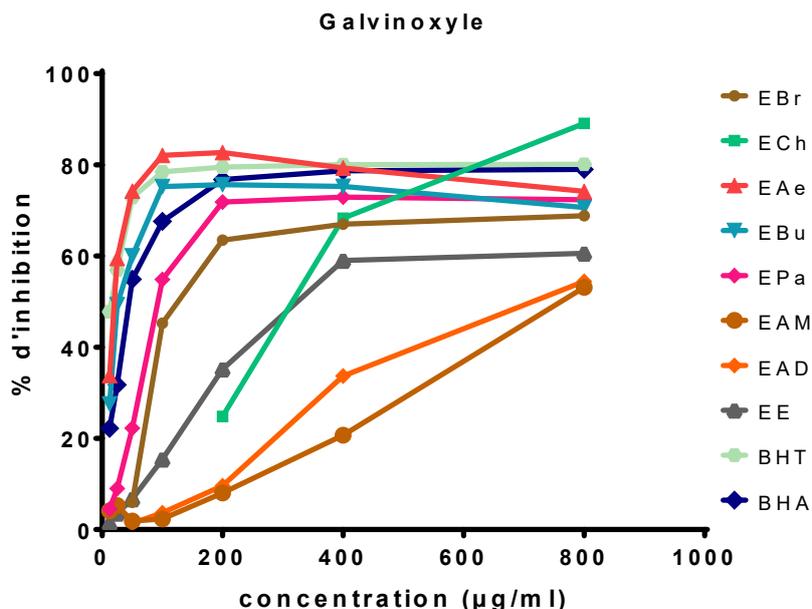


Figure 14 : Courbe représentant l'activité anti-radicalaire galvinoxyle des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

L'EAe a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé par rapport aux autres extraits, avec une CI_{50} de $23,37 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ à une concentration de $12,5 \mu\text{g/mL}$, ceci peut être dû à la richesse de l'EAe en polyphénols et flavonoïdes. Par contre, l'extrait d'alcaloïde total (EAT) n'a pas d'activité contre le radical galvinoxyle. À notre connaissance, ce test n'a jamais été testé auparavant pour cette espèce.

A des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés, le BHT et le BHA qui présentent une activité très forte et dose-dépendante avec une CI_{50} identiques et égales à $6,82 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$. Par comparaison avec les standards, on a classé les extraits par ordre d'efficacité :

BHT, BHA > EAe > EBU > EBr > EPa > EAM > ECh > EE > EAD.

II.3. Test de décoloration du radical cation ABTS^{•+}

La figure 15 montre les courbes des pourcentages d'inhibition tracées en fonction de la concentration des extraits étudiés.

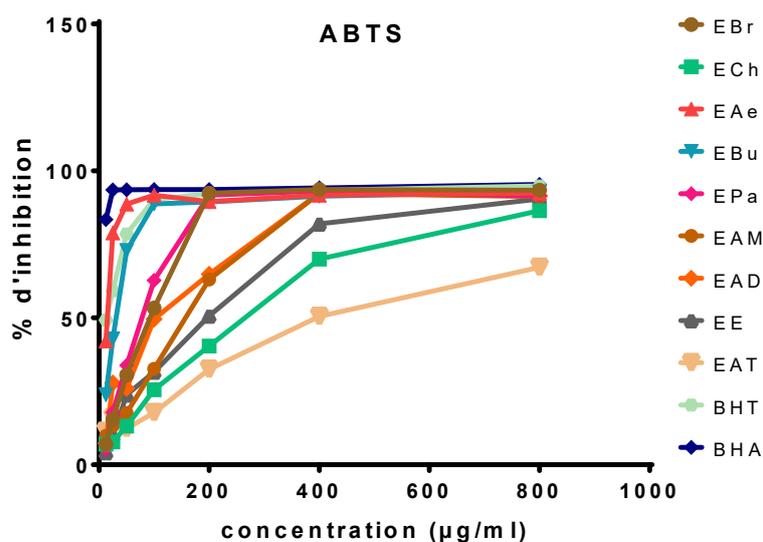


Figure 15 : Courbe représentant l'activité anti-radicalaire ABTS^{•+} des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

Tous les extraits se sont avérés avoir une activité antioxydante par l'essai d'ABTS^{•+} avec des pourcentages d'inhibition différents. Selon la figure 15, on peut observer une augmentation dose-dépendante du pouvoir antioxydant des standards et des extraits. Le pouvoir antioxydant de la BHT et de la BHA apparaît plus marqué que celui des extraits en atteignant un plateau aux fortes doses tandis que celui des extraits apparaît plus modéré mais continu. L'extrait EAe est le plus efficace à réduire l'ABTS^{•+}, avec une CI₅₀ de 11,40±0,60 µg/mL à une concentration de 25 µg/mL, qui était dix fois moins puissant que le standard BHA 1,81±0,10 µg/mL (tableau 10).

L'extrait alcaloïde total EAT a la plus faible activité par rapport aux autres extraits. Ces résultats sont logiques car les polyphénols et les flavonoïdes sont plus abondants dans les extraits polaires. Les résultats obtenus permettent de classer nos extraits selon leurs ordres d'efficacité :

BHT > BHA > EAe > EBU > EPa > EBr > EAD > EAM > EE > ECh > EAT.

II.4. Test de blanchiment de β-carotène/acide linoléique

La figure 16 représente les cinétiques de blanchiment du β-carotène en présence des extraits de *Sonchus oleraceus L.* ainsi que du BHT et BHA.

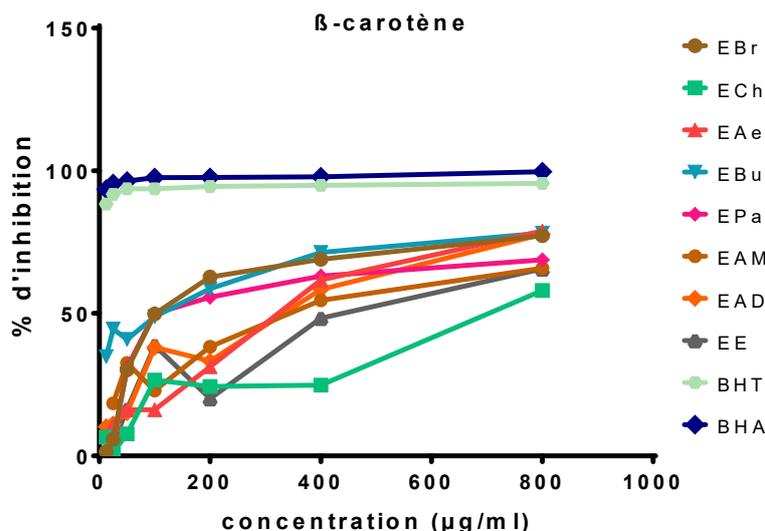


Figure 16 : Activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène en présence des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

Les résultats montrent que l'extrait de la phase aqueuse (EPa) a la plus forte activité d'anti-péroxydation lipidique avec une valeur d'inhibition de $48,33 \pm 8,25 \mu\text{g/mL}$ (figure 16). Cette activité est peut être due à leurs capacité d'inhiber la peroxydation lipidique et/ou piéger les radicaux de l'acide linoléique. Cependant, les valeurs des autres extraits sont significativement ($p < 0,05$) inférieures à celles du BHT et BHA ($0,91 \pm 0,01$ et $1,05 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ respectivement) (Tableau 10).

Les résultats obtenus ne montrent pas une corrélation linéaire entre le pourcentage de l'activité anti-péroxydation lipidique et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

Dans cette méthode le classement de nos extraits, selon leurs activités et par rapport aux molécules de référence est : BHT > BHA > EPa > EBU > EBr > EAD > EAe > EAM > ECh > EE.

II.5. Test de chélation des ions ferreux (méthode de Férène)

Dans cette étude, l'activité de chélation du fer ferreux a été mesurée par l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -férène après l'incubation des extraits avec le Fe^{2+} suivant la méthode de (Decker & Welch, 1990).

Le Férène peut quantitativement former des complexes avec le Fe^{2+} . Cependant, en présence d'agents chélatants, la formation du complexe est perturbée de telle sorte que la

couleur du complexe est diminuée. La mesure de la réduction de la couleur, par conséquent, permet l'estimation de l'activité de chélation de l'agent chélatant co-existant (Kaur *et al.*, 2006). Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux sont présentés dans la figure 17.

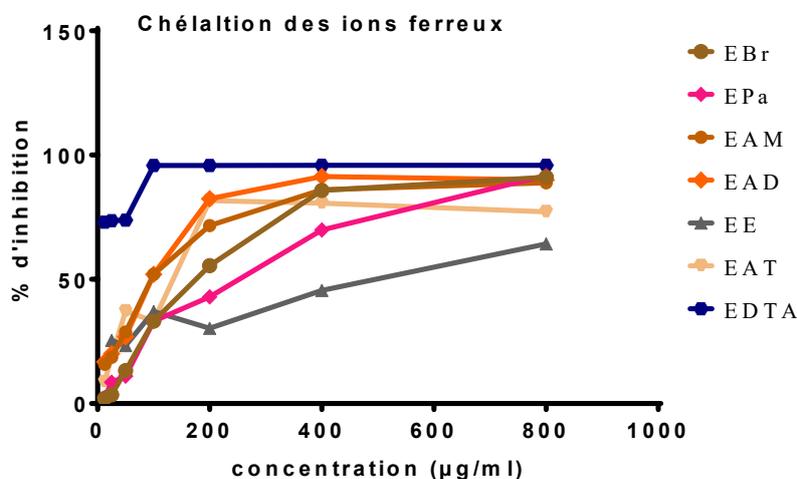


Figure 17 : Activité de chélation des ions ferreux des extraits de *Sonchus oleraceus L.* et d'EDTA.

On remarque que les extraits ECh et EAe ne possèdent pas d'activité de chélation des métaux. Cependant, les extraits EAD et EAM ont un pouvoir réducteur similaire et très faible comparé à l'EDTA.

Le standard utilisé dans ce test (EDTA) exerce un effet chélateur très puissant de 8.80 ± 0.47 à $12,5 \mu\text{g/mL}$, à cause de sa structure unique, il possède deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, qui peut chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation d'un complexe Fe^{2+} -Férène (Luo *et al.*, 2011). Les différences entre les différents extraits et l'EDTA sont statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Comparativement aux autres méthodes d'activité antioxydante, on remarque que l'extrait aqueux décocté 'EAD' est le plus actif dans cette méthode avec un pourcentage d'inhibition de $98,19 \pm 2,36\%$ à $100 \mu\text{g/mL}$, mais très moins actif que l'EDTA. Par comparaison avec l'EDTA, on a classé les extraits par ordre d'efficacité: EDTA > EAD > EAM > EAT > EBr > EPa > EBU > EE.

Les résultats obtenus montrent une faible corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes, flavonols totaux et l'activité chélatrice des extraits de SO, ce qui donne la probabilité de l'activité des autres substances que les polyphénols et les flavonoïdes.

II.6. Test de l'activité phénanthroline

Les résultats obtenus dans ce test, nous permettent de tracer une courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration (figure 18).

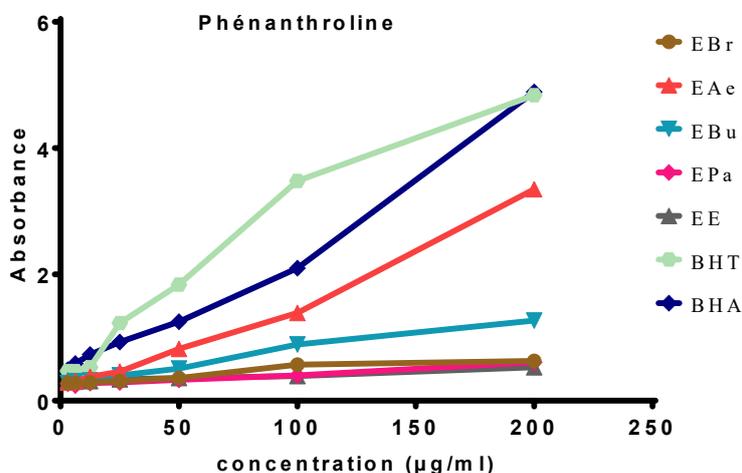


Figure 18 : Activité phénanthroline des extraits de *Sonchus oleraceus* L.

Les valeurs de l'absorbance $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) calculé à partir des courbes d'absorbance en fonction de la concentration sont représentées dans le tableau ci-dessus.

Le test du phénanthroline a été utilisé pour mesurer le fer dans de nombreux types d'échantillons (Zhou & Li, 2009). L'extrait EAe a une très forte capacité d'inhibition d'une manière dépendante de la concentration avec une $A_{0,5}$ de $25,17 \pm 2,50 \mu\text{g/mL}$ par rapport aux autres extraits, ceci peut être dû à la richesse de l'EAe en polyphénols, flavonoïdes et flavonols. Par contre, les extraits ECh, EAM, EAD et EAT ne possèdent pas d'activité d'inhibition du radical hydroxyle jusqu'à $800 \mu\text{g/ml}$.

À des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés, le BHT et le BHA, qui ont montré une activité antioxydante très puissante, avec des absorbances égales à $2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ et $0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ respectivement. Cependant, aucun des extraits n'a présenté une activité supérieure à celle des témoins positifs.

Selon les résultats obtenus de l'activité antioxydante, par cette méthode et par comparaison avec les produits de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité : BHA > BHT > EAe > EBU > EBr > EPa > EE.

II.7. La réduction cuprique

La capacité antioxydante (CUPRAC) est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm par la formation d'un complexe stable entre la néocuproïne et le cuivre (I), ce dernier est formé par la réduction du cuivre (II) en présence de néocuproïne (Özyürek *et al.*, 2011). L'ensemble des valeurs d'absorbance obtenues est reporté dans la figure 19.

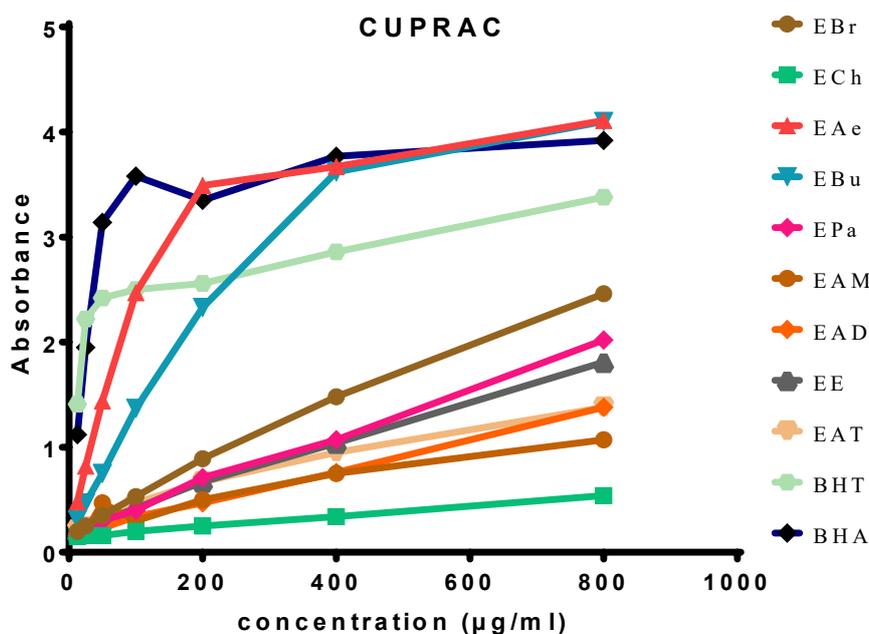


Figure 19 : Activité de réduction cuprique des extraits de *Sonchus oleraceus L.* comparés avec les standards.

Les résultats ont été comparés avec les standards BHT et BHA figuré ci-dessus. Le BHT donne une absorbance de $8.97 \pm 3.94 \mu\text{g/mL}$, alors que le BHA donne une absorbance de $5.35 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$. L'extrait EAe et EBU ont montrés une activité plus grande que celles des autres extraits et presque quatre fois moins grande que le BHT et le BHA.

En comparant les résultats de la réduction cuprique de nos extraits avec celles des standards, on constate qu'aucun extrait n'a montré une meilleure activité que le BHT et le BHA. Le classement des extraits par ordre d'efficacité est le suivant :

BHA > BHT > EAe > EBU > EBr > EAT > EPa > EE > EAD > EAM > ECh.

II.8. Discussion

L'étude de l'activité antioxydante de différents extraits de *Sonchus oleraceus L.* montre que ces extraits sont plus ou moins actifs par rapport aux standards utilisés, selon les différentes méthodes testées.

D'après les résultats obtenus, on a pu mettre en évidence une variabilité au niveau de la composition chimique de chaque extrait. La variabilité de résultats est liée à la nature chimique des extraits et à la méthode utilisée. Les extraits de SO ont montré les capacités de piégeage de manière dépendante de la concentration.

Globalement, les résultats obtenus de l'activité anti-radicalaire par : DPPH•, galvinoxyle, ABTS^{•+}, phénanthroline et réduction cuprique révèlent que les extraits acétate d'éthyle et butanolique sont les plus actifs, cela est probablement lié à la complexité des extraits en substances polyphénoliques y compris les flavonoïdes et les flavonols et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (Vermerris & Nicholson, 2006). Cependant, l'extrait acétate d'éthyle était plus efficace pour piéger les radicaux libres de DPPH•, galvinoxyle et ABTS^{•+} que l'extrait butanolique.

Nos résultats indiquent que l'extrait EAe présente une activité remarquable et presque la même que les standards α -tocophérol et le BHT vis-à-vis du piégeage du DPPH•. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Khan *et al.*, (2012b), obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle EAe de la partie aérienne de *Sonchus asper* de Pakistan, qui a montré une activité antioxydante plus élevée que notre résultat. De même, l'étude de (Nakamura *et al.*, 2016) a montré que l'EAe donnait l'activité de DPPH• la plus élevée.

Contrairement, les travaux réalisés par (Xia *et al.*, 2011), affirment que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *S.oleraceus* de la Chine contient le taux de phénol le plus élevé avait la capacité de piéger le radical DPPH• avec une valeur d'CI₅₀ de 17,42 μ g/mL, qui est plus élevé que notre EBr mais moins actif que l'EAe de la présente étude. Dans une autre étude entreprise par Florence *et al.*, (2011) sur le piégeage du DPPH• où l'effet scavenger de l'extrait acétonique, méthanolique et aqueux de deux espèces du Sud d'Afrique, *S.oleraceus* et *S.asper* il a été noté que l'extrait aqueux était le plus actif que les autres extraits ; ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. A l'opposé, un puissant effet scavenger estimé à partir d'CI₅₀ de 0.19 \pm 0.08 mg/mL de l'extrait hydroéthanolique de la plante entière de *S.oleraceus* du

Cameroun a été retrouvé à partir du piégeage du DPPH• lors des travaux réalisés par Teugwa *et al.*, (2013).

Les travaux de Yin *et al.*, (2007) sur *S.oleraceus* de la Corée du Sud ont démontrés que les extraits méthanoliques, éthanoliques à 70% et l'extrait aqueux décocté ont des activités antioxydantes plus élevées que nos extraits avec des valeurs d'CI₅₀ de (47,1- 56,5- 52,7 µg/mL respectivement).

En effet, les extraits EAe et EBu qui possédaient la valeur de polyphénol total 'TPT' la plus élevée favorisent une activité de piégeage des radicaux DPPH• plus forte. Selon Nakamura *et al.*, (2016), l'activité de piégeage des radicaux était grandement affectée par la présence du groupe hydroxyle en position C-3. Les fractions les plus fortes peuvent donc contenir beaucoup de composés phénoliques structurellement efficaces pour piéger le radical DPPH•. L'effet scavenger des composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sur le radical DPPH• est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (Siddhuraju & Becker, 2007). De plus, Amić *et al.*, (2003) ont mis en évidence la relation structure-fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH•. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

Les résultats de l'activité antioxydante contre l'ABTS^{•+} obtenus ne sont pas en accord avec ceux de Xia *et al.*, (2010), qui montrent une activité antioxydante modérée des extraits méthanoliques de *S.oleraceus* avec une CI₅₀ de 60,34 µg/mL. Selon l'étude de Florence *et al.*, (2010) sur *S.oleraceus*, l'extrait acétonique et méthanolique étaient les plus puissants pour piéger le radical protonique d'ABTS^{•+}. Les radicaux DPPH• et ABTS^{•+} sont des radicaux libres stables et accepte des électrons ou radical d'hydrogène pour devenir des molécules diamagnétiques stables. Les composés phénoliques et les flavonoïdes contenus dans les extraits d'espèces de *Sonchus* interceptent la chaîne d'oxydation des radicaux libres et donnent de l'hydrogène à partir des groupes hydroxyles phénoliques, formant ainsi des radicaux libres stables qui n'initient pas une nouvelle oxydation des lipides (Mahakunakorn *et al.*, 2004).

De plus, il a été rapporté que des facteurs tels que la stéréosélectivité des radicaux ou la solubilité de l'extrait dans différents systèmes de test affectaient la capacité des extraits à réagir et à piéger différents radicaux (Zheng & Wang, 2001). Wang *et al.*, (1998) ont constaté que

certaines composés ayant une activité de piégeage d'ABTS^{•+} ne montraient pas d'activité de piégeage de la DPPH•. Le piégeage du radical ABTS^{•+} par les extraits s'est révélé être légèrement supérieur à celui du radical DPPH• (Wang *et al.*, 2018). Cela pourrait être dû également à la présence de molécules réductrices de haut poids moléculaire (tannins) susceptibles d'inhiber l'activité du persulfate de potassium et donc de réduire la production d'ABTS^{•+}. Leur efficacité dépend du poids moléculaire, du nombre de cycles aromatiques et de la nature de la substitution des groupes hydroxyyles par rapport aux groupes fonctionnels spécifiques (Hagerman *et al.*, 1998).

D'un point de vue pharmacologique et selon les résultats de LC-MS/QTOF, la présence de loliolide, d'acide quinique, de luteolin 7-glucuronide et d'acide sinapinique, en particulier dans l'EAE puissant, est très important car ils sont bien connus d'avoir de fortes activités antioxydantes et peuvent être responsables de l'activité observée (Inbathamizh & Padmini, 2013 ; Nićiforović & Abramović, 2014 ; Grabarczyk *et al.*, 2015 ; Ma *et al.*, 2018). De plus, apigénin-7-O-β-D-glucuronide méthyl ester, la 3-hydroxyflavone et l'acide ascorbique n'ont été identifiés que dans l'extrait butanolique EBU pour lequel ils avaient une activité de piégeage efficace contre le radical DPPH (Nayak *et al.*, 2014 ; Wąsik & Antkiewicz-Michaluk, 2017 ; Hagos & SB, 2018).

L'étude de Hagerman *et al.*, (1998) a montré que l'activité de piégeage des radicaux libres (ABTS^{•+}) des extraits de SO pourrait être due à la présence de composés phénoliques à poids moléculaire élevé, tels que la catéchine. Ce qui explique le fort pouvoir antioxydant d'ABTS^{•+} de l'extrait acétate d'éthyle et butanolique, qui est dû à la présence de catéchol (flavonol) qui est le synonyme de catéchine.

Popovici et ses collaborateurs (2009), ont montré que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les RLs. Il existe une hétérogénéité structurale au sein des composés phénoliques. Ils ont montré que l'acide gallique représente le composé le plus actif, en utilisant le DPPH, le pouvoir antioxydant de l'épicatéchine n'est pas significativement différent et l'acide tannique a donné les valeurs environ 5 fois plus faibles.

La lutéoline représente une bonne activité de piégeage contre le radical libre DPPH car elle répond à certains des critères essentiels pour avoir une activité antiradicalaire efficace ; la présence de groupe 3',4' ortho di-OH sur le noyau B, la présence de la double liaison C2=C3 en

conjugaison avec le groupe 4 oxo, et la présence d'un OH libre au niveau du carbone C5 (Oszmianski & Czemerys, 2007). L'existence d'un autre OH libre en C7 vise à améliorer l'activité de piégeage du radical libre DPPH car plus qu'il y a d'OH libre plus l'activité antioxydante est importante (Es-Safi *et al.*, 2007). Ce qui explique la forte activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle.

À notre connaissance, il s'agit du premier rapport dans la littérature évaluant l'activité antioxydante des différents extraits de SO au moyen des tests galvinoxyle, phénanthroline et de réduction cuprique (CUPRAC).

La phénanthroline-Fe (II) est l'un des indicateurs d'oxydo-réduction couramment utilisés, où le changement de couleur peut être utilisé pour indiquer l'altération de l'état de la réaction d'oxydo-réduction. L'effet inhibiteur sur le radical hydroxyle est donc un indice important reflétant l'anti-oxygénation des composés. Dans le dosage de la phénanthroline-Fe (II), les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) produit dans le système $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ peut oxyder le phénanthrolène- Fe^{2+} en phénantroline- Fe^{3+} , et le pic d'absorption à 532 nm (A_{532}) a été considérablement réduit. Lorsque les extraits ont été ajoutés dans le système, le changement d'absorbance peut être réduit, de sorte que l'étendue de diminution pourrait être le critère d'estimation de la force relative d'anti-oxydation de l'extrait (Zhou & Li, 2009).

Les extraits EAe et EBU ont montré les activités antioxydantes les plus élevées dans ces tests, ce qui est signalé pour la première fois pour cette espèce. Ces extraits avaient la plus forte capacité d'inhiber le radical hydroxyle, telle que mesurée dans le dosage de la phénanthroline. Cette forte activité est du probablement à leurs teneurs élevées en phénols, flavonoïdes et flavonols. En revanche, les parties aériennes de *S.oleraceus L.* d'Algérie n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique ou biologique.

Les flavonoïdes et autres polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et, par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Gao *et al.*, 2000). Ainsi, l'activité élevée de l'extrait de la phase aqueuse 'EPA' peut être attribuée à ses teneurs modérées et la nature des flavonoïdes et flavonols.

Le test du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, les antioxydants apolaires se concentrent à l'interface lipide-eau ce qui prévient la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, donc ils exposent des propriétés antioxydantes importantes. Alors que les antioxydants polaires sont moins efficaces dans la protection des

lipides car ils restent dans la phase aqueuse, ce qui est confirmé dans nos résultats (**Frankel & Meyer, 2000**). D'autres chercheurs ont montré aussi que les différences de solubilité des flavonoïdes et la partition des composés entre les deux phases d'un système eau-lipidique influencent son activité (**Burda & Oleszek, 2001**). Une seule étude a évalué l'effet de blanchiment de β -carotène sur les feuilles de *S.arvensis* d'Indonésie, en montrant que l'extrait méthanolique a une activité supérieure que l'extrait aqueux, ce qui est en accord avec nos résultats (**Itam et al., 2015**). L'inhibition de la peroxydation des lipides implique plusieurs phénomènes parmi ces phénomènes ; piégeage des radicaux et/ou la chélation des ions, c'est pour cela le test de chélation du fer ferreux a été réalisé.

Le fer est essentiel à la vie, car il est nécessaire au transport de l'oxygène, à la respiration et à l'activité de nombreuses enzymes (**Duh et al., 2001**). Cependant, les métaux sont des initiateurs bien connus de réactions oxydatives indésirables dans les lipides, les protéines et d'autres composants cellulaires. De plus, le fer est capable de générer des radicaux libres à partir des peroxydes par les réactions de Fenton, et la minimisation de la concentration de Fe^{2+} dans la réaction de Fenton offre une protection contre les dommages oxydatifs (**Lai et al., 2001; Rival et al., 2001**).

Pour l'espèce *S.oleraceus* qui pousse en Turquie, la recherche bibliographique a révélé qu'il y a un seul travail publié en 2009, qui s'intéresse à évaluer l'effet réducteur des ions ferreux par l'extrait méthanolique, en montrant qu'il a un effet de chélation des ions ferreux de 70% à 0.2 g/mL (**Nehir El & Karakaya, 2004**). Notre étude a montré que l'extrait aqueux décocté 'EAD' et l'extrait aqueux macéré 'EAM' possèdent le plus fort pouvoir réducteur du fer mesuré par le test de férène, mais ne contiennent pas une teneur élevée de polyphénols et flavonoïdes ; donc ses fortes activités pourraient être expliquées par la nature de flavonols présents dans ces extraits.

La teneur et la nature des flavonols peuvent présenter un facteur qui influence la capacité de chélation des extraits. Les flavonols peuvent également agir comme des antioxydants en chélatant les ions métalliques tel que le Fe^{2+} (**Engelmann et al., 2005**). Ainsi, des agents chélatants peuvent inactiver les ions métalliques et potentiellement inhiber les processus métal-dépendantes (**Andjelković et al., 2006**).

Par ailleurs, la méthode et les conditions d'extraction (température et temps) ont également affecté ces activités (**Robards, 2003**). Selon l'ordre de classement de l'activité des extraits étudiés par différentes méthodes, on peut affirmer que les extraits d'acétate d'éthyle et

butanolique sont les plus actifs, ce qui est conforme à leurs teneurs élevées en polyphénols, flavonoïdes et flavonols. De même, une corrélation positive significative entre l'activité antioxydante et le contenu des flavonoïdes totaux et phénoliques totaux a été reportée et démontrée par (Wojdyło *et al.*, 2007).

III. Test de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme appliqué aux différentes souches microbiennes isolées sont présentés dans la figure 20 et le tableau 11 ci-dessous.

D'après les légendes, on remarque que les souches bactériennes testées ont montré une sensibilité à la Céfalexine 30 µg (CN), dont les diamètres d'inhibition varient entre 18, 25 et 26 mm (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 MRSA et *Klebsiella pneumoniae* respectivement), alors qu'elles ont été résistantes à la Pénicilline.G 10 µg (P) et à la Vancomycine 30 µg (VA). L'Ampicilline 30 µg (AMP) a un effet inhibiteur sur toutes les souches avec des diamètres d'inhibition de 13 à 19 mm. Aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour le contrôle négatif (DMSO).

Tableau 11 : Résistance et sensibilité des germes isolés aux antibiotiques

Les diamètres d'inhibition (mm)	Les souches bactériennes				
	Ampicilline (AMP)	Céfalexine (CN)	Pénicilline .G (P)	Vancomycine (VA)	DMSO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15	18	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 35556 MRSA	19	25	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	26	-	-	-

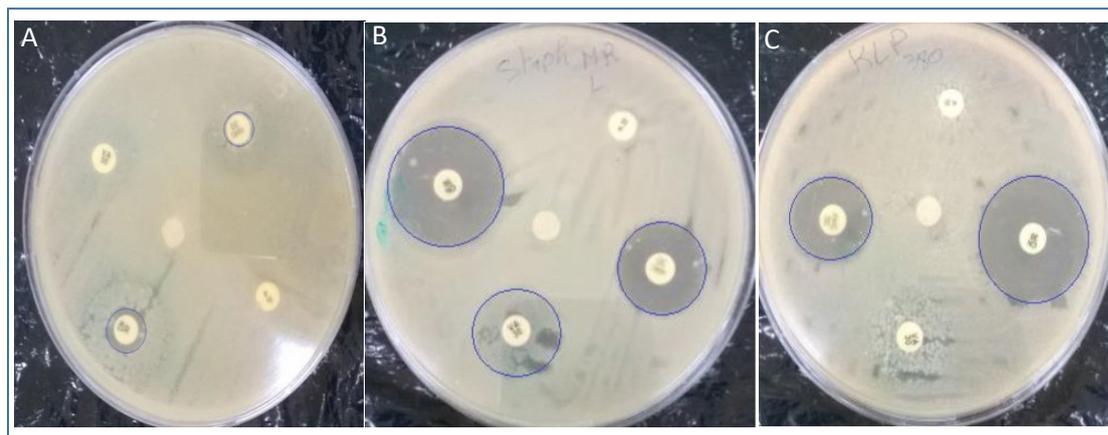


Figure 20 : Activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.

A : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; B : *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 MRSA ; C : *Klebsiella pneumoniae*.

III.1. Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de plante

L'étude qualitative du pouvoir antibactérien des différents extraits de *S. oleraceus* L. est évaluée sur des souches bactériennes Gram positives et Gram négatives à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Le tableau 12 montre l'effet antibactérien avec les diamètres d'inhibition des extraits de la plante étudiée.

Tableau 12 : Diamètre d'inhibition des extraits de la plante *S. oleraceus* L. sur les différentes souches bactériennes.

Les extraits	Concentration (mg/mL)	Diamètre d'inhibition (mm) des extraits		
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 35556 MRSA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
EBr	50	12,5	13,5	13,6
	100	13,7	16,4	14
	200	17,4	18	14,7
ECh	50	6	12	6
	100	10,6	12,3	6
	200	11,5	12,5	6
EAe	50	18,3	17,5	15,9
	100	18	20,7	17,8
	200	23	24	18,8

EBu	50	19	19,3	16
	100	19,2	21	16,4
	200	21,7	22	16,7
EPa	50	6	10	8,5
	100	6,9	11	9
	200	9,3	11,5	9,1
EAD	50	16,5	16,4	10
	100	16,8	17,3	12
	200	17,1	17,8	12,3
EAM	50	12	14,7	6
	100	15	15,2	8,6
	200	15,2	15,5	9,1
EE	50	13,5	14	11
	100	14,7	15,4	13
	200	15,3	15,8	13,5
EAT	50	7,5	10,5	6
	100	8	11,4	7,5
	200	10	13,6	9

D'après Moreira *et al.*, (2005), les résultats de l'activité antibactérienne de nos extraits sont en majorité actifs (diamètre de la zone d'inhibition 'DZI' = 9-14 mm) ou très actifs (DZI = 15-19 mm).

Les résultats présentés dans le Tableau 12 montrent que les différents extraits ont des activités antibactériennes de degrés variables contre les trois souches bactériennes mises en expérimentation. L'activité inhibitrice des extraits a été identifiée dans une large gamme de concentrations allant de 50 à 200 mg/mL (Tableau 12). Parmi les neuf extraits testés, les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique de *Sonchus oleraceus L.* sont ceux qui ont montré une meilleure activité antibactérienne contre les trois souches, alors que la souche *Klebsiella pneumoniae* était plus résistante à l'extrait chloroformique avec un diamètre d'inhibition de 6 mm. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli ATCC 25922* et *Staphylococcus aureus ATCC 35556* apparaît sensible vis-à-vis des extraits testés, ces mêmes extraits développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis *K. pneumoniae* ; dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (6-23 mm) pour *E. coli*,

de (10-24 mm) pour *S.aureus* qui est une bactérie Gram + renommée par sa résistance, et de (6-18,8) mm pour *K.pneumoniae*. L'inhibition de la croissance des souches est dose-dépendante et leurs sensibilité traduit l'action antibactérienne des extraits. Les activités antibactériennes trouvées pour les extraits EAe et EBU sont meilleures que la Pénicilline.G, la Vancomycine avec (DZI = 0 mm respectivement) et l'Ampicilline (DZI = 13-19 mm) vis-à-vis des souches bactériennes.

III.2. Discussion

Sonchus oleraceus L. manifeste une activité efficace contre les trois souches. Ce résultat est original, dans la mesure où jusqu'ici aucune donnée publiée sur cet intérêt pharmacologique de la plante n'a pu être constaté. Il s'agit donc, du premier résultat sur les effets antibactériens des différents extraits de cette espèce Algérienne.

Néanmoins, des travaux antérieurs signalent que certaines espèces du genre *Sonchus* manifestent des effets antimicrobiens. Parmi lesquels, Khan *et al.*, (2010) en étudiant l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques (EMe), hexanique (EHe), acétate d'éthyle (EAe), chloroformique (ECh), butanolique (EBU) et aqueux (EAq) de *S.asper* de Pakistan, ont noté que les extraits EMe, EBU et EAq ont inhibé la croissance de *S. aureus* à (2,5 ; 5 et 5 g/mL) respectivement. L'EMe a inhibé la croissance d'*E.coli* à (5 g/mL), alors que la concentration minimale inhibitrice 'CMI' d'EHe et EMe est à 1 g/ml, et pour EAe est 5 g/mL contre *K.pneumoniae*. Ces résultats corroborent avec la nôtre.

Mavi *et al.*, (2011) ont trouvé qu'un extrait méthanolique et aqueux de *Sonchus erzincanicus* présente un fort potentiel antimicrobien contre les bactéries Gram – et + : *E.coli* (DZI : 14 mm, 10 mm respectivement) et *S. aureus* (DZI : 12 mm, 10 mm respectivement). Il a été rapporté précédemment que les extraits méthanoliques de certaines plantes étaient plus efficaces sur la plupart des microorganismes testés que les autres extraits (Lin *et al.*, 1999) ; cependant, il est difficile de comparer ces résultats à ceux de la présente étude car il n'existe aucun rapport sur l'activité antimicrobienne des différents extraits de l'espèce Algérienne *S. oleraceus*. Néanmoins, nos résultats sont plus puissant que l'étude de Mavi *et al.*, (2011) ; certaines études ont rapporté que d'autres espèces de *Sonchus* présentaient une certaine activité biologique. Han *et al.*, (2005) ont rapporté que les composés de *S. transcaspicus* présentaient une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* ; cependant, ces composés sont des sesquiterpènes et n'ont pas de fraction phénolique.

Jimoh *et al.*, (2011) ont rapporté que l'extrait méthanolique de *S. oleraceus* de l'Afrique du Sud était actif contre *S. aureus* (5 mg/mL) et inactif contre *K.pneumoniae*, tandis que l'extrait aqueux n'a pas eu d'activité contre aucun des organismes utilisés dans cette étude. Ces résultats ne sont pas en accord avec les nôtres. Il a également été démontré que les extraits végétaux étaient actifs contre la plupart des souches Gram positives et moins contre les souches Gram négatives. Cette observation soutient donc le fait qu'en général, les bactéries Gram-négatives sont moins sensibles aux effets antibactériens que les bactéries Gram positives (**Afolayan, 2003**).

La sensibilité d'*E. coli* ATCC 25922 et de *S. aureus* ATCC 25923 à *Sonchus oleraceus* de la Chine a été également signalée par Xia *et al.*, (2011), avec des diamètres d'inhibition de (17.5 à 0.04 mg.mL⁻¹ (CMI) et 14.5 à 0.02 mg.mL⁻¹ respectivement). Ces auteurs ont indiqué que les concentrations de 0,5 mg/mL de l'extrait méthanolique ont prouvé un effet antimicrobien différent selon le microorganisme testé. En revanche, nos extraits se sont montrés nettement moins efficace que cette étude. Quelques différences sont attribuées à la composition chimique, à la période de la récolte de la plante et à son biotope. Aussi, la nature du solvant utilisé pour l'extraction peut constituer une autre raison de ces différences d'activités (**Mukherjee & Houghton, 2009**). De plus, *S. aureus* s'est avéré plus sensible aux extraits de l'espèce *Sonchus* qu'*E.coli*, ce qui est conforme aux résultats rapportés par Fattouch *et al.*, (2007). Une autre étude menée par Mallik *et al.*, (2014) a également révélé que l'extrait méthanolique de *Sonchus asper* de l'Inde est efficace sur *S.aureus* et *E.coli*, avec un diamètre d'inhibition maximal de (28 et 10 mm, à 6 mg/mL respectivement), alors que l'extrait hexanique et chloroformique sont moins efficace sur les isolats bactériens. Dans le cas de cette espèce, nos résultats de dépistage de sa capacité antibactérienne sont en partie en accord avec les résultats rapportés plus tôt. Notre extrait brut récolté à Guelma serait donc moins riche en molécules antimicrobiennes.

Les mécanismes de l'action antibactérienne des polyphénols peuvent être multiples et dépendent probablement de chaque micro-organisme. Plusieurs études ont attribué l'effet inhibiteur des extraits de plantes contre les pathogènes bactériens à leur composition phénolique (**Rodriguez *et al.*, 2007**), et les saponines qui ont des propriétés antifongiques (**Mohanta *et al.*, 2007**). Les polyphénols peuvent provoquer des changements morphologiques dans les cellules bactériennes et endommager les parois cellulaires des bactéries, y compris la membrane interne et la membrane externe, ce qui entraîne la fuite de composants intracellulaires. Des modifications de la forme des cellules, des formes irrégulières, des rides à la surface des

bactéries et la formation d'agrégats cellulaires peuvent être observés. Bien que la littérature suggère que les bactéries Gram-négatives sont généralement plus difficiles à inhiber, en raison de la présence d'une membrane externe qui tend à empêcher l'entrée des inhibiteurs et que les bactéries Gram positives sont généralement plus sensibles aux polyphénols (**Panda et al., 2018**). Le site d'activité antibactérienne des composés phénoliques est strictement liée à leur structure chimique, y compris la position et le nombre de groupes hydroxyle ou méthoxyle, ainsi qu'à la présence de groupes galloyle dans la structure chimique de la catéchine (**Efenberger-Szmechtyk et al., 2021**).

Kabuki *et al.*, (2000) ont signalé que les spectres antimicrobiens de la catéchine brute étaient plus efficaces contre les bactéries gram positives que contre les bactéries gram négatives. Cette tendance du tanin pourrait être expliquée par le fait que les structures de l'enveloppe cellulaire, y compris la membrane cytoplasmique et les composants de la paroi cellulaire, sont différentes entre les bactéries gram-positives et gram-négatives. Sans membrane externe, la paroi cellulaire des bactéries gram positives peut être traversée plus facilement et les tanins peuvent perturber la membrane cytoplasmique, perturber la force motrice du proton (FMP), le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire (**Burt, 2004**).

Les bactéries gram-négatives tels que *Klebsiella pneumoniae* sont plus résistantes aux composés phénoliques. Ceci est probablement lié à la présence d'une membrane externe lipophile contenant des niveaux élevés de phospholipides. Ce site rend la paroi cellulaire imperméable à plusieurs macromolécules et restreint la diffusion des composés hydrophobes à travers son enveloppe lipopolysaccharidique. La résistance élevée des bactéries Gram-négatives aux composés phénoliques peut également être associée à la présence d'enzymes dans l'espace périplasmique, qui peuvent endommager les molécules introduites de l'extérieur. Par conséquent, la différence structurelle des bactéries joue un rôle important dans leur sensibilité. (**Konaté et al., 2012**)

Cette variation est probablement liée à la répulsion entre les composés flavonoïdes (ou phénoliques) et les surfaces des bactéries Gram-, qui sont recouvertes de lipopolysaccharide. Par conséquent, la présence de flavonoïdes et/ou de composés phénoliques dans les extraits de six espèces de *Sonchus* pourrait jouer un rôle dans l'activité antibactérienne observée (**Xia et al., 2011**).

Au vu des résultats obtenus, on remarque que l'activité antibactérienne des extraits polaires est plus importante que celle des extraits apolaires. Ceci peut être dû à la nature et la

richesse de chacun de ces extraits en composants antibactériens. En effet, l'extrait chloroformique riche en sesquiterpènes lactones (eudesmanolides et ses dérivés, germacranolides), en monoterpènes hydrocarbonés, en tri/terpénoïdes et en stérols possèdent de faibles activités antibactériennes par rapport aux molécules phénoliques. Concernant les extraits EAe il est riche en acide gallique, catéchol, acide sinapinique, corchoionoside C, sonchuside H, ester méthylique d'apigénine-7-O- β -D-glucuronide, acide glucuronide 7-O- β -D-lutéoline ; alors que l'extrait EBU contient 15-hydroxy-4 β , 15, 11 β , 13-tetrahydroreynosin (sesquiterpènes lactones : eudesmanolides), l'acide ascorbique (vit C), acide gallique, catéchol, corchoionoside C, sonchuside H, ester méthylique d'apigénine-7-O- β -D-glucuronide, ces flavones et phénols sont connus par leur puissant pouvoir antimicrobien (**Badhani *et al.*, 2015**). Jeannot *et al.*, (2017) signale que certaines bactéries Gram négatif sont sensibles aux flavonoïdes. La facilité de pénétration des flavonoïdes est due à la nature de la membrane cellulaire, en particulier à l'épaisseur de la couche de peptidoglycane. Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes, peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (**Karou *et al.*, 2005**).

En plus, l'activité antimicrobienne est dépendante des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques et des souches employées (**Sari *et al.*, 2006**) . Kalembe & Kunicka (2003) ont établi la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne, et ont classé les molécules chimiques selon leur importance du point de vu activités biologiques comme suit : phénols, alcools, aldéhydes, cétones, éther et hydrocarbures.

Les résultats enregistrés montrent l'importance du pouvoir antimicrobien des composés phénoliques de cette plante médicinale contre différents germes hospitaliers. Ainsi, les extraits d'espèces de *Sonchus* pourraient être considérés comme de bons candidats pour les préparations phyto-antibactériennes de matières premières.

IV. Activité anti-inflammatoire *in-vitro*

IV.1. Effet anti-thermo dénaturant protéique des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

Pour évaluer l’effet anti-inflammatoire *in-vitro* des neuf extraits, nous avons opté pour le modèle anti-dénaturation de l’albumine sérique bovine (BSA : bovine serum albumin). L’effet de nos différents extraits sur la dénaturation thermique de BSA a été évalué à différentes concentrations et les résultats sont représentés dans la figure 21 et le tableau 13 ci-dessous.

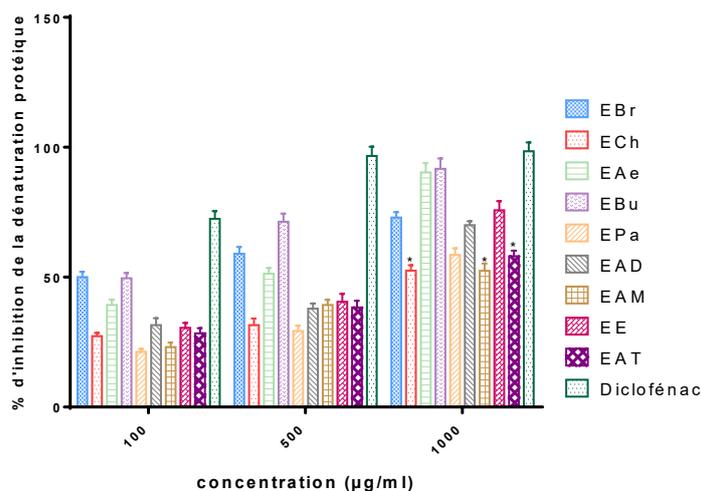


Figure 21 : Effet des différents extraits de *Sonchus oleraceus L.* et le Diclofénac sodique sur l’inhibition de la dénaturation des protéines.

Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=3). One-way ANOVA a été utilisé pour l'analyse statistique sous le logiciel GraphPad Prism version 2016 suivi par Dunett’s post-hoc test.

Tableau 13 : Pourcentage d’inhibition de la dénaturation de BSA à différentes concentrations des extraits de *Sonchus oleraceus L.* et de Diclofénac sodique.

Les inhibiteurs	% d’inhibition de la dénaturation des protéines		
	100 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
Extrait brut	50.00±2.07 %	59.01±2.61 %	72.97±2.04 %
Extrait chloroformique	27.30±1.24 %	31.57±2.54 %	52.52±2.07 %*
Extrait acétate d’éthyle	39.26±2.04 %	51.35±2.22 %	90.32±3.59 %
Extrait butanolique	49.55±2.06 %	71.35±3.08 %	91.69±3.99 %
Extrait de la phase aqueuse	21.28±1.09 %	29.27±2.07 %	58.56±2.55 %
Extrait aqueux décocté	31.53±2.65 %	37.84±2.01 %	70.03±1.46 %

Extrait aqueux macéré	23.06±1.78 %	39.26±2.08 %	52.43±2.79 %*
Extrait éthanolique	30.53±1.85 %	40.54±3.02 %	75.76±3.50 %
Extrait d'alcaloïde total	28.38±1.98 %	38.33±2.56 %	58.03±2.19 %*
Diclofénac	72.435±3.02%	96.64±3.56 %	98.50±3.36 %

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SEM, * $P < 0,05$ différence significatif par rapport au contrôle standard effectué par One-way ANOVA suivi du post-hoc test de Dunnett's.

Les différentes concentrations des différents extraits de la plante *Sonchus oleraceus L.* ont données des pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines non significative ($p < 0.05$) allant de : 21.28 % à 91.69 %. Le diclofénac a été utilisé comme standard pour comparer son activité anti-inflammatoire à nos extraits, il a donné une inhibition maximale de 98.50% à 1000 µg/mL qui est plus puissant aux extraits étudiés. Un maximum d'inhibition a été enregistré à une concentration de 1000 µg/mL avec un pourcentage de 91.69% pour l'extrait buanolique et 90.32% pour l'extrait acétate d'éthyle ; qui sont proche de celui du standard diclofénac. Les résultats de la figure (21) révèlent aussi que les autres extraits présentent des pourcentages faibles aux concentrations de 100 et 500 µg/mL, et à partir de cette concentration on peut noter une augmentation progressive des pourcentages d'inhibition des différents extraits. Nous constatons que l'effet des extraits est concentration dépendante et que le diclofénac est largement supérieur à celui de nos extraits. L'ordre d'inhibition des différents extraits était le suivant : EBU>EAe>EE>EBR>EAD>EPa>EAT>ECh>EAM.

IV.2. Discussion

La dénaturation des protéines est un processus au cours duquel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par application d'un stress externe tel que la chaleur ou par certains composés comme les acides ou les bases fortes et les solvants organiques, en perdant leur fonction biologique (Angel *et al.*, 2013). Le mécanisme aboutissant à cette dénaturation implique probablement une rupture des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes ou encore des ponts disulfures qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Banerjee *et al.*, 2011). La dénaturation des protéines des tissus, peut être causée par des auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques. On peut donc dire que la dénaturation des protéines tissulaires est un marqueur des maladies inflammatoires et arthritiques (Angel *et al.*, 2013).

De nombreuses lésions tissulaires sont dues à la dénaturation des protéines constitutives des cellules ou des substances intercellulaires. À ce titre, les principaux médicaments utilisés

pour la gestion des états inflammatoires en milieu clinique (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ont la capacité d'inhiber ou empêcher la dénaturation des protéines (**Govindappa & Poojashri, 2011**). L'inhibition de la dénaturation des protéines pourrait jouer un rôle important dans l'activité antirhumatismale des AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), mais les effets secondaires inévitables et graves sont parfois fatals (**Osman et al., 2016**). Mizushima & Kobayashi, (1968) ont utilisé la dénaturation des protéines comme modèle *in-vitro* de criblage pour les composés potentiellement anti-inflammatoires. De plus, Les agents qui peuvent prévenir ou empêcher la dénaturation des protéines d'origine végétale seraient donc de bon candidats pour le développement de nouvelles molécules anti-inflammatoires, en raison de leur sécurité, leur efficacité et leur rentabilité (**Chandra et al., 2012**).

Dans la présente étude, le test biologique de dénaturation des protéines a été choisi pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires *in-vitro* des différents extraits de laiteron maraicher. D'après les résultats obtenues, on peut supposer que nos extraits peuvent inhiber la formation d'auto-antigènes par inhibition de la dénaturation des protéines et de ce fait ils inhibent la formation d'auto-anticorps retrouvés dans les maladies auto-immunes. L'augmentation des absorbances des échantillons testés par rapport au contrôle indique une stabilisation des protéines, c'est-à-dire une inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) induite par la chaleur par les extraits et le médicament de référence, le diclofénac sodique (**Jagtap et al., 2011**). D'après les pourcentages d'inhibition, il est évident que les extraits acétate d'éthyle 'EAe' et extrait butanolique 'EBu' étaient plus actifs par rapport aux autres extraits, mais le diclofénac sodique, étant plus puissant à des concentrations plus faibles (Tableau 13).

En effet, d'après Duganath *et al.*, (2010), cet effet d'anti-dénaturation serait due à l'interaction des molécules présentes dans les extraits naturels avec certains acides aminés constituant les protéines, dans le cas de l'albumine (modèle étudié) ; ces interactions se feraient au niveau de deux sites spécifiques : la tyrosine et la thréonine de la chaîne aliphatique. Ils ont également signalé que des molécules thérapeutiques peuvent réactiver le récepteur riche en motifs de Tyrosine, avec de la Thréonine, qui régulent les voies biologiques de la transduction du signal pour leur action biologique globale.

Le diclofénac sodique et l'extrait hydro-alcoolique ont montré une capacité dépendant de la dose pour inhiber la dénaturation protéique induite thermiquement. Ces résultats expérimentaux soutiennent l'utilisation traditionnelle de cette plante pour le traitement de diverses affections, en particulier contre l'inflammation (**Mishra et al., 2011**).

S. oleraceus L., une herbe feuillue sauvage, est utilisée depuis des siècles comme médecine populaire pour le traitement des conditions inflammatoires en Afrique du Sud, au Pakistan, en Egypte et en Chine, mais ses propriétés pharmacologiques n'ont pas été entièrement évaluées. En Chine, le *Sonchus oleraceus* (SO) a été utilisé pour traiter de nombreux types d'inflammation, notamment les gonflements et les douleurs, la dysenterie, l'appendicite, l'arthrite,... etc. Bien que les herbes anti-inflammatoires soient utilisées depuis toujours, le mécanisme sous-jacent n'a pas été élucidé (Li *et al.*, 2017).

A notre connaissance, aucun résultat sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in-vitro* par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines n'a été rapporté par d'autres auteurs sur *Sonchus oleraceus L.* pour pouvoir comparer nos résultats, mais de nombreuses études ont signalé l'effet anti-inflammatoire des polyphénols et des terpènes de *Sonchus oleraceus L.* (Li *et al.*, 2017 ; Vilela *et al.*, 2010 ; Lu *et al.*, 2006).

Les principaux constituants des extraits les plus efficaces 'EAe et EBU' sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les flavones, les glycosides, ainsi que les lactones sesquiterpéniques (Annexe 5). L'effet anti-inflammatoire peut être dû à un constituant ou à l'effet synergique de plusieurs constituants phytochimiques qui y sont présents.

Dans le but de justifier l'utilisation traditionnelle de *S. oleraceus* dans le traitement des maladies à caractère inflammatoire, les auteurs ont évalués l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux et éthanolique de la plante sélectionnée sur un modèle animal. Li *et al.*, (2017) ont rapporté l'activité anti-inflammatoire *in-vivo* de l'extrait aqueux de *S. oleraceus* pour traiter les cellules RAW 264.7 (lignée cellulaire monocyte macrophage leucémique de souris). Les extraits ont inhibé de manière significative la production de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires au niveau des gènes et des protéines. Alors qu'en 2010, une étude a montré que l'extrait hydroéthanolique de *S. oleraceus* 'SoHE' présentait des effets anti-inflammatoires chez les rats. Le SoHE a clairement réduit l'œdème des pattes induit par le carraghénine. L'extrait administré à 300 mg/kg a eu un effet anti-inflammatoire puissant comparé à l'indométhacine à la dose de (10 mg/kg). L'extrait SoHE a démontré de façon marquée une action anti-inflammatoire, ce qui confirme les affirmations antérieures de son utilisation traditionnelle (Vilela *et al.*, 2010). De plus, Lu *et al.*, (2006) ont rapporté que l'extrait de *S. oleraceus* réduisait de manière significative les niveaux d'oxyde nitrique, d'interleukine IL-2, IL-1 β et de facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) dans les exsudats inflammatoires du pied de rat, en plus de l'activité NOS, de manière dose-dépendante.

Diverses études précédentes ont montré que de nombreux flavonoïdes contribuaient de manière significative aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires de nombreuses plantes. Parmi lesquelles, Li *et al.*, (2008) ont montré que la rutine (un type de flavonoïdes) et le β -sitostérol (un type de stérols) sont les principaux composants de *S. oleraceus*. La rutine module de multiples fonctions biologiques avec des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes et anti-inflammatoires grâce à ses capacités appréciables de piégeage des radicaux libres (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl, 2014). En tant qu'anticancéreux nutraceutique puissant, le β -sitostérol interfère avec de multiples voies de signalisation cellulaire, notamment le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération, les métastases et l'inflammation (Bin Sayeed & Ameen, 2015). Les composants anti-inflammatoires de l'extrait de SO peuvent inclure le villosol, l'acide férulique, le β -sitostérol, l'acide ursolique et la rutine, et ces extraits seront développés comme de nouveaux agents pharmacologiques contre les maladies inflammatoires (Li *et al.*, 2008). En outre, la rutine et l'acide caféique de l'EAE peuvent contribuer à l'effet anti-inflammatoire dans une certaine mesure. Cependant, ils ne constituent qu'une faible proportion de l'extrait (Wang *et al.*, 2015).

L'étude de Jiang *et al.*, (2009) a montré que *S. arvensis* contient divers composés : acide palmitique, β -sitostérol, daucostérol, quercétine, apigénine-7-O- β -glucopyranoside, lutéoline-7-O- β -D-glucopyranoside, quercétine-3-O- β -D-glucopyranoside et rutine qui pourraient avoir produit les effets anti-inflammatoires. Ceci corrobore nos résultats, car les extraits EAE et EBU comprennent également l'apigénine-7-O- β -glucopyranoside et la lutéoline-7-O- β -D-glucopyranoside qui sont responsables de cette activité.

On peut donc conclure de cette étude préliminaire que la plante possède des constituants qui ont révélé les propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoire) ci-dessus et qui peuvent générer des molécules bioactives pour le développement de nouveaux médicaments.

V. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'activité anticholinestérase des différents extraits de *Sonchus oleraceus L.* a été réalisée par la méthode d'Ellman en utilisant l'enzyme acétylcholinestérase AChE en vue de déterminer le taux d'inhibition de l'AChE. Les résultats présentés dans cette étude sont les premières informations sur l'activité AChE de cette espèce et ils ont été illustrés dans la figure 22 et l'annexe 5.

La figure ci-dessous montre l'activité inhibitrice d'AChE des extraits comparés à ceux de la galantamine utilisée comme un médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer légère.

D'après les résultats d'activité réalisée contre l'enzyme, il apparaît que tous les extraits ont inhibé l'AChE à une concentration de 25-200 $\mu\text{g/mL}$. Néanmoins, l'extrait brut EBr a enregistré l'activité inhibitrice de l'AChE la plus importante avec une valeur d' CI_{50} de $27.07 \pm 1.86 \mu\text{g/mL}$, et donc quatre fois seulement moins actif que la galantamine avec une CI_{50} de $6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$. Les extraits ECh, EAe ont également présentés un taux d'inhibition supérieur à une concentration similaire de 50 $\mu\text{g/mL}$ (figure 22). Les extraits EPa, EBU, EE et EAD ont présentés une activité moyenne avec une CI_{50} comprise entre 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$. Par contre, l'extrait aqueux macéré EAM et l'extrait alcaloïde total EAT ont montrés une faible activité anticholinérasique avec un pourcentage d'inhibition significativement inférieur à ceux de la galantamine à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivement (figure 22).

L'ordre de l'activité pour les extraits a été comme suit : Galantamine > EBr > ECh > EAe > EPa > EBU > EE > EAD > EAT > EAM.

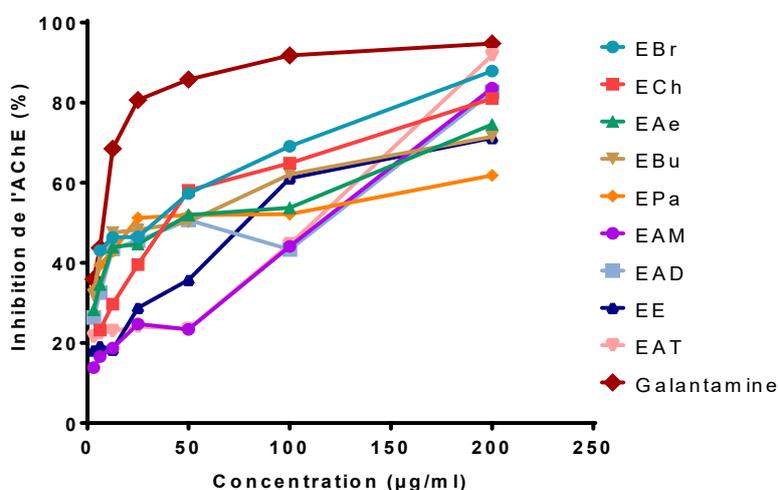


Figure 22 : Activité inhibitrice de l'AChE des différents extraits de la partie aérienne de *S. oleraceus L.*

V.1. Discussion

Les différents échantillons de SO ont été testés pour la première fois pour déterminer leur capacité en tant qu'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.

Les données de la littérature sur l'effet inhibiteur du SO contre l'AChE étaient insuffisantes. Dans ce travail, l'extrait brut EBr présentait la plus faible CI_{50} (27,07 $\mu\text{g/mL}$) en inhibant l'activité AChE, qui était beaucoup plus puissante que l'extrait méthanolique de *S. asper* du Pakistan (CI_{50} : 65 $\mu\text{g/mL}$) (Khan *et al.*, 2012c). Une étude antérieure a également montré que l'extrait méthanolique donnait une bonne activité inhibitrice contre l'AChE, suivie d'une fraction d'acétate d'éthyle, suggérant que les constituants actifs pourraient être un cocktail de composés polaires. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de certaines plantes médicinales indiennes a également révélé que les extraits méthanoliques avaient un effet plus important que les extraits aqueux (Vinutha *et al.*, 2007), ce qui est en accord avec nos résultats. Alors que dans une autre recherche, l'extrait hexanique était l'extrait le plus efficace contre l'AChE (Ayaz *et al.*, 2014). En outre, les extraits non polaires peuvent être considérés comme des inhibiteurs des enzymes d'acétylcholinestérase. Ceux-ci ont suggéré que les solvants organiques étaient capables d'extraire efficacement les molécules avec la meilleure inhibition de l'enzyme.

D'un côté, plusieurs alcaloïdes y compris la classe pyrrolizidine, ont la propriété d'interagir avec les récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'ACh (Green *et al.*, 2013). Les produits isolés pourraient probablement se lier à ces types de récepteurs, ce qui pourrait avoir des effets synergiques, agissant à la fois comme inhibiteur de l'AChE et agoniste des récepteurs de l'ACh ; ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

D'un autre côté, *S. oleraceus L.* possède des polyphénols et des flavonoïdes qui sont des inhibiteurs notables d'AChE (Pinho *et al.*, 2013). Cependant, il n'y avait pas de corrélation directe entre les teneurs totaux de polyphénols, flavonoïdes et flavonols dans l'extrait chloroformique avec la puissance activité inhibitrice d'AChE correspondante (Annexe 5). Ces résultats suggèrent que les extraits du genre *Sonchus* qui contiennent à la fois des terpènes et des polyphénols pourraient affecter différentes cibles, y compris l'activité anticholinestérasique et le stress oxydatif (Gomathi & Manian, 2015).

Selon d'autres études, nous ne pouvons pas encore commenter l'agent actif qui produit l'inhibition de l'AChE (Syad & Devi, 2014), ce qui est nécessaire d'identifier les fractions appropriées pour une purification supplémentaire et l'identification des agents actifs.

Selon les résultats de LC-MS/QTOF de la présente étude, le sesquiterpène lactone mélampolide (costunolide) n'était présent que dans l'extrait brut EBr et est connu pour son effet antioxydant et neuroprotecteur (Ham *et al.*, 2012). L'EaE et Ebu ont également montré une

activité inhibitrice efficace de l'acétylcholinestérase 'AChE' qui pourrait être due à l'acide gallique, le catéchol, l'apigénine, l'acide sinapique et l'acide ascorbique, comme indiqué par des études précédentes (Nićiforović & Abramovič, 2014 ; Badhani *et al.*, 2015 ; Waşik & Antkiewicz-Michaluk, 2017 ; Wang *et al.*, 2018).

Le célastrol, l'artémisinine, l'acide syringique, l'acide vanillique et la scopoletine sont des molécules identifiées et présentes dans l'extrait chloroformique ; plusieurs études précédentes ont montrées que ces molécules ont des activités neuroprotecteurs puissant ce qui explique la forte activité de cet extrait également.

Des études ont montré que le célastrol (triterpène de méthide de quinone) réprime l'activation microgliale, la production de cytokines pro-inflammatoires, la formation inductible d'oxyde nitrique et la peroxydation des lipides (Allison *et al.*, 2001).

Il a été démontré que l'artémisinine protège les cellules neuronales de la rétine contre le stress oxydatif. En conséquence, les antioxydants ont constitué une approche intéressante pour le traitement des maladies neurodégénératives. L'artémisinine pourrait traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB : blood-brain barrier) sans toxicité évidente dans le système nerveux central, ce qui implique des avantages favorables dans le traitement des troubles neurologiques (Yan *et al.*, 2017).

L'acide syringique est l'un des composés phénoliques les plus abondants. Il présente plusieurs propriétés utiles dans le secteur biomédical, telles que la protection du cerveau/CNS; en réduisant les dommages neuronaux causés par l'ischémie cérébrale et en augmentant les niveaux de superoxyde dismutase (SOD) (Güven *et al.*, 2015).

L'acide vanillique (AV), un composé phénolique, a baissé la régulation du processus neuro-inflammatoire et a aboli l'effet délétère du stress oxydatif sur l'apprentissage et la mémoire chez les souris diabétiques. En outre, d'autres études démontrent les effets bénéfiques de l'AV dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Amin *et al.*, 2017).

La scopoletine (7-hydroxy-6-méthoxycoumarine) est une coumarine phénolique avec une puissante activité inhibitrice de l'AChE, bien que les tests *in vitro* aient montré une CI₅₀ plutôt élevée de 168 µM contre l'AChE (Rollinger *et al.*, 2004). Ainsi, *S.oleraceus L.* reste une pharmacothérapie potentiellement bénéfique qui pourrait être développée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et/ou d'autres maladies telles que la maladie de Parkinson et la myasthénie qui nécessitent également des agents capables de traiter les déficits cholinergiques.

VI. Activité photoprotectrice

L'activité photoprotectrice d'extraits de plantes a été utilisée pour évaluer les effets dermato-protecteurs et a été mesurée *in vitro* en déterminant le facteur de protection solaire (FPS), qui est considéré comme l'un des indicateurs les plus fréquemment utilisés pour la classification des niveaux de protection solaire des produits contre les coups de soleil dus principalement aux rayonnements UV-B nocifs. Il a été signalé que dans les indices FPS, les valeurs FPS de 6–10, 15–25, 30–50 et >50 sont considérées comme ayant respectivement une activité de protection solaire minimale, modérée, élevée et maximale (Schalka & VM, 2011).

La détermination des valeurs FPS pour les neuf extraits a été effectuée par la méthode spectrophotométrique et l'équation de Mansur a été appliquée (Mansur *et al.*, 1986).

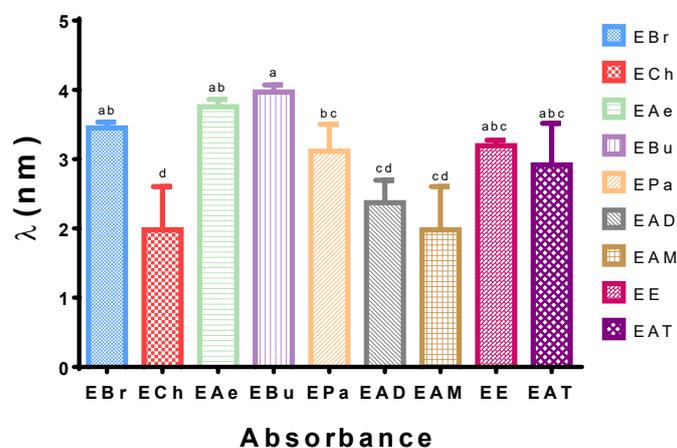


Figure 23 : Activité photoprotectrice 'FPS' de *Sonchus oleraceus L.* à différents longueurs d'onde λ .

Les résultats sont présentés dans l'annexe 6 et la figure 23. Les valeurs calculées de FPS sont présentées dans l'intervalle de 19,09-39,99. La valeur la plus élevée de FPS s'est avérée être $39,99 \pm 1,08$ pour l'extrait butanolique 'EBU' à $100 \mu\text{g/mL}$. L'activité la plus faible a été notée dans l'extrait chloroformique ECh avec une valeur de $19,09 \pm 0,28$. Les extraits EAM et EAD avaient enregistré une protection moyenne de FPS ; alors que les extraits EPa, EAT, EE, EBr et EAe avaient une haute protection de FPS.

VI.1. Discussion

L'utilisation d'un écran solaire comme agent photoprotecteur pour la protection UV devient très populaire. Sa fonction est basée sur la capacité des molécules à absorber, refléter ou diffuser les rayons UV du soleil. Un produit solaire doit avoir des quantités suffisantes de

ces agents protecteurs pour assurer une protection de haut niveau. Des écrans solaires à FPS plus élevés offrent une meilleure protection contre les coups de soleil (Mishra *et al.*, 2012).

La mesure quantitative de FPS est le moyen ultime de déterminer l'efficacité de la formulation d'un écran solaire et est devenue une norme mondiale pour mesurer l'efficacité des produits de protection solaire contre les rayons UV nocifs du soleil. Même si plusieurs écrans solaires synthétiques sont disponibles, ils ont des applications limitées dans les cosmétiques en raison de leur toxicité potentielle chez l'homme et de leur capacité à n'interférer que dans certaines voies de cancérogenèse (Mbangwa *et al.*, 2014).

Ces dernières années, les composés naturels ont fait l'objet d'une attention considérable en tant qu'agents protecteurs (Khazaeli & Mehrabani, 2010). Les substances phénoliques sont capables d'agir en cascade de signalisation sensible à l'oxydo-réduction pour inhiber les dommages causés à l'ADN. Les substances phénoliques pourraient être utiles pour prévenir la génération de radicaux libres d'oxygène induite par les UV et la peroxydation des lipides, c'est-à-dire les événements impliqués dans des états pathologiques tels que le photo-vieillessement et le cancer de la peau. L'activité antioxydante est importante également pour la protection contre les UV (Kittiwannachot *et al.*, 2008).

Par conséquent, ces formulations à base de plantes, à des concentrations optimales, pourraient produire plusieurs effets bénéfiques pour la peau, en plus de fonctionner comme filtres UV, ce qui est l'un des objectifs de cette étude (Mbangwa *et al.*, 2015).

Aucune activité photoprotectrice de *S. oleraceus L.* n'a été signalée auparavant dans la littérature. Par conséquent, les données présentées dans cette communication pourraient être le premier rapport de la littérature sur cette espèce. Dans cette étude, l'extrait butanolique avait une activité photoprotectrice la plus élevée et peut être employé dans les formulations des produits de protection solaire pour protéger la peau des coups de soleil. Selon la littérature publiée, il existe une forte corrélation entre le FPS et les composés phénoliques (Yasmeen & Gupta, 2016), ce qui est en accord avec nos résultats.

L'acceptation des consommateurs est considérable lorsque les écrans solaires sont préparés à partir des extraits de plantes. Outre le filtrage des rayons UV, les combinaisons à base de plantes ont plusieurs effets bénéfiques sur la peau (Mbangwa *et al.*, 2015).

Une étude indique qu'en raison de la présence de grandes quantités de flavonoïdes et de composés phénoliques, il y a une augmentation de la valeur FPS dans les extraits de plantes

avec une activité de 24,79 et 25,69 (**Khazaeli & Mehrabani, 2010**). Une autre étude menée par Mishra et ses collègues (2012), a déclaré que les flavonoïdes et les composés phénoliques ont d'excellentes propriétés antioxydantes et photoprotectrices. Par conséquent, il est nécessaire de rechercher les composés phénoliques et les flavonoïdes des espèces végétales sélectionnées pour préparer des formulations d'écran solaire topiques à partir de ces extraits.

Des recherches récentes se concentrent sur l'utilisation d'antioxydants d'origine végétale dans les écrans solaires pour assurer la photoprotection. La plante étudiée *S. oleraceus L.* contient des composés phénoliques et des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres, ce qui est en corrélation avec la propriété antioxydante. Le criblage phytochimique de la plante a montré la présence de flavonoïdes, terpénoïdes, saponines et sucres réducteurs dans les parties aériennes qui facilitent plus l'absorption des extraits de la lumière UV.

On a constaté que les valeurs élevées du SPF de *S. oleraceus L.* peuvent être dues à leur forte teneur en phénols et en flavonoïdes. Une concentration élevée de flavonoïdes tels que l'apigénine dans les plantes peut également être utilisée pour empêcher la génération de radicaux libres d'oxygène induite par les UV. L'analyse phytochimique par LC-MS/QTOF a décrit la présence de flavonoïdes, et d'autres constituants comme l'acide ascorbique et les sesquiterpènes lactones dans l'extrait le plus actif EBU, qui sont des substances décrites avec une action photoprotectrice (**Costa et al., 2015**).

Sur une base molaire, l'acide L-ascorbique est l'antioxydant prédominant dans la peau qui a une concentration plus élevée dans l'épiderme que dans le derme. En outre, la peau utilise principalement la vitamine C pour protéger les compartiments aqueux des cellules et la vitamine E (Vit E) pour protéger les structures lipidiques (**Segal et al., 2008**), ce qui augmente la photoprotection. La vitamine C a été largement étudiée et appliquée au cours des dernières décennies en tant qu'antioxydant et cofacteur dans la synthèse du collagène. De manière générale, la vitamine C est efficace dans le traitement de l'hyperpigmentation, la différenciation des kératinocytes, la prévention des photo-dommages de la peau et peut également améliorer la cohésion de la jonction dermo-épidermique (**Waibel et al., 2016**).

Les terpènes et ses dérivés sont des agents prometteurs pour soigner les brûlures de la peau et accélérer le processus de régénération cutanée. Ils sont utilisés dans le traitement de diverses affections cutanées en régulant la biosynthèse de la mélanine et ils ont une activité antioxydante (**Xu et al., 2018**). L'un des triterpènes les plus populaires est le lupéol qui est

trouvé dans l'extrait chloroformique 'ECh' de la présente étude, qui pourrait traverser la barrière cutanée et au médicament de pénétrer à travers la couche cornée '*stratum corneum*' (la couche la plus externe de la peau qui est lipophile) (Wertz *et al.*, 1985). Ces travaux justifient l'activité photoprotectrice de nos extraits. Cette activité prouvée de la plante, montre son importance et son utilité prophylactique dans la formulation anti-solaire. Ce sera une alternative meilleure, moins chère et sûre aux écrans solaires chimiques nocifs utilisés aujourd'hui dans l'industrie (Shenekar *et al.*, 2014).

Comme les plantes contiennent une large gamme de composés naturels avec une gamme complète de capacités d'absorption des UV. Des études *in vitro* de quelques composés phénoliques de diverses plantes se sont révélées mutagènes. Cela pourrait être le résultat d'une action pro-oxydante qu'antioxydante de ces composés. Malgré la disponibilité de diverses applications d'écran solaire synthétique, ses applications sont limitées à cause de leurs effets nocifs sur la peau. Compte tenu de l'utilisation humaine en tant que FPS, il est indispensable d'étudier les effets toxiques des extraits (Priyanka *et al.*, 2018) ; ce qui est le prochain objectif de cette thèse.

Finalement, on note que les données obtenues par HPLC/QTOF/MS s'accordent avec ceux obtenus par le dosage spectrophotométrique. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux, en flavonoïdes et en flavonols sont identifiées dans les extraits acétate d'éthyle EAe, butanolique EBu et hydro-méthanolique EBr. Ainsi, la présente étude a montré de bonnes activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anticholinestérasiques et dermatoprotectrices des extraits polaires, ce qui suggère que ces extraits contiennent de bonnes sources de composés phénoliques qui peuvent être utiles dans la gestion de la maladie d'Alzheimer 'MA'

Chapitre III

Etudes toxicologiques de *Sonchus*

oleraceus L.

VII. Toxicité aiguë *in vivo* des extraits de *Sonchus oleraceus L.*

VII.1. Détermination de la dose létale DL₅₀ des extraits brut et acétate d'éthyle

La toxicité aiguë des extraits bruts et acétate d'éthyle de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.* a été estimée en utilisant la méthode décrite par (Lorke *et al.*, 1983).

Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë des extraits de la plante étudiée par voie orale ont présenté une carte clinique dépourvue de signes de toxicité (tableau 14) après administration des doses suivantes (10, 100, 1000, 1600, 2900 et 5000 mg/kg de poids corporel) des extraits.

Leur comportement était semblable à celui des souris témoins. Tous les animaux ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation, ce qui implique que la DL₅₀ est supérieure à 5000 mg/kg. Selon le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (Unies, 2011), les deux extraits peuvent être classés dans la catégorie 5 et considéré comme une substance non toxique par voie orale.

Tableau 14 : toxicité aiguë des extraits brut 'EBr' et acétate d'éthyle 'EAe'.

Extrait	Dose (mg/kg p.c)	Mortalité	Indices comportementaux de toxicité
EBr	10	0/6	Aucune
	100	0/6	Aucune
	1000	0/6	Aucune
	1600	0/6	Aucune
	2900	0/6	Aucune
	5000	0/6	Aucune
EAe	10	0/6	Aucune
	100	0/6	Aucune
	1000	0/6	Aucune
	1600	0/6	Aucune
	2900	0/6	Aucune
	5000	0/6	Aucune

Selon la classification de (Hodge & Sterner, 1943) et le protocole de Lorke, l'extrait brut et acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante *S.oleraceus L.* est pratiquement non toxique par voie orale en une prise unique.

VII.1.1. Autopsie générale

À la fin de l'étude, l'autopsie n'a révélé aucune modification pathologique importante dans les organes des animaux d'essai examinés. L'examen histopathologique n'a pas été effectué, car l'examen macroscopique n'a montré aucune anomalie liée au traitement par les deux extraits.

VII.2. Toxicité subaiguë

VII.2.1. Observations comportementales et modèles de mortalité

L'administration orale d'extraits EBr et EAe aux doses (250, 500, 1000 et 2000 mg/kg p.c) pendant 28 jours successifs à des souris femelles n'a montré aucun changement de comportement ni aucun malaise par rapport au témoin respectivement. Les résultats indiqués ont montrés que la $DL_{50} > 2000$ mg/kg.

VII.2.2 Détermination de l'évolution de la masse des animaux et des organes

VII.2.2.1. Effets des extraits de *S.oleraceus* sur le poids corporel et le poids relatif

A. Effets des extraits sur le poids corporel de souris

Tout au long du protocole expérimental, les souris ont été pesées une fois par semaine. Ceci nous a permis de calculer l'évolution du poids corporel dans les différents lots. Les résultats obtenus, concernant l'évolution du poids corporel et du poids relatif des animaux, sont montrés dans les tableaux 15, 16 et les figures 24, 25 ci-dessous.

Tableau 15 : Evolution du poids corporel des souris traitées par l'extrait brut EBr en g.

Lots (L)	JOURS				
	J0	J7	J14	J21	J28
L Témoin	22,33±1,53	25,67±2,08	28,00±1,00	29,67±1,53	31,00±2,65
L1 (250mg/kg)	26,86±3,44	30,33±3,72	30,17±3,66	31,33±4,46	31,67±5,32
L2 (500mg/kg)	30,20±6,42	30,80±7,36	32,20±7,43	29,00 ±7,00	29,67±6,81
L3 (1000mg/kg)	30,60±3,21*	32,60±3,58	35,20±3,03*	36,20±4,66	33,80±8,90
L4 (2000mg/kg)	31,20±4,38	32,60±5,18	34,00±4,36	34,80±7,16	35,00±8,25

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart type (n= 6). Les niveaux de significativité sont exprimés par :

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

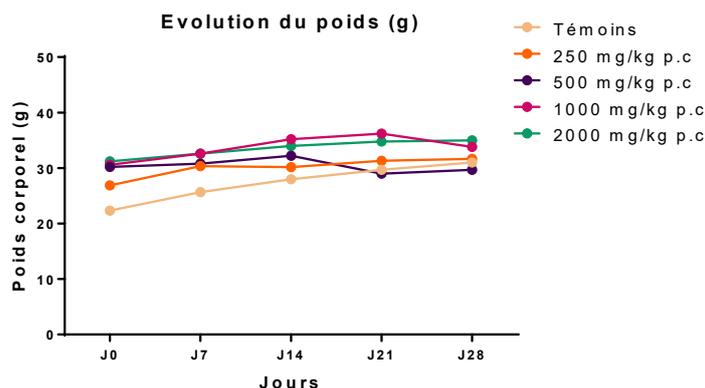


Figure 24 : Variations du poids corporel (g) des souris témoins et traitées oralement dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut EBr.

Les valeurs sont présentées en moyenne±écart-type, n=6 souris/groupes.

L'administration de l'extrait brut de *S. oleraceus L.* aux doses de (250, 500, 1000 et 2000 mg/kg) n'a entraîné aucune variation significative du poids corporel des animaux traités à l'extrait, comparés aux animaux contrôles (Figure 24). Par contre, comparées au jour d'administration de l'extrait (J0), il a été noté une augmentation du poids corporel des animaux à J7 et J14 jusqu'au 28J après administration de l'extrait. D'après la figure, l'augmentation du poids corporel est significative ($p=0,05$) à J14 chez le lot traité à 1000 mg/kg. Dans les groupes contrôles, comparé à J0, on note une augmentation non significative du poids corporel jusqu'au J28 (Figure 24). Par ailleurs, les autres lots ont présenté une évolution corporelle normale et similaire à celle du lot témoin.

Tableau 16 : Evolution du poids corporel des souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle EAe en g (*).

Lots (L)	JOURS				
	J0	J7	J14	J21	J28
L Témoin	23,25±3,30	28,25±4,65	28,50±5,26	28,75±5,91	28,75±5,97
L1 (250mg/kg)	27,71±2,93	32,29±4,07	31,29±3,55	30,29±3,40	30,14±3,85
L2 (500mg/kg)	28,20±5,63	31,20±0,84	30,40±1,14	31,20±2,05	31,20±2,17
L3 (1000mg/kg)	28,80±2,77	34,40±5,86	33,40±6,47	34,20±5,50	33,40±5,41
L4 (2000mg/kg)	28,60±2,70	36,00±4,90*	35,00±4,42	34,20±5,50	33,40±6,02

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart type. (n= 6). Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

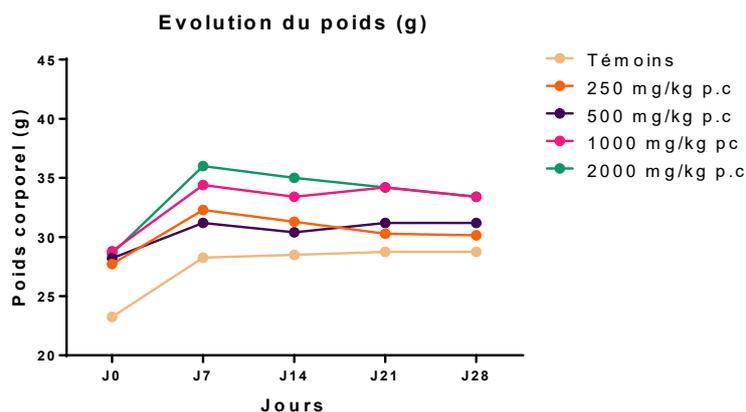


Figure 25 : Variations du poids corporel (g) des souris témoins et traitées oralement dans les conditions de la toxicité subaiguë par l'extrait acétate d'éthyle EAe.

Les valeurs sont présentées en moyenne±écart type, n=6 souris/groupes.

L'administration de l'extrait acétate d'éthyle de *S. oleraceus L.* à la dose de 2000 mg/kg a entraîné à J7, une augmentation significative ($p=0,01$) du poids corporel des souris traitées, comparées aux groupes témoins (Figure 25). Aucune variation significative du poids corporel n'a été constatée entre le groupe témoin et les autres groupes traités pendant toute la période d'étude. En outre, aucun signe de toxicité ni aucune mort d'animal n'ont été observés à une dose quelconque allant jusqu'au maximum de 2000 mg/kg pendant les 4 semaines de traitement oral répété.

VII.2.2.2. Effets des extraits de *S.oleraceus L.* sur le poids relatif des différents organes dans les conditions de la toxicité subaiguë

A. Effet sur le poids relatif des organes

Le jour du sacrifice, les poids des organes ont été mesurés. Ceci nous a permis de calculer le poids relatif de ces organes ($\text{poids de l'organe} * 100 / \text{poids de l'animal}$) et d'en évaluer la variation entre les différents lots. Les résultats obtenus, concernant l'évolution du poids relatif des organes, sont montrés dans les tableaux et les figures ci-dessous.

D'après les tableaux 17 et 18, il n'existe pas de variation significative au niveau des poids relatifs de tous les organes étudiés, à savoir le foie, les reins, la rate, les poumons et le cœur. Mais, on note quand même une augmentation non significative des poids relatifs du foie et des reins, chez les souris traitées par l'EBr comparativement aux témoins. Lors du traitement des souris par l'extrait EBr du laitron maraicher, nous observons une légère perte de poids dans la rate, les poumons et le cœur.

Tableau 17 : Effet de l'extrait brut EBr de *Sonchus oleraceus L.* sur le poids relatif des organes chez les souris témoins et traitées dans les conditions de toxicité subaiguë.

	Témoin	Lot 1 EBr 250mg/kg	Lot 2 EBr 500mg/kg	Lot 3 EBr 1000mg/kg	Lot 4 EBr 2000mg/kg
Foie	6,89±0,35	7,50±0,51	7,42±0,82	8,58±0,79	6,97±0,56
Reins	1,15±0,13	1,42±0,17	1,65±0,21	1,67±0,14	1,45±0,14
Rate	1,23±0,27	0,98±0,19	0,92±0,29	0,88±0,14	0,96±0,25
Poumons	1,34±0,11	1,36±0,09	1,14±0,06	1,17±0,16	1,23±0,31
Cœur	0,60±0,05	0,59±0,06	0,56±0,06	0,57±0,05	0,50±0,06

Les valeurs représentent la moyenne±SEM de six échantillons dans chaque groupe.

Au niveau des lots de souris chez lesquels l'extrait acétate d'éthyle EAe de la plante a été administré, on note de légères diminutions du poids relatifs des organes par rapport au lot témoin (tableau 25).

Tableau 18 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle EAe de *Sonchus oleraceus L.* sur le poids relatif des organes chez les souris témoins et traitées dans les conditions de toxicité subaiguë.

	Témoin	Lot 1 EAe 250mg/kg	Lot 2 EAe 500mg/kg	Lot 3 EAe 1000mg/kg	Lot 4 EAe 2000mg/kg
Foie	8,19±0,84	7,68±0,55	6,79±0,47	5,60±0,35	6,63±0,59
Reins	1,55±0,13	1,62±0,10	1,20±0,18	1,29±0,16	1,51±0,10
Rate	1,06±0,29	1,31±0,33	0,86±0,31	0,87±0,17	0,87±0,21
Poumons	1,39±0,14	1,19±0,05	1,10±0,11	1,23±0,17	1,14±0,10
Cœur	0,66±0,03	0,66±0,06	0,54±0,03	0,57±0,08	0,59±0,07

Les valeurs représentent la moyenne±SEM de six échantillons dans chaque groupe.

VII.2.3. Variations des paramètres biochimiques, hématologiques et histologiques

VII.2.3.1. Evaluation de l'action des extraits sur les marqueurs biochimiques (fonction rénal et hépatique) des organes

❖ Paramètres biochimiques

Généralement, les paramètres biochimiques des cinq lots correspondent aux normes physiologiques citées par plusieurs auteurs pour l'espèce *mus musculus*. L'analyse statistique des paramètres biochimiques par *One-way ANOVA* et le post-hoc *Dunnnett t-test* ont été utilisés et ont été enregistrée dans les tableaux 19 et 20.

A. La fonction rénale

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction rénale sont présentés dans les figures 26 et 27 et les tableaux 19 et 20. La concentration de la créatinine sérique des souris traitées par l'extrait brut EBr montre une légère diminution non significative, par contre l'élévation de la créatinine a été significative ($p < 0,05$) par rapport à celle des animaux témoins pour les souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle EAe (Figure 26).

Il convient de constater, que l'extrait acétate d'éthyle EAe a provoqué une augmentation de l'activité de l'urée chez les souris. Cette augmentation a été très significative ($p < 0,01$) à 500 mg/kg p.c ($0,28 \pm 0,06$ g/L) par rapport au groupe témoin ($0,14 \pm 0,03$ g/L) (tableau 20). Cependant, les concentrations de glucose à jeun et de l'acide urique n'ont enregistré aucune différence significative ($p > 0,05$) quel que soit la dose ou l'extrait injecté par rapport aux groupes de contrôle (Figure 27).

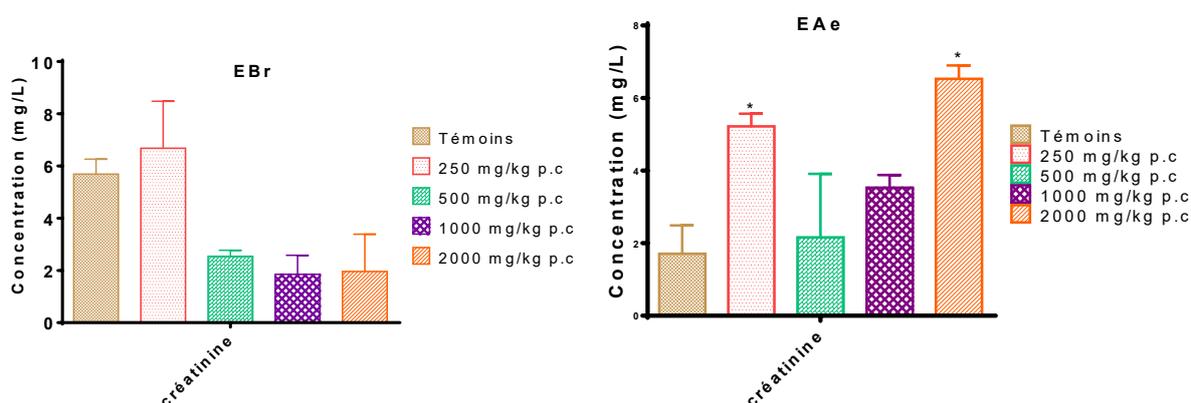


Figure 26 : Taux sérique de « créatinine » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c d'extrait brut EBr et d'acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de *Sonchus oleraceus* L.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

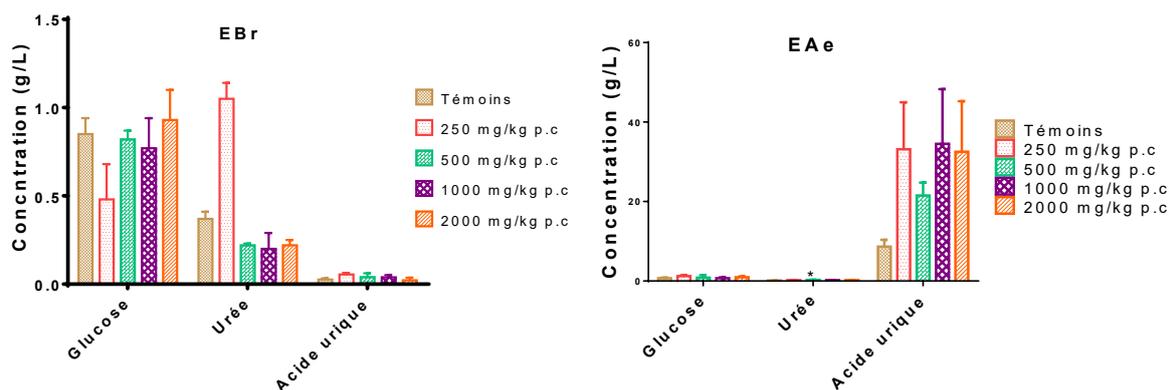


Figure 27 : Taux sérique de « glucose, l'urée et l'acide urique » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c d'extrait brut EBr et d'acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

B. La fonction hépatique

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction hépatique sont présentés dans les figures et les tableaux ci-dessous. L'évaluation des transaminases hépatiques (l'ASAT: L'Aspartate amino-transférase et de l'ALAT: l'Alanine amino-transférase) présentent une légère augmentation non significative comparée à celle de témoin traité par l'EBr (Figure 28). Alors que l'EAe a provoqué une augmentation de l'ALAT. Cette augmentation a été très significative ($p < 0,001$) à 500 mg/kg p.c ($128,67 \pm 55,38$ UI/L) par rapport au témoin ($40,70 \pm 10,93$ UI/L) (tableau 20). En revanche, l'activité enzymatique de l'ALAT a été significativement augmentée chez les animaux traités par l'EAe que chez les animaux traités par l'EBr par rapport au témoin. Par ailleurs, L'action des extraits EBr et EAe sur les marqueurs biochimiques du foie (ASAT et ALAT) n'est pas dose-dépendante.

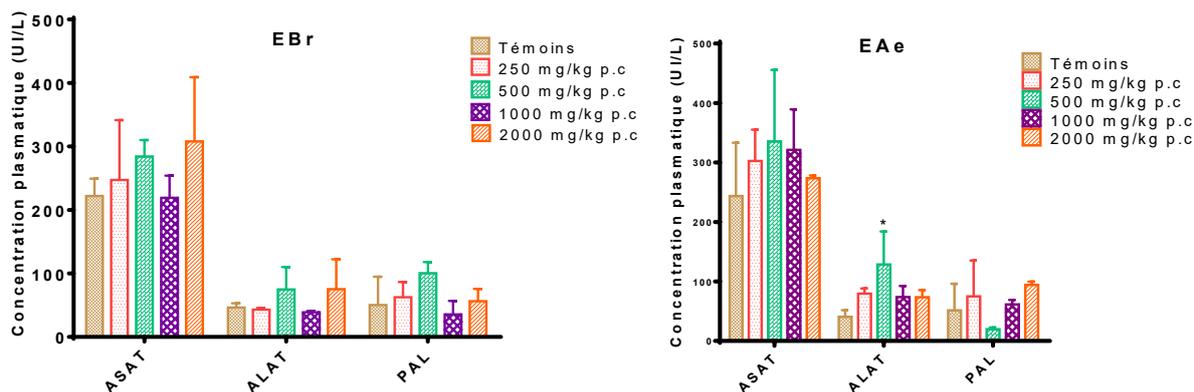


Figure 28 : Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.*

Les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

Pour la dose 1000 mg/kg, on a remarqué une diminution non significative de l'activité de la phosphatase alcaline 'PAL' et une légère élévation dans la concentration de protéines totales mais n'étaient pas significativement différente par rapport à celles du groupe témoin ($p > 0,05$) (Figure 28). Ce qui diffère des souris traitées par l'EAe, à la dose de 2000 mg/kg p.c, l'élévation de la concentration des protéines totales a été significative ($p < 0,05$) avec des valeurs de $(65,31 \pm 2,21 \text{ g/L})$ en comparaison avec le lot témoin $(42,70 \pm 4,94 \text{ g/L})$.

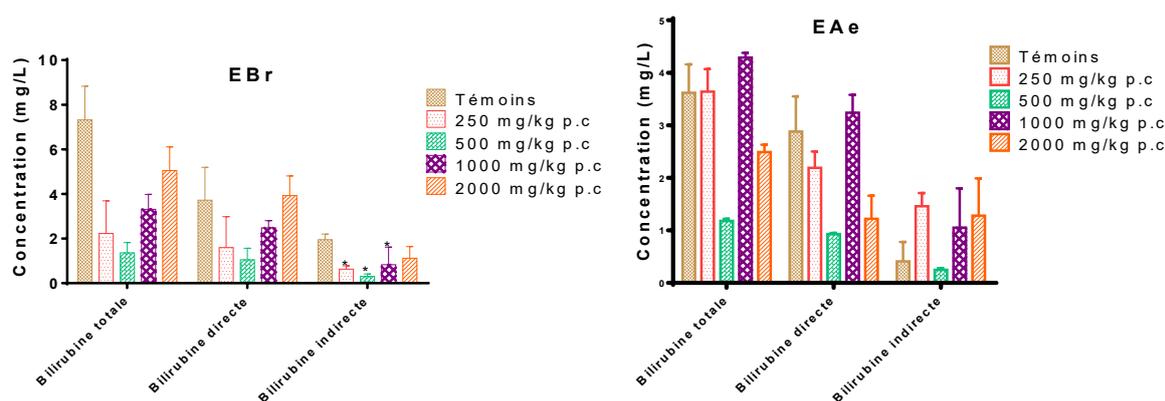


Figure 29 : Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.*

Les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

En outre, aucune différence significative n'a été constatée entre tous les groupes traités par l'EBr en ce qui concerne le niveau de bilirubine totale, de la bilirubine directe, du triglycéride et de cholestérol (Fig. 29 et 32). Alors que l'E Ae a provoqué une augmentation de cholestérol chez les souris. L'élévation de la concentration a été très significative ($p < 0,01$) aux doses 500-2000 mg/kg p.c ($1,20 \pm 0,24$; $1,03 \pm 0,10$; $1,04 \pm 0,01$ g/L) par rapport au groupe témoin ($0,61 \pm 0,11$ g/L).

Par contre, une diminution significative ($p < 0,01$) de l'activité de la bilirubine indirecte a été notée chez les souris traitées à la dose 250, 500 et 1000 mg/kg d'extrait EBr avec des concentrations de ($0,63 \pm 0,15$; $0,31 \pm 0,10$; $0,83 \pm 0,79$ mg/L) par rapport au groupe témoin de DMSO ($1,95 \pm 0,25$ mg/L). Tandis que, les valeurs de LDL ont montrés une augmentation très significative ($p < 0,01$) à 500 et 2000 mg/Kg p.c ($0,38 \pm 0,15$ et $0,39 \pm 0,05$ g/L) en comparaison avec le lot témoin ($0,11 \pm 0,03$ g/L).

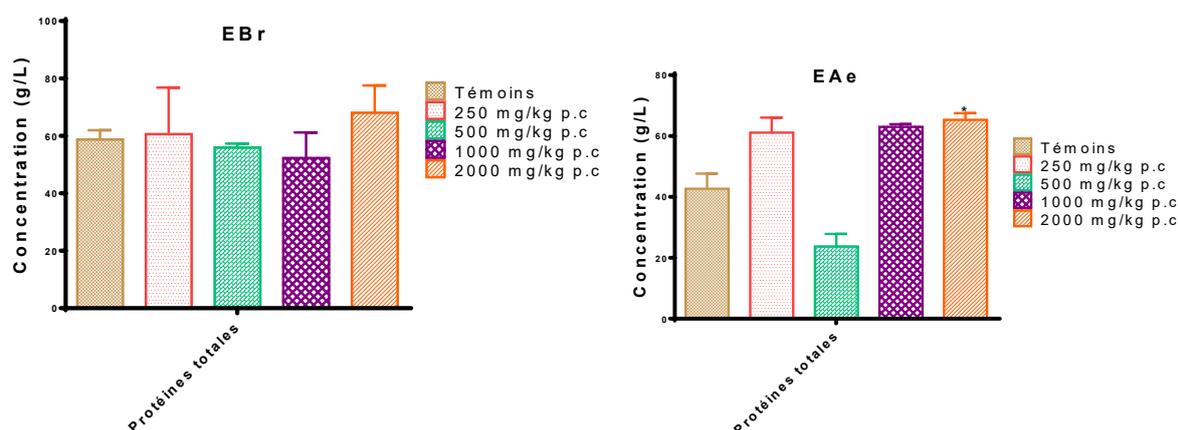


Figure 30 : Taux sérique de « protéines totales » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.*

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

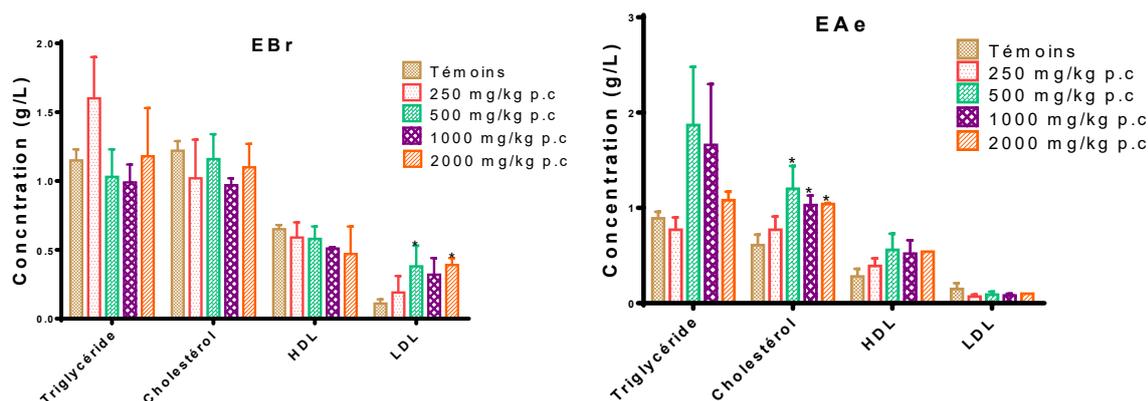


Figure 31 : Taux sérique de « triglycéride, cholestérol, HDL et LDL » de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par différentes doses de 250-2000 mg/kg p.c des extraits de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus L.*

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. EBr : extrait brut ; EAe : extrait acétate d'éthyle. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

Ceci nous permet de conclure que l'application orale à dose répétée de l'extrait brut de la plante, à la dose suscitée, entraîne une perturbation de LDL ainsi que la fonction hépatorenale notamment la bilirubine indirecte. Tandis que l'extrait acétate d'éthyle, a entraîné un trouble lipidique et hépatorenal : au niveau de cholestérol, d'ALAT, d'urée, de créatinine et des protéines totales.

Tableau 19 : Valeurs des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut EBr des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

Paramètres	Témoin DMSO	EBr 250 mg/kg	EBr 500 mg/kg	EBr 1000 mg/kg	EBr 2000 mg/kg
Glucose (g/L)	0,85±0,09	0,48±0,20	0,82±0,45	0,77±0,17	0,93±0,17
Créatinine (mg/L)	5,69±0,57	6,68±6,80	2,54±0,23	1,85±0,73	1,96±1,43
Urée (g/L)	0,37±0,42	1,05±1,39	0,22±0,01	0,20±0,09	0,22±0,03
Acid urique 'AU' (mg/L)	25,53±6,51	54,94±9,07	40,16±21,93	38,51±11,75	22,09±15,32
Triglycérides (TG) (g/L)	1,15±0,68	1,60±0,30	1,03±0,20	0,99±0,13	1,18±0,35
Cholestérol (g/L)	1,22±0,07	1,02±0,28	1,16±1,18	0,97±0,05	1,10±0,17
HDL (g/L)	0,65±0,03	0,59±0,11	0,58±0,09	0,51±0,01	0,47±0,20
LDL (g/L)	0,11±0,03	0,19±0,12	0,38±0,15*	0,32±0,12	0,39±0,05*
ASAT (UI/L)	222,00±27,1 9	247,27±94,3 1	284,19±25,78	219,15±34,9 7	308,07±101,0 9
ALAT (UI/L)	46,40±6,54	42,94±2,79	74,88±35,13	38,88±2,06	75,31±47,06
Phosphatase alkaline 'PAL' (UI/L)	50,29±44,53	62,57±23,98	100,39±17,62	35,49±21,28	56,21±19,49
Bilirubine totale (mg/L)	7,32±2,51	2,23±1,46	1,36±0,46	3,31±0,67	5,05±2,06
Bilirubine directe (mg/L)	3,72±1,47	1,60±1,38	1,05±0,52	2,48±3,32	3,93±3,88
Bilirubine indirecte (mg/L)	1,95±0,25	0,63±0,15*	0,31±0,10*	0,83±0,79*	1,12±0,52
Protéines totales 'PT' (g/L)	58,73±3,24	60,62±16,24	55,95±1,38	52,28±8,92	68,06±9,53

Les valeurs sont présentées en moyenne±SD. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

Tableau 20 : Valeurs des paramètres biochimiques des souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait acétate d'éthyle EAe des parties aériennes de *Sonchus oleraceus* L.

Paramètres	Témoin Eau physiologique	EAe 250 mg/kg	EAe 500 mg/kg	EAe 1000 mg/kg	EAe 2000 mg/kg
Glucose (g/l)	0,72±0,13	1,22±0,27	0,85±0,64	0,71±0,20	0,97±0,19
Créatinine (mg/l)	1,71±0,78	5,22±0,35*	2,16±1,75	3,53±0,35	6,53±0,37*
Urée (g/l)	0,14±0,03	0,21±0,05	0,28±0,06*	0,21±0,02	0,24±0,01
Acide urique 'AU' (mg/l)	8,67±1,71	33,15±11,82	21,51±3,26	34,50±13,78	32,51±12,75
Triglycérides 'TG' (g/l)	0,89±0,07	0,77±0,13	1,87±0,61	1,66±0,64	1,08±0,09
Cholestérol (g/l)	0,61±0,11	0,77±0,14	1,20±0,24*	1,03±0,10*	1,04±0,01*
HDL (g/l)	0,28±0,08	0,39±0,08	0,56±0,17	0,52±0,14	0,54±0,00
LDL (g/l)	0,15±0,06	0,07±0,02	0,09±0,03	0,08±0,02	0,10±0,00
ASAT (UI/l)	243,76±89,43	302,71±52,67	335,53±120,18	321,26±68,07	273,61±4,48
ALAT (UI/l)	40,70±10,93	79,54±8,81	128,67±55,38*	73,78±18,63	73,55±11,89
phosphatase alcaline 'PAL' (UI/l)	51,49±44,68	74,94±60,20	19,64±3,02	61,40±7,47	94,32±5,36
Bilirubine totale (mg/l)	3,62±1,54	3,64±2,43	1,18±0,04	4,29±2,09	2,49±1,14
Bilirubine directe (mg/l)	2,88±1,67	2,19±1,31	0,93±0,02	3,24±1,34	1,22±0,44
Bilirubine indirecte (mg/l)	0,41±0,37	1,46±1,25	0,25±0,03	1,05±0,75	1,28±0,71
Protéines totales 'PT' (g/l)	42,70±4,94	61,12±4,94	23,74±4,12	63,01±0,89	65,31±2,21*

Les valeurs sont présentées en moyenne±SD. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

VII.2.3.2. Evaluation de l'action des extraits bruts EBr et acétate d'éthyle EAe sur les paramètres hématologiques

L'effet de l'administration orale subaiguë des extraits EBr et EAe de *Sonchus oleraceus* L. (250-2000 mg/kg) sur les paramètres hématologiques des souris femelles est présenté dans les tableaux 21 et 22 et ont été étudié statistiquement par *Dunnett t-test* post-hoc.

A. Effets de l'EBr et l'EAe sur les paramètres de la lignée érythrocytaire (globules rouges, hémoglobine, hématocrite, MCV, MCH, CCMH)

Les valeurs des globules rouges, de l'hémoglobine et des hématocrites (tableau 21) ont été augmentées significativement ($p < 0,0001$). Une élévation significative de globules rouges (GR à 1000-2000 mg/kg), d'hémoglobine (Hb) et d'hématocrite (à 1000 et 2000 mg/kg respectivement) a été enregistrée. Par contre, à la dose de 500 mg/kg les souris ont montré une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) des GR, d'hémoglobine et d'hématocrite par rapport au groupe de contrôle de DMSO.

Les souris traitées avec un extrait acétate d'éthyle EAe ont montré une légère augmentation non significative d'hémoglobine par rapport au groupe de contrôle d'eau physiologique. Alors que les valeurs des globules rouges, d'hématocrites ont été constantes (tableau 22).

Pour les MCV, cette augmentation a été très significative ($p < 0,001$) à la dose 500 et 1000 mg/kg ($55,30 \pm 0,10$ et $54,40 \pm 0,30$ fl.) comparativement aux témoins ($49,85 \pm 0,98$ fl.) ; contrairement aux souris traitées par l'EAe qui avaient des valeurs constants de MCV.

Les MCH ont connu une variation très significative dont les valeurs ont été diminuées ($p < 0,001$) aux doses (250, 500 et 2000mg/kg), par rapport au lot témoin. Idem pour l'extrait EAe, MCH a connu un déclin significatif ($p < 0,001$) sur toutes les doses à l'exception de la dose 1000 mg/kg p.c.

Pour la CCMH, la diminution constatée a été hautement significative ($p < 0,0001$) à toutes les doses comparativement aux témoins (tableau 21). Pour les lots traités par l'EAe, la concentration de CCMH a été baissée de manière non significative aux différentes doses testées.

En outre, l'analyse hématologique du sang a révélé des changements significatifs des paramètres calculés. Toutefois, ces changements ne sont pas produits simultanément dans les groupes d'animaux et n'étaient pas dose-dépendant.

B. Effets de l'EBr et l'EAE sur les paramètres de la lignée leucocytaire (globules blancs, neutrophiles, lymphocytes, éosinophiles, basophiles, et monocytes)

Notant que l'étude statistique, par *Dunnnett t-test*, a montré que toutes les différences entre les groupes pour les paramètres de la lignée leucocytaire (globules blancs, neutrophiles, lymphocytes, éosinophiles et monocytes) étaient hautement significatives pour toutes les doses d'EBr testées. De même, les souris traitées par l'EAE ont montrées une augmentation hautement significative ($p < 0,0001$) des monocytes, des basophiles et une grande diminution significative des lymphocytes ($p < 0,0001$) sur toutes les doses utilisées. Les globules blancs ont subi une diminution significative ($p < 0,001$) aux doses (500 et 1000 mg/kg p.c), de plus les neutrophiles ont été accrus aux doses (1000 et 2000 mg/kg p.c).

Les basophiles ont subi une augmentation très significative ($p < 0,001$) à la dose 1000 mg/kg ($0,40 \pm 0,09\%$) comparativement aux témoins ($0,02 \pm 0,01\%$).

C. Effets de l'EBr et de l'EAE sur les plaquettes sanguines

L'EBr a entraîné une diminution des plaquettes sanguines chez les souris pour toutes les doses utilisées (tableau 21). Cette diminution est plus significative au lot 1 ($143,00 \pm 3,00 \cdot 10^3/\mu\text{L}$, $p < 0,0001$) comparativement aux témoins ($695,70 \pm 71,90 \cdot 10^3/\mu\text{L}$). Alors que l'EAE a causé une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) aux doses (250, 500 et 1000 mg/kg p.c) par rapport au lot témoin.

Ceci nous laisse conclure que l'application orale à dose répétée d'une durée de 28 jours de l'extrait brut et l'extrait acétate d'éthyle de laitron maraicher ont entraînés une forte perturbation des paramètres hématologiques.

Tableau 21 : Valeurs des paramètres hématologiques de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par l'extrait brut de *S.oleraceus L.* des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

Paramètres	Témoin DMSO	EBr 250 mg/kg p.c	EBr 500 mg/kg p.c	EBr 1000 mg/kg p.c	EBr 2000 mg/kg p.c
GB (10³/μL)	7,05±0,03	5,53±0,47***	2,95±0,06** *	8,42±0,37***	9,60±0,15***
Neutrophiles (%)	19,50±0,24	66,40±0,20***	56,30±0,20* **	22,50±0,53***	42,70±0,01***
Lymphocytes (%)	50,71±0,34	3,40±0,15***	40,00±1,00* **	73,40±0,38***	8,60±0,36***
Eosinophiles (%)	1,27±0,18	4,09±0,46***	3,40±0,16** *	3,10±0,16***	2,60±0,02***
Monocytes (%)	2,07±0,09	25,70±2,27***	0,20±0,05** *	1,00±0,11*	46,00±4,00*
Basophiles (%)	0,02±0,01	0,40±0,09***	0,10±0,01	0,00±0,00	0,10±0,09
GR (10⁶/μL)	7,42±0,22	8,10±0,05*	4,05±0,18** *	8,39±0,20**	9,02±0,43***
Hémoglobine (g/dL)	11,12±0,12	11,50±0,27	6,10±0,11** *	13,40±0,18***	12,70±0,27***
Hématocrite (%)	36,93±0,37	38,50±0,08	22,40±0,27* **	45,60±0,48***	42,90±0,52***
MCV ou VGM (fl.)	49,85±0,98	47,50±2,28	55,30±0,10* **	54,40±0,30**	47,60±0,36
MCH ou TCMH (pg)	16,99±0,46	14,20±0,47**	15,00±1,03*	16,00±0,33	14,10±0,01***
CCMH (g/dL)	35,39±0,28	29,90±1,58***	27,20±0,21* **	29,40±0,04***	29,60±0,29***
Plaquettes (10³/μL)	695,70±71,9 0	143,00±3,00** *	211,00±11,0 0***	454,00±57,00* **	364,00±93,00** *

Les valeurs sont présentées en moyenne±SD. Pas de différence significative par rapport au groupe de contrôle si l'on considère $p > 0,05$ pour les différents paramètres hématologiques. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

Tableau 22 : Valeurs des paramètres hématologiques de souris témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par l'extrait acétate d'éthyle de *S.oleraceus L.* des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.*

Paramètres	Témoin	E Ae 250 mg/kg p.c	E Ae 500 mg/kg p.c	E Ae 1000 mg/kg p.c	E Ae 2000 mg/kg p.c
GB (10³/μL)	7,05±0,60	6,82±0,88	4,30±0,59***	4,65±1,00**	5,65±0,23
Neutrophiles (%)	19,5±0,10	33,67±13,08	1,87±1,20***	65,90±5,19*	54,00±3,78*
Lymphocytes (%)	50,71±0,29	11,50±0,54***	0,51±0,34***	5,20±0,83***	8,80±0,94***
Eosinophiles (%)	1,27±0,18	9,37±1,34	0,26±0,05	5,09±0,58	1,60±0,18
Monocytes (%)	2,07±0,04	38,70±0,74***	1,96±0,01	23,70±1,45***	35,40±2,41***
Basophiles (%)	0,02±0,01	0,10±0,01***	0,01±0,00	0,10±0,03***	0,20±0,01***
GR (10⁶/μl)	7,42±0,29	7,93±0,71	7,59±0,51	8,21±0,55	8,61±0,19
Hémoglobine (g/dl)	11,12±0,04	11,40±0,62	11,20±1,17	12,80±0,73	12,70±0,02
Hématocrite (%)	36,60±0,45	37,51±5,38	36,70±4,72	41,30±0,63	40,30±3,68
MCV ou VGM (fl)	49,85±0,49	47,30±7,09	48,30±7,32	50,30±0,63	46,80±1,18
MCH ou TCMH (pg)	16,99±0,44	14,40±1,43*	14,80±0,71*	15,50±0,48	14,80±0,59*
CCMH (g/dl)	35,39±0,07	30,50±0,83	30,60±1,55	30,90±2,56	31,60±3,26
Plaquettes (10³/μl)	695,70±106,70	348,00±54,00**	137,00±31,00**	291,00±65,00**	636,00±22,00

Les valeurs sont présentées en moyenne±SD. Pas de différence significative par rapport au groupe de contrôle si l'on considère $p > 0,05$ pour les différents paramètres hématologiques. Les niveaux de significativité sont exprimés par : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

VII.2.4. Analyse histopathologique

À la fin du traitement, l'examen macroscopique des organes internes du groupe témoin et du groupe traité, notamment le foie, les reins, la rate, le cœur et les poumons n'a révélé aucune anomalie pathologique ou changement morphologique liée à l'administration des extraits après préparation et coloration à l'hématoxyline-éosine. Ces derniers présentaient un aspect normal similaire à celui des organes du lot témoin.

L'aspect général des organes des souris traitées par l'EBr et l'EAE, ainsi que leurs poids relatifs ont été semblables à ceux des souris témoins. Ces organes font l'objet d'étude anatomopathologique et histologique ; vu que certains produits pourraient altérer l'une ou l'autre des fonctions de ces organes.

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans les figures ci-dessous. L'observation des coupes histologiques du foie, des reins et des poumons des souris traitées par rapport aux témoins a permis de constater la conservation de l'architecture cellulaire (lobulaire et tubulaire) de ces organes, cependant quelques particularités ont été envisagées.

Les foies des souris femelles témoins sont normaux avec des hépatocytes séparées par des sinusoides étroites. Une congestion vasculaire avec des infiltrats tissulaire par des cellules inflammatoires est enregistrée sur quelques tissus hépatiques chez les souris traitées par l'extrait brut de *S.oleraceus* L. avec les doses (250 et 2000 mg/kg p.c respectivement) (figure 32).

Les reins des souris témoins montrent des glomérules et des tubules normaux, cependant, l'examen du rein a révélé la présence de néphrite hémorragique, quelques points de congestion hémorragique et dégénérescence hémorragique chez les souris traitées par l'EBr avec les doses (2000 et 500 mg/kg p.c respectivement). Une dégénérescence hémorragique, une infiltration tissulaire par les cellules inflammatoire, néphrite hémorragique, congestion intra-vasculaire, présence de sang c.à.d. infiltration sanguine du tube contourné distal ont été observés lorsqu'on a exploité l'effet de la dose 2000 mg/kg d'extrait brut par rapport aux témoins (figure 33).

Tandis que, l'examen histologique des poumons a révélé une dégénérescence hémorragique sur les coupes des souris traitées avec les doses (250 mg/kg et 2000 mg/kg p.c. respectivement) (Figure 35). Les autres lots d'organes (foie, reins et poumons) ont une

architecture normale et ne présente aucun signe de lésions par rapport aux coupes témoins (Fig. 32, 33, 34).

Cependant, les coupes histologiques du foie, reins et poumons des souris présentait des altérations histopathologiques sévères, telles que congestion vasculaire du foie et intra-vasculaire du rein, néphrite rénale, hémorragie et dégénérescence des reins et poumons, infiltration sanguine du tube contourné distal rénal et inflammation massive (infiltrats inflammatoires mononucléaires). L'examen histologique révèle aussi la présence des foyers de nécrose et des distensions des tubules rénaux dans les conditions de la toxicité subaigüe.

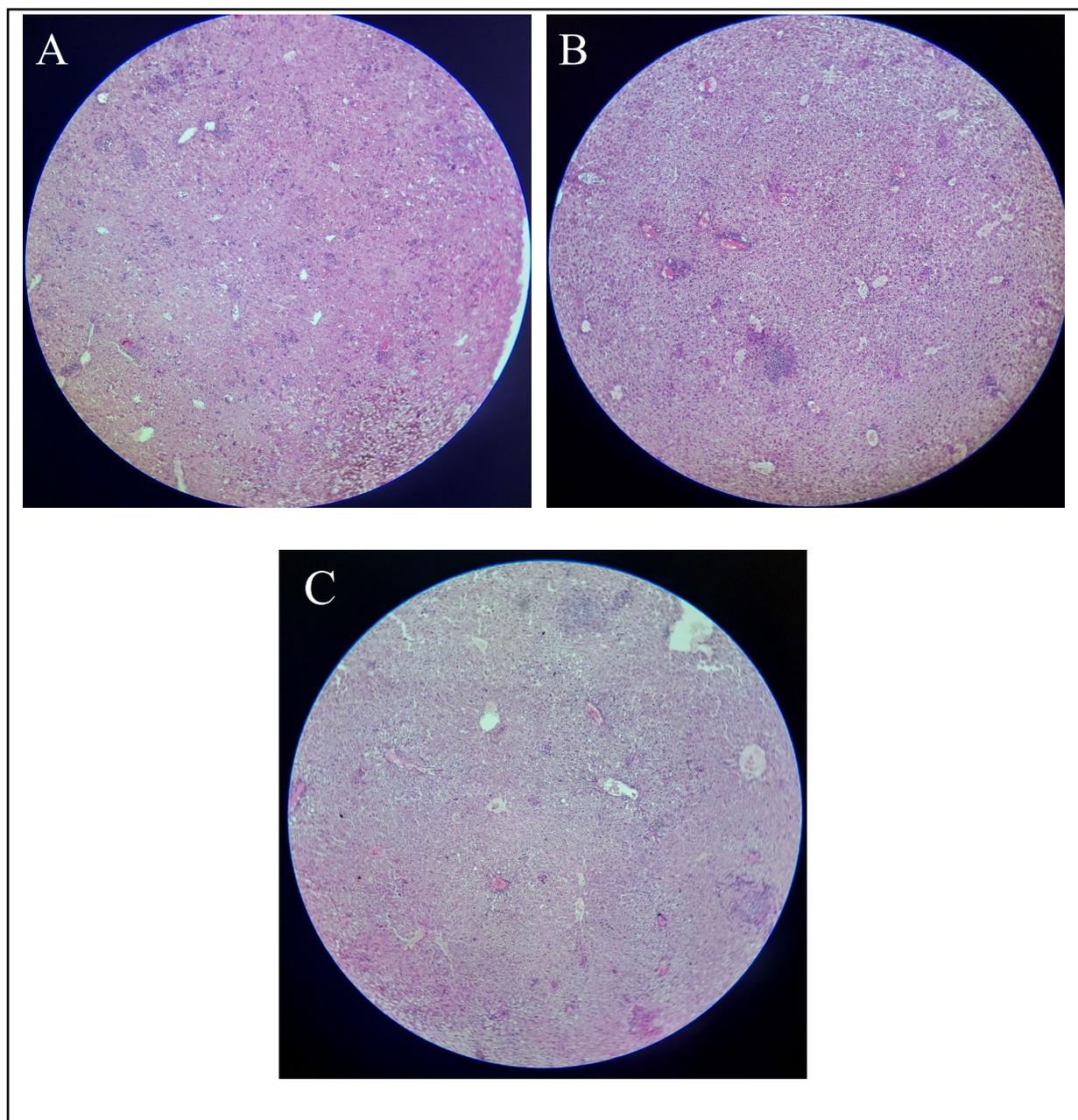


Figure 32 : Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins et traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement 40X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EBr 250 mg/kg et (C) groupe traité par l'extrait EBr 2000 mg/kg.

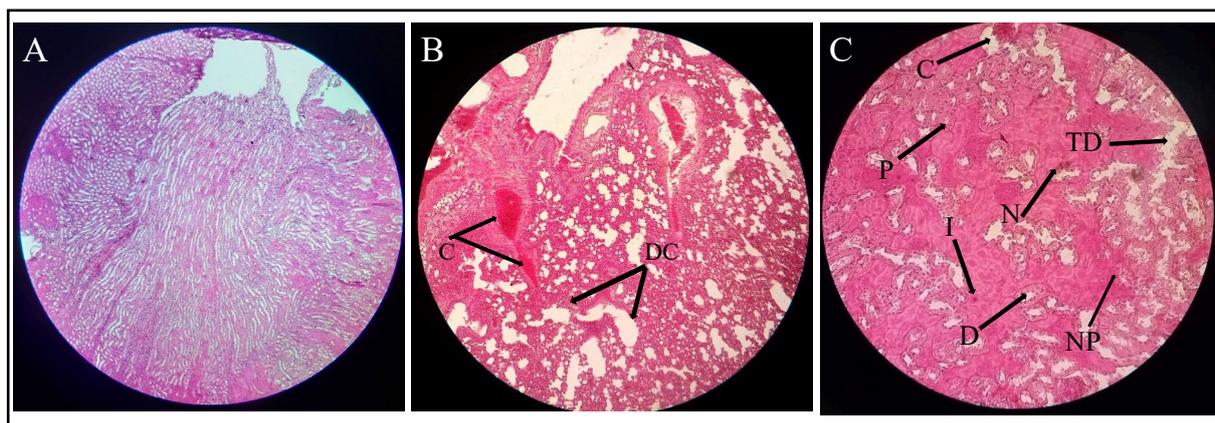


Figure 33 : Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus rénales des souris témoins traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine hématoxyline/Grandissement 40 X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EBr 500 mg/kg et (C) groupe traité par l'extrait EBr 2000 mg/kg. Flèche : (C) Congestion ; (DC) distension des canaux ; (N) Nécrose ; (TD) lésion tissulaire 'tissue damage' ; (D) Tube contourné distal ; (P) Tube contourné proximal ; (NP) Noyau d'un podocyte ; (I) infiltration.

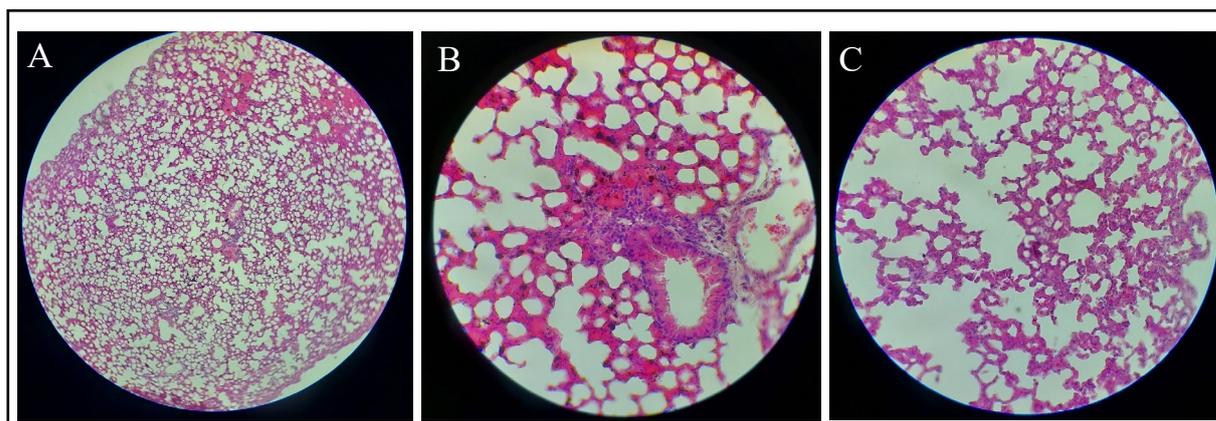


Figure 34 : Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus pulmonaires des souris témoins traitées par l'extrait brut de la plante dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine hématoxyline/Grandissement 40 X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EBr 250 mg/kg et (C) groupe traité par l'extrait EBr 2000 mg/kg.

Les résultats de l'examen histopathologique des organes de souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle EAe de *Sonchus oleraceus L.* (250-2000 mg/kg pc) sont indiqués dans les (figures 35, 36, 37).

Les foies des souris femelles témoins ont révélé une architecture hépatique normale, des hépatocytes polyédriques séparées par des espaces sinusoïdaux étroites et des veines centrales. Cependant, une congestion vasculaire et intravasculaire avec quelques points de

dégénérescence hépatique a été observée à la dose (500 et 2000 mg/kg p.c) respectivement (figure 35).

On remarque chez les reins de souris injectées par 250 mg/kg p.c d'EAE des néphrons hémorragique avec quelques points de dégénérescence. L'architecture du tissu néphrique de souris traitée par 500 mg/kg d'extrait a démontré des lésions hémorragiques, avec une néphrite hémorragique et les veines marquent des congestions vasculaires (Figure 36). Alors qu'à la dose 1000 mg/kg, les reins montrent une légère néphrite avec quelques points hémorragiques et une congestion intra-vasculaire. En outre, l'incision histologique du rein a révélé une congestion avec quelques points de dégénérescence tissulaire dans le groupe traité par la plus haute dose (2000 mg/kg p.c) par rapport au groupe témoin.

De même, l'examen histologique de poumon semble avoir une dégénérescence tissulaire et hémorragique aux doses (250 et 500 mg/kg p.c) respectivement par rapport au control. L'administration subaiguë d'extrait acétate d'éthyle EAE à 1000 mg/kg de poids corporel a entraîné une congestion intra-vasculaire accentuée avec quelques points de dégénérescence, tandis que l'histologie de la section des poumons de souris ayant reçu 2000 mg/kg de poids corporel d'extrait EAE a révélé une dégénérescence hémorragique (Figure 37).

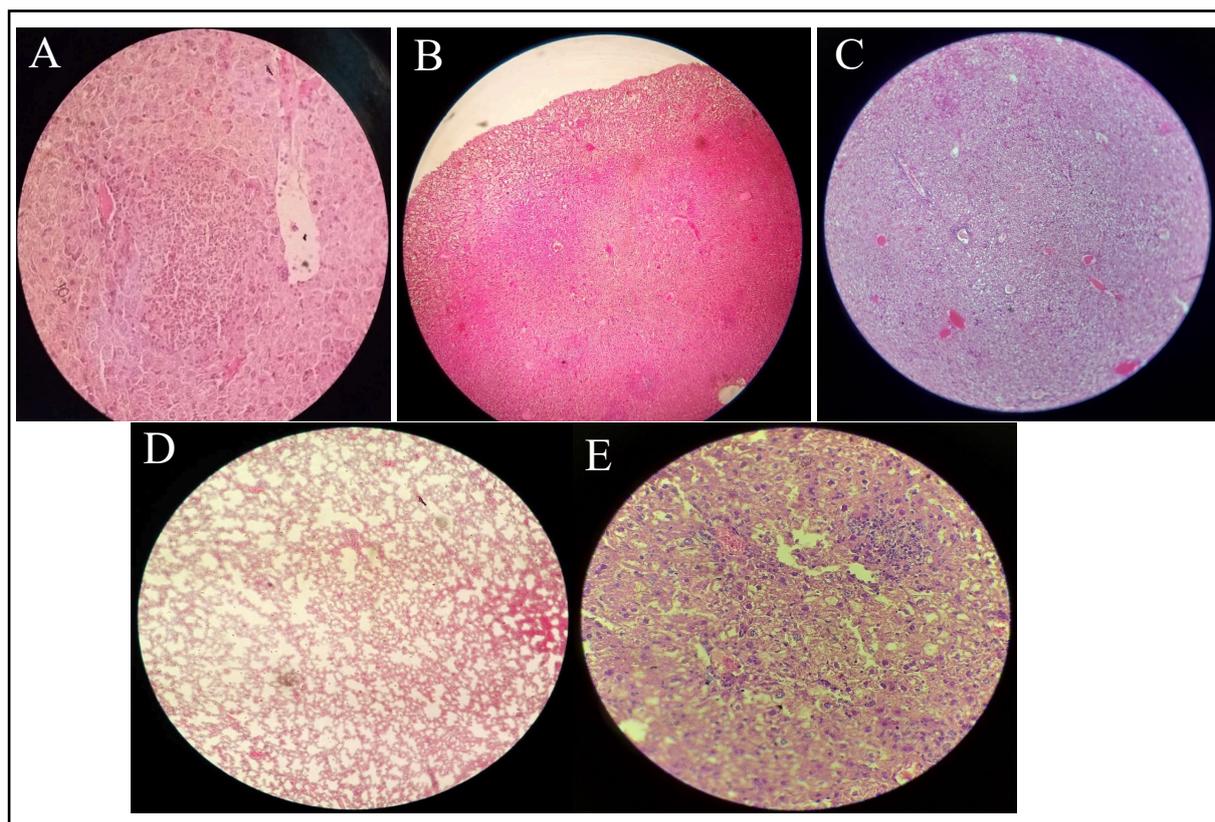


Figure 35 : Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de *Sonchus oleraceus L.* dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement 40X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EAe 250 mg/kg, (C) groupe traité par l'extrait EAe 500 mg/kg, (D) groupe traité par l'extrait EAe 1000 mg/kg et (E) groupe traité par l'extrait EAe 2000 mg/kg(C).

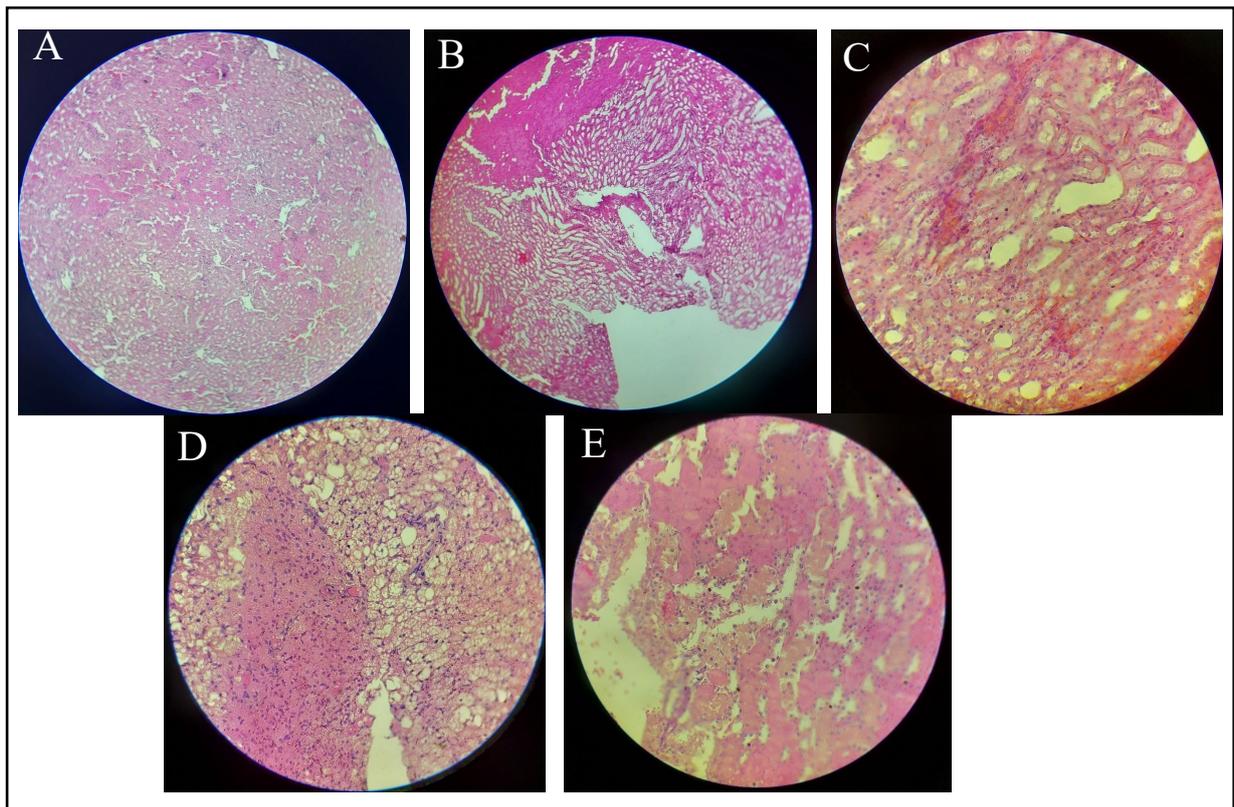


Figure 36 : Photomicrographies sélectionnées des coupes histologiques des tissus rénales des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de *Sonchus oleraceus L.* dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine hématoxyline/Grandissement 40X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EAe 250 mg/kg, (C) groupe traité par l'extrait EAe 500 mg/kg, (D) groupe traité par l'extrait EAe 1000 mg/kg et (E) groupe traité par l'extrait EAe 2000 mg/kg(C).

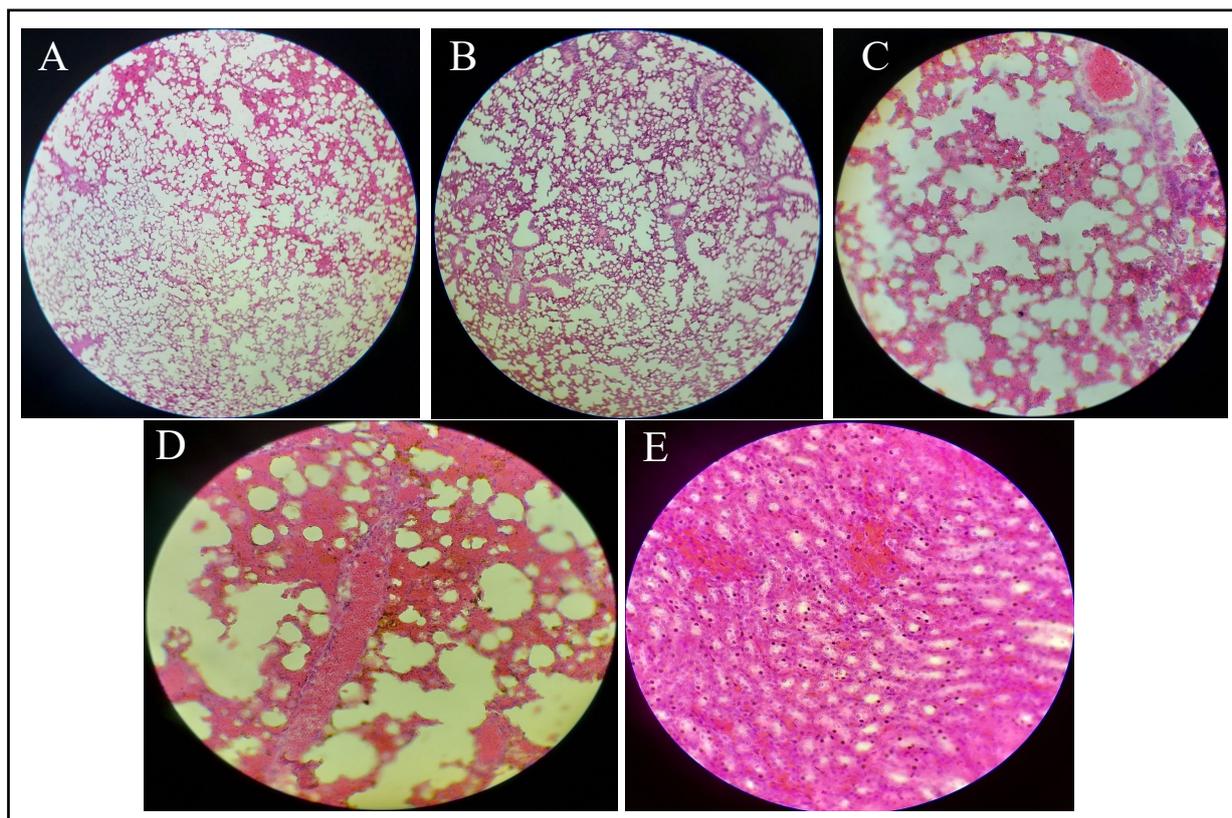


Figure 37 : Photomicrographies sélectionnées des tissus pulmonaires des souris témoins traitées par l'extrait acétate d'éthyle de *Sonchus oleraceus L.* dans les conditions de la toxicité subaiguë. Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement 40X.

(A) groupe témoin, (B) groupe traité par l'extrait EAe 250 mg/kg, (C) groupe traité par l'extrait EAe 500 mg/kg, (D) groupe traité par l'extrait EAe 1000 mg/kg et (E) groupe traité par l'extrait EAe 2000 mg/kg(C).

VII.2.5. Discussion

Malgré l'usage répandu des plantes médicinales pour les soins de santé dans les pays en développement, peu de données scientifiques concernant leur toxicité et leurs effets indésirables sont disponibles (Saad *et al.*, 2006). En fait, plusieurs études ont rapporté que certaines plantes médicinales peuvent causer plusieurs formes d'effets toxiques, qui peuvent avoir un impact négatif sur la santé humaine. Ainsi, pour garantir la sécurité des produits végétaux destinés à l'usage humain, des études systématiques sont nécessaires pour prévoir les risques de toxicité et fournir des informations scientifiques permettant de sélectionner des doses sûres chez l'homme (Neergheen-Bhujun *et al.*, 2013). À notre connaissance, aucune étude concernant l'évaluation de la sécurité de l'extrait brut et l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Sonchus oleraceus L.* n'ont été réalisées. Pour cette raison, la présente étude a été menée pour

évaluer son profil toxicologique en effectuant une toxicité orale aiguë chez la souris pendant 14 jours et une toxicité orale subaiguë chez la souris pendant 28 jours.

Dans l'étude de toxicité aiguë, l'administration d'une dose unique allant jusqu'à 5000 mg/kg p.c d'extrait EBr et d'EAE n'ont montré aucun signe de toxicité ni de mortalité pendant toute la période d'observation (14 jours). Par conséquent, la dose létale approximative (DL₅₀) des deux extraits de la partie aérienne de *S. oleraceus* L. est estimée être supérieure à 5000 mg/kg p.c. Selon le Système général harmonisé (SGH) de classification et d'étiquetage des produits chimiques, les substances dont la DL₅₀ orale est supérieure à 5000 mg/kg sont considérées comme relativement sûres et non toxique après une exposition aiguë (Unies, 2011).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les extraits hydroéthanolique ou dichlorométhanique de *Sonchus oleraceus* de Brésil (Vilela *et al.*, 2009) chez des souris. D'après ces auteurs, la valeur DL₅₀ de ces extraits a été estimée à plus de 5 g/kg p.c.

Les changements de comportement général et de poids corporel sont considérés comme des indicateurs critiques de l'état de bien-être pathologique et physiologique des animaux pour l'évaluation des premiers signes de toxicité causés par les drogues et les produits chimiques (Ezeja *et al.*, 2015).

Dans l'étude de toxicité subaiguë, quatre doses de (250, 500, 1000 et 2000 mg/kg p.c) des deux extraits ont été utilisées pendant 28 jours. Les effets ont été suivis sur le poids corporel, le poids des organes vitaux, les paramètres biochimiques, hématologiques et les caractéristiques histopathologiques du foie, des reins et des poumons. À la fin de l'étude de toxicité subaiguë, l'extrait brut EBr n'a pas montré une variation significative du poids corporel des souris femelles pendant la durée de traitement. Par contre, l'augmentation du poids corporel est significative à J14 dans le groupe traité à 1000 mg/kg p.c. Par ailleurs, les autres lots ont présenté une évolution corporelle normale et similaire à celle du lot témoin. Une augmentation significative du poids corporel à J7 a été enregistrée sur des souris traitées à l'extrait acétate d'éthyle de *S. oleraceus* L. à la dose de 2000 mg/kg p.c. Aucune variation significative du poids corporel n'a été constatée entre le groupe témoin et les autres groupes traités pendant toute la période d'étude. En ce qui concerne la toxicité subaiguë, aucune modification des signes cliniques, de la mortalité ni de la morbidité n'ont été enregistrée et aucun changement significatif n'a été observé dans le comportement général des groupes traités par SO chez les souris femelles. Les souris traitées ont pris du poids avec l'âge, et il n'y a pas eu de changement

significatif ($p>0,05$) de leur poids corporel moyen par rapport aux groupes témoins pendant toute la durée de l'étude. On peut conclure que l'administration orale d'extrait EBr et EAe de SO à une dose allant jusqu'à 2 g/kg pendant 28 jours n'a pas eu d'effet négatif sur la croissance normale des souris.

L'évaluation des fonctions hépatiques et rénales est un élément très important pour évaluer la toxicité des médicaments et des extraits de plantes. Le système hématopoïétique, qui est l'une des cibles les plus vulnérables des substances toxiques, réside dans la moelle osseuse où se produit la production de globules rouges (**Birbrair & Frenette, 2016**). C'est un indice important aussi de l'état physiologique et pathologique chez les hommes et les animaux (**Liju et al., 2013**). Des études toxicologiques ont montré que les altérations du système hématopoïétique ont une valeur prédictive plus élevée de la toxicité pour l'homme lorsque les données sont extrapolées à partir d'études sur les animaux (**Olson et al., 2000**). Dans cette étude, des altérations significatives de la numération des globules blancs (GB) et des plaquettes ont été observées chez les souris femelles traitées avec les différentes doses des deux extraits. Cependant, la diminution des globules blancs indique que l'administration de l'extrait EAe pendant 28 jours a entraîné un affaiblissement du système immunitaire. La diminution des neutrophiles, des basophiles et des monocytes ainsi observée peut être liée à des infiltrations leucocytaires dans le foie et le poumon révélées par l'analyse histopathologique de ces organes. L'analyse hématologique a révélé une perturbation 'augmentation et diminution' du niveau de globule rouge, de MCV, de MCH et de plaquettes des souris traitées par les deux extraits. Donc, cette différence affecte l'érythropoïèse, la morphologie ou la fragilité osmotique des globules rouges (**Guyton & Hall, 2000**). Dans cette étude, l'administration subaiguë d'EBr et EAe a entraîné de grands changements significatifs ($p<0,05$) dans le profil hématologique des souris qui ont reçu différentes doses d'extraits par rapport au groupe témoin, ce qui suggère que l'EBr et l'EAe de *S. oleraceus L.* sont probablement toxique pour le système sanguin.

Le foie est un organe vital qui joue un rôle central dans la biotransformation des médicaments, et son fonctionnement normal est évalué par divers enzymes de biomarqueurs sériques (**Olorunnisola et al., 2012**). L'augmentation des taux d'ALAT dans le sérum reflète l'hypertrophie et les lésions des tissus hépatiques (**Costa-Silva et al., 2008**). Le taux d'ASAT, en plus d'être un indicateur de dysfonctionnement hépatique, est également utilisé pour évaluer les maladies musculaires et cardiaques (**Adeyemi & Osubor, 2010**). La phosphatase alcaline 'PAL' est principalement présente dans les cellules qui tapissent le canal biliaire du foie et est utilisée dans le diagnostic des pathologies du canal biliaire (**Ramaiah et al., 2011**).

L'évaluation de la fonction hépatique est essentielle pour évaluer la toxicité des médicaments et des extraits de plantes. En effet, L'ASAT, l'ALAT, la PAL, les protéines sériques totales et la concentration de bilirubine totale dans le sérum sont les biomarqueurs cliniques les plus courants de l'état du foie (**Al-Mamary et al., 2002**).

Dans la présente étude, l'extrait EBr de la plante a produit une augmentation non significative dans les niveaux sériques d'ALAT, d'ASAT et de PAL par rapport aux témoins. Les lésions hépatiques causées par les médicaments hépatotoxiques peuvent entraîner une augmentation des taux d'ALT, d'AST et de protéines totales dans le sang (**Ogunlana et al., 2013**). Le taux de PAL est augmenté lors d'une cholestase ou d'une atteinte osseuse. La cholestase peut être intra-hépatique (stéatose, cirrhose) ou extra-hépatique (lithiase et obstruction biliaire) (**Saleem et al., 2016**). Cela pourrait suggérer qu'il y a un effet apparent d'hépatotoxicité chez la souris. L'augmentation significative des (ALAT) de souris traitées par l'EAE pourrait indiquer également un déclin de la fonction hépatique due à un effet hépatotoxique possible de l'extrait acétate d'éthyle.

La bilirubine est un produit de dégradation de l'hémoglobine, et l'augmentation de son taux sérique est associée à des maladies telles que la cirrhose biliaire primitive et la cholestase hépatique (**Thapa & Walia, 2007**). Alors que, le taux sérique de protéines totales est une mesure approximative de l'état protéique qui peut refléter des variations fonctionnelles majeures des fonctions rénales et hépatiques. Des taux anormaux peuvent être associés à des infections hépatiques ou à une inflammation chronique (**Tatefuji et al., 2014**). Dans la présente étude, les protéines totales ont été élevées très légèrement, de manière non significative des groupes traités par l'EBr ; par contre la concentration des protéines totales des souris traitées par l'EAE a été augmentée significativement. Alors qu'il y a eu une diminution non significative des niveaux de bilirubine dans les groupes traités par les deux extraits par rapport aux groupes de contrôle. Cette variation peut être attribuée à des dommages structuraux hépatiques et d'inhibition de la sécrétion biliaire (**Metushi et al., 2011**). Ces résultats confirment les constatations précédentes concernant les paramètres hématologiques et les enzymes marqueurs hépatiques, qui indiquent que les extraits peuvent avoir un effet néfaste sur le système érythropoïétique et le foie.

L'altération de la fonction hépatocellulaire peut entraîner une réduction des concentrations de protéines totales et de bilirubine dans l'insert. Le changement insignifiant des concentrations sériques de protéines totales et de bilirubine dans les groupes traités et les

groupes témoins suggère en outre que les fonctions synthétiques du foie sont altérées par l'extrait brut et acétate d'éthyle.

On sait que le foie est l'organe principal du métabolisme du glycogène. La diminution de glycogène dans le foie est un résultat commun d'insuffisance hépatique après des lésions du foie causées par des composés toxiques. Cette insuffisance hépatique peut provoquer une augmentation de l'insuline dans le sang, et une réduction consécutive de la teneur en sucre dans le sang, ce qui est cohérent avec le taux de glucose et du glycogène dans le foie (**Wu et al., 2005**). Dans notre étude, l'élévation du niveau de glucose nous laisse supposer que l'extrait EBr et EAe pourraient affecter directement la synthèse, le stockage et la décomposition du glycogène dans le foie.

Il est bien connu que le foie est l'organe clé dans la synthèse et l'excrétion du cholestérol. A cet effet tout type d'obstruction dans le foie, soit intra ou extra-hépatique, va provoquer une augmentation du taux du cholestérol total dans le plasma. Les hyperlipidémies multiples sont souvent secondaires à de nombreux facteurs tels que le régime alimentaire, la consommation d'alcool, les thérapies ou des maladies comme la néphrose, le diabète, l'hypothyroïdie ou les tumeurs (**Havel 1969**). L'administration orale d'extrait EBr a produit une augmentation significative ($p < 0,05$) des LDL, et une réduction du cholestérol, des triglycérides (TG) et des HDL par rapport aux groupes de contrôle. Alors que l'administration orale d'extrait EAe a produit une réduction des LDL et une augmentation significative du cholestérol et non significative des TG et des HDL. Le métabolisme anormal des lipides peut conduire à l'élévation du niveau de substances grasses, en grande partie le cholestérol et les triglycérides dans la circulation sanguine, entraînant une hyperlipidémie (**Ginsberg et al., 2006**). La présente étude a montré une hyperlipidémie marquée et une augmentation marquée du cholestérol chez les souris traitées par l'extrait EAe, par contre l'extrait brut a provoqué une hypolipidémie en diminuant le taux de cholestérol, des TG et des HDL. Ces résultats suggèrent que l'extrait brut de *Sonchus oleraceus* L. pourrait être efficace pour améliorer le profil lipidique, qui peut protéger contre l'athérosclérose, les maladies coronariennes et les complications du diabète. D'après ces résultats, on peut conclure que le traitement par l'extrait brut et acétate d'éthyle provoquent des perturbations des paramètres lipidiques au niveau du plasma objectivé par une hypo et hyper-cholestérolémie respectivement. Ces modifications lipidiques sont dues à l'installation d'une athérosclérose caractérisée par l'accumulation anormale des lipides et de cholestérol LDL sur la paroi des artères, ce qui entraîne par conséquent l'obstruction des vaisseaux et donc l'augmentation du risque cardiovasculaire (**Bobryshev 2006**).

Les reins sont un organe vital très vulnérable aux composés toxiques en raison du volume élevé de sang qui y circule. Il filtre de grands types de toxines, qui peuvent s'accumuler dans les tubules rénaux (Akindele *et al.*, 2014). L'urée, l'acide urique et la créatinine sont considérés comme des biomarqueurs sensibles des lésions rénales. Un biomarqueur rénal élevé est généralement une indication d'une insuffisance rénale. Cela concerne également les enzymes de la fonction hépatique, puisque le foie et les reins sont les principaux sites d'élimination des substances dans l'organisme (Gowda *et al.*, 2010).

La filtration glomérulaire dans cette étude a été évaluée grâce à la mesure de la clairance de la créatinine et de l'urée. En ce qui concerne cette fonction, la créatinine sérique des souris traitées par l'extrait brut EBr montre une légère diminution insignifiante, par contre l'élévation de la créatinine a été significative ($p < 0,05$) par rapport à celle des animaux témoins pour les souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle EAe. L'analyse d'urée effectuée à l'étude subaiguë a montré que les souris traitées aux deux extraits avec les doses de 250-2000 mg/kg p.c ont eu une augmentation des protéines urinaires, qui était dans les limites normales. Cependant, les concentrations de l'acide urique ont enregistré une augmentation non significative ($p > 0,05$) quel que soit la dose ou l'extrait injecté par rapport aux groupes de contrôle. Un taux plasmatique élevé en créatinine (associé à un taux élevé en urée) traduit une diminution de la filtration glomérulaire pour les souris traitées par l'EAe. L'urée provient de la destruction des protéines. Il est entièrement filtré par les glomérules. Son taux sanguin reflète le fonctionnement global des reins. L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines (adénosine et guanidine) endogènes et exogènes. Le taux d'acide urique dans le plasma peut augmenter lors de désordres métaboliques, de troubles nutritionnels, ou d'atteintes rénales (Ben Saad *et al.*, 2017). Cependant, l'augmentation de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique, même non importantes pour l'EBr, mais pourraient indiquer à une altération ou dysfonctionnement des reins, à une insuffisance rénale ou même à une néphrotoxicité liée à un excès d'acide urique dans le sang (Weber *et al.*, 2002).

Il a été rapporté par Khan *et al.*, (2012c) que l'extrait méthanolique de la plante entière de *S. asper* de Pakistan a montré une forte activité anti-hépatotoxique vis-à-vis du CCl₄ (tétrachlorure de carbone) en réduisant l'activité des trois enzymes (PAL, ALAT et ASAT), de cholestérol et de triglycéride tout en élevant les niveaux de lipoprotéines de haute densité (HDL). Ils ont conclu que *S. asper* peut protéger le foie contre les dommages oxydatifs induits par la CCl₄ chez le rat. Selon les études faites sur d'autres espèces du genre *Sonchus*, il ressort que les extraits obtenus de ce genre ne sont pas toxiques. Alkreathy *et al.*, (2014) ont rapporté

que l'extrait méthanolique de *S. arvensis* est hépatoprotecteur en réduisant le taux de cholestérol, d'HDL et en augmentant les triglycérides et LDL. L'administration de CCl₄ a nettement augmenté ($p < 0,01$) l'activité des enzymes marqueurs du sérum hépatique telles que l'ASAT, l'ALAT et la PAL par rapport au groupe de contrôle. Les élévations de la sécrétion de ces enzymes ont été diminuées de façon significative de 100 mg/kg p.c. et 200 mg/kg p.c. d'extrait par rapport au groupe CCl₄. En fait, les résultats de notre étude ne s'accordent pas avec les études déjà réalisées sur d'autres espèces du genre *Sonchus* (**Khan et al., 2012b ; Alkreathy et al., 2014**).

Nurianti *et al.*, (2014) ont déterminé la DL₅₀ de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *S. arvensis* L. sur des rats après l'administration d'une dose unique et de doses répétées, sur la base d'études de toxicité orale aiguë (14j) et subchronique (90j) qui est supérieure à 15 g/Kg de poids corporel et était classée comme pratiquement non toxique. Aucune anomalie dans les paramètres comportementaux, hématologiques, biochimiques cliniques et histologiques des organes n'ont été enregistrés.

Les études phytochimiques précédentes ont montré que l'extrait brut de SO contient une variété de composés phénoliques et de flavonoïdes (**Abhijeet et al., 2018**). Ces constituants bioactifs présents dans l'extrait brut peuvent expliquer les effets pharmacologiques observés. L'étude précédente de (**Teugwa et al., 2013**) a rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes de l'extrait hydroéthanolique de la plante entière de *S. oleraceus* exercent leur effet hypoglycémique par différents mécanismes, notamment l'inhibition des activités de l' α -amylase et de l' α -glucosidase, l'augmentation de l'absorption périphérique du glucose et la stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Ce résultat est en accord avec les conclusions antérieures de (**Schaffer et al., 2011**), qui a mené une enquête sur la toxicité subaiguë de l'infusé à 100 mg/kg p.c et de l'esculetin à 6 mg/kg p.c de *S. oleraceus* chez les rats Wistar. Ils ont observé une activité hypolipidémique par la réduction du taux de lipide, de cholestérol, de TG, de LDL, l'augmentation d'HDL et par la stimulation de la production d'insuline ou par la modulation des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Plusieurs plantes contenant des flavonoïdes à action hypoglycémiant ont également présenté une activité hypolipidémique (**Vinayagam & Xu, 2015**) ; ce qui est en accord avec nos résultats.

Dans la présente étude, le choix des doses de 250-2000 mg/kg de poids corporel par jour ont été fondées sur le protocole d'OECD 407 guidelines (**OECD, 2008**). La variation du poids

relatif des organes est un indicateur fiable qui peut être utilisé dans les enquêtes toxicologiques pour évaluer la toxicité causée par les médicaments et les produits chimiques (Balogun *et al.*, 2014). Les souris n'ont pas présenté des signes de toxicité pendant toute la période expérimentale. Aucune lésion macroscopique n'a été observée dans les organes. Le poids relatif des organes (foie, reins, poumons, rate et cœur) n'indiquent aucun effet toxique tant dans le groupe témoin que dans le groupe traité. En outre, les changements (augmentation ou diminution non-significative) peuvent être considérés comme pertinents d'un point de vue toxicologique, car aucun effet n'a été observé à la dose la plus élevée mais des altérations histopathologiques ont été constatées dans le foie, les reins et les poumons.

Dans plusieurs organes, les lésions cellulaires sont suivies par la libération d'un certain nombre d'enzymes cytoplasmiques dans le sang ; phénomène qui constitue la base pour le diagnostic clinique. En effet, les effets bénéfiques des molécules bioactives de *Sonchus oleraceus L.* dans la protection des lésions hépatiques ont déjà été signalés et concordent avec les résultats obtenus à partir des indicateurs biochimiques. En outre, les médicaments à base de plantes sont considérés comme présentant un risque de toxicité plus faible. Toutefois, ils ne sont pas totalement exempts de la possibilité d'induire une toxicité ou d'autres effets indésirables (Thiesen *et al.*, 2018, Tir *et al.*, 2019).

Les résultats de l'enquête histopathologique ont montré des corrélations significatives avec les résultats de l'étude biochimique et hématologique. Les observations graduées des coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine sont présentées dans les figures ci-dessus. Les altérations histopathologiques observées sont : une congestion vasculaire et intravasculaire du foie, une infiltration tissulaire du foie par des cellules inflammatoires, une dégénérescence hépatique sous capsulaire ; une néphrite hémorragique, quelques points de congestion et d'hémorragie des reins, une dégénérescence rénale et dégénérescence hémorragique des poumons (figures 32-37).

Les modifications de l'architecture du foie, reins et poumons à différentes doses de 250 à 2000 mg/kg de poids corporel/jour des deux extraits de *S.oleraceus L.* ont été observés, indiquant la toxicité et les effets indésirables sur les organes. L'effet toxique de l'extrait brut et acétate d'éthyle de *S.oleraceus L.* sur le foie, les reins et les poumons peut être dû à une ou plusieurs des substances phytochimiques présentes dans les extraits.

Comme observé dans cette étude, des élévations non significatives des taux sériques d'ASAT, d'ALAT et de PAL peuvent être dues à la nécrose hépatique des souris traitées à

l'extrait EAe. L'apparition d'infiltrations lymphocytaires dans les organes (foie et reins) a été attribuée à la présence de glycosides, comme le rapporte Adedapo *et al.*, (2003). Il a été rapporté que la toxicité de certains médicaments à base de plantes pourrait être le résultat de constituants phytochimiques. Les anomalies histopathologiques des tissus du foie, des reins et des poumons pourraient être dues également à la présence de composés bioactifs (alcaloïdes, tanins, saponines, flavonoïdes et glycosides) (Eleyinmi *et al.*, 2006) qui ne sont pas dissous dans le méthanol pendant l'extraction de la plante. Les différents rôles que ces agents peuvent jouer dans le système biologique suggèrent qu'ils devraient être pris en compte dans les études futures. Muhammad *et al.*, (2015) ont également signalé qu'une forte consommation de tanins peut causer des dommages aux reins et au foie. Des doses élevées de *N. campestris* ont provoqué une élévation de certains paramètres biochimiques et des modifications histologiques dans les organes cibles de la toxicité (foie et rein).

Les troubles des vaisseaux sanguins (vasculaires) du foie sont généralement dus à un mauvais flux sanguin sortant du foie. Le sang stagne dans le foie et crée une congestion qui peut entraîner une augmentation du volume du foie. Un flux sanguin inadéquat, vers ou depuis le foie, peut être dû à une insuffisance cardiaque ou à des troubles favorisant la formation de caillots (troubles de la coagulation). L'apoptose observée peut être un mécanisme pathophysiologique important pour le maintien du tissu hépatique, permettant aux hépatocytes de mourir sans provoquer une réponse inflammatoire potentiellement nocive par le biais d'un processus étroitement contrôlé et régulé (Pagliara *et al.*, 2003).

Les changements histopathologiques observés dans les sections de rein ont montré une congestion intra-vasculaire, néphrite rénale, dégénérescence des reins, ainsi qu'une infiltration cellulaire inflammatoire, qui sont des signes de toxicité rénale, observés chez les souris traitées avec les deux extraits. Une augmentation des taux d'urée, de créatinine et d'acide urique n'est observée que si les néphrons fonctionnels sont fortement endommagés (Lameire *et al.*, 2005). Cela montre que l'extrait brut et acétate d'éthyle ont d'effets marqués sur le rein des souris aux doses (250-2000 mg/kg) et confirment les résultats des paramètres biochimiques plasmatiques. Nous pensons que les substances chimiques de l'extrait piégées dans les alvéoles provoquent ensuite la réponse inflammatoire, qui entraînera la désintégration du septum alvéolaire, connue sous le nom de rupture septale. La rupture septale entraîne des déformations importantes de l'architecture pulmonaire (Nazari 2002). Les congestions vasculaires sur la section du foie pourraient être dues à l'inflammation, au blocage ou à l'action de vasoconstriction des extraits de *S. oleraceus* L. sur les parois des vaisseaux sanguins. Ces

extraits pourraient contenir certaines substances capables d'agir comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens qui provoquent une réaction d'hypersensibilité à l'origine des inflammations pulmonaires et hépatiques observées (Fry & Baker, 2007).

Bien que les deux extraits soient largement utilisés pour traiter de nombreuses maladies en reconstituant l'essence vitale, aucune évaluation complète de la sécurité n'a été réalisée concernant le profil toxicologique d'un extrait brut EBr et acétate d'éthyle EAe administré par voie orale chez les animaux. Ainsi, les résultats de cette étude fournissent une base expérimentale pour la pratique clinique de la formule d'extrait brut et acétate d'éthyle.

En conclusion, les doses orales d'extrait brut et acétate d'éthyle des parties aériennes de *S. oleraceus L.* sont bien tolérées dans les thérapies à court terme, mais il faut être prudent lors de l'utilisation des extraits pour une thérapie à long terme, car une administration prolongée jusqu'à 28 jours peut entraîner certaines altérations histopathologiques sur les tissus hépatiques, rénaux et pulmonaires à différentes doses.

VIII. Activité antiproliférative

Les différents extraits de l'espèce étudiée ont été soumis à une évaluation de leur activité cytotoxique. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses a été évaluée selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes (page 79) contre une lignée cellulaire de type macrophage de murin (J774.A1). Le test a été réalisé en triplicat et les résultats obtenus sont reportés dans l'annexe 8 et le tableau 23 ci-dessous sous forme de graphique où nous avons en abscisse les concentrations de l'extrait à tester et en ordonnée le pourcentage de prolifération des cellules traitées par rapport à celle des cellules de contrôle (100%).

Tableau 23 : CI_{50} de l'activité antiproliférative *in vitro* de divers extraits de *S.oleraceus L.* contre les macrophages J774.A1.

Extraits	EBr	ECh	EAe	EBu	EPa	EE
CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) J774.A1	34,67±0,00	34,67±0,00	34,67±0,00	34,67±0,00	51,62±0,81	34,67±0,00

EBr : extrait brut ; ECh : extrait chloroformique ; EAe : extrait acétate d'éthyle ; EBu : extrait butanolique ; EPa : extrait phase aqueuse ; EE : extrait éthanolique. Les valeurs d' CI_{50} pour la lignée cellulaire cancéreuse sont exprimées en $\mu\text{g/mL}$ pour les différents extraits. C'est la concentration de l'extrait qui permet une réduction de 50 % de la croissance cellulaire après 72 heures d'incubation. Les valeurs sont exprimées en moyenne±SEM, n=3.

On constate, à partir de ces tableaux, que l'extrait de la phase aqueuse EPa a montré une activité cytotoxique faible contre J774.A1 avec un pourcentage d'inhibition de (CI₅₀ : 51,62 µM). Nos données n'ont pas révélé d'effet cytotoxique significatif pour les extraits restants à des concentrations différentes (Tableau 23), en exerçant une action beaucoup plus importante de manière sélective contre la même lignée cellulaire.

VIII.1. DISCUSSION

L'incidence du cancer augmente considérablement dans le monde entier. L'exploitation de nouveaux médicaments anticancéreux naturels et de stratégies thérapeutiques efficaces sans effets secondaires évidents est devenue une nécessité urgente. En résumé, nos résultats ont confirmé que l'espèce végétale présentait une inhibition notable de la croissance des cellules cancéreuses pour cinq extraits. Il est important de noter qu'aucune donnée publiée sur l'étude anti-proliférative des extraits de différents solvants de *S. oleraceus* L. n'a été trouvée dans la littérature. Il s'agit donc du premier rapport sur les effets antitumoraux de cette espèce.

Cependant, les effets antiprolifératifs des espèces de *S. arvensis* et *S. asper*, qui sont taxonomiquement liées aux genres *Sonchus*, ont été récemment démontrés (Lu *et al.*, 2006). Le lupéol par exemple provenant des extraits à l'éthanol de *S. arvensis* et *S. asper* a nettement induit la différenciation des sous-clones dérivés du mélanome de souris B16, avec une forte capacité de différenciation (B16 2F2), indiquant que le lupéol pourrait avoir une activité cytostatique contre les cellules B16 2F2. Ce résultat concorde avec la présente étude, qui confirme la présence de lupéol dans l'extrait chloroformique par l'HPLC-QTOF-MS. Le lupéol est un triterpène pentacyclique présent dans diverses espèces du règne végétal, dont certains légumes, fruits et plantes médicinales (olive, mangue, fraise, raisin, figue...etc). Cette molécule présente un spectre d'activités pharmacologiques contre diverses maladies aiguës ou chroniques, notamment l'arthrite, les troubles rénaux, le diabète, l'hépatotoxicité, les maladies cardiovasculaires, le cancer et les infections microbiennes (Yokoe *et al.*, 2015). Il agit comme un puissant inhibiteur des protéines kinases et des sérines protéases ; et inhibe l'activité de l'ADN topoisomérase II, qui est une cible pour la chimiothérapie anticancéreuse (Aratanechemuge *et al.*, 2004).

Il a été signalé aussi que la plante *Sonchus oleraceus* L. contient de nombreux composants bioactifs tels que la lutéoline, l'apigénine, l'acide caftarique, l'acide chlorogénique, l'acide chicorique et autres (Ou *et al.*, 2013). De nombreuses études ont révélé l'activité anti-tumorale de la lutéoline ou de l'apigénine sur les cellules cancéreuses de la vessie (Shi *et al.*,

2015), de l'estomac (Lu *et al.*, 2015), colorectales (Banerjee & Mandal, 2015), des ovaires (Du *et al.*, 2015) et les cellules d'ostéosarcome (Wang *et al.*, 2015), ainsi que les effets anti-athérogènes de l'apigénine. L'un des flavonoïdes les plus abondants et les plus étudiés est le 4',5,7-trihydroxyflavone, communément appelé l'apigénine. L'intérêt de l'apigénine s'est accru ces dernières années en raison de sa faible toxicité intrinsèque et de ses effets remarquables sur les cellules cancéreuses. Il est de plus en plus reconnu que l'apigénine peut être un agent chimiopréventif du cancer (Zhou *et al.*, 2016). L'extrait acétate d'éthyle et butanolique de cette étude contiennent l'apigénine, ce qui explique leurs activités anticancéreuses.

Une étude de Shi *et al.*, (2015) a indiqué que l'apigénine, un des principaux composants bioactifs du SO, peut inhiber la prolifération des cellules T-24 du cancer de la vessie humaine en bloquant la progression du cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. Ils ont également découvert que l'apigénine déclenchait la voie apoptotique mitochondriale en libérant le cytochrome c et en activant la caspase-3, la caspase-7 et la caspase-9.

Les extraits méthanoliques à 70% de *S.oleraceus* L. de la nouvelle Zélande n'ont pas été cytotoxiques en dessous d'une concentration de 100 mg D.W/mL sur les lignées de cellules hépatiques humaines (HepG2) (McDowell *et al.*, 2011). Dans l'étude de Huyan *et al.*, (2016), ils ont montré que l'extrait aqueux de SO de la Chine a des effets inhibiteurs importants sur les cellules tumorales hépatiques humaines HepG-2 et leucémiques humaines K562 avec des CI₅₀ de 0,34 mg/mL et 0,50 mg/mL respectivement. Ces données sont 10 fois plus faibles que notre résultat.

L'activité cytotoxique de l'extrait d'EtOH de *S.oleraceus* du Corée du Sud a eu la meilleure activité contre la prolifération des cellules cancéreuses de l'estomac (NCI-N87). L'inhibition maximale de la croissance cellulaire a été de 65,0 % dans l'extrait d'EtOH, contre 96,5 % pour le paclitaxel (contrôle positif) à la même concentration de 100 µg/mL (Yin *et al.*, 2007). Ces résultats ne sont pas en accord avec nos conclusions.

Les effets cytotoxiques des extraits (brut, chloroformique, acétate d'éthyle, butanolique et éthanolique) dépendaient des substituants présents, ceux ayant des résidus cinnamiques et/ou monoterpénoïdes étant plus puissants par rapport à ceux sans groupes estérifiés. Une explication possible est que ces groupements déterminent les propriétés hydrophiles globales des composés, et que les composés les plus hydrophiles sont moins capables de passer à travers la

membrane cellulaire des cellules de mammifères, ce qui se traduit par une cytotoxicité plus faible (Cioffi *et al.*, 2006).

Le mécanisme d'action des terpénoïdes est basé sur la prévention de la prolifération des cellules tumorales par la nécrose ou par l'induction de l'apoptose. Leurs effets anticancéreux sont associés à une diminution de l'inflammation et du stress oxydatif. Les terpénoïdes jouent un rôle important dans la dépolarisation de la membrane des cellules cancéreuses et en particulier de la membrane des mitochondries, l'activation de l'apoptose par les caspases et l'inhibition de l'angiogenèse. Les terpénoïdes sont également connus pour leur capacité anticancéreuse significative en combinaison avec des agents de chimiothérapie (Lesgards *et al.*, 2014).

Des études expérimentales ont également suggéré que les effets néfastes des acides gras polyinsaturés oméga-6 (PUFA : omega-6 polyunsaturated fatty acids), et les effets bénéfiques des oméga-3 PUFAs sur la cancérogenèse mammaire, peut-être en raison de l'interaction avec les antioxydants. Des interactions significatives ont également été constatées entre les oméga-6 et les longues chaînes oméga-3 PUFAs, le risque de cancer du sein étant inversement lié aux PUFAs oméga-3 à longue chaîne. Dans cette optique, il est intéressant de noter que l'extrait d'éther de pétrole de *S.oleraceus* L., *S.asper* et *S.tenerrimus* d'Espagne contenait de l'acide α -linoléique (C18 : 3 ω 3), de l'acide linoléique (C18 : 2 ω 6) et l'acide palmitique (C16 : 0) qui étaient également présents en proportions élevées (Guil-Guerrero *et al.*, 1998). Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec notre extrait chloroformique qui contient ces composés déjà identifié par LC-MS/QTOF. En ce sens, les extraits de *S.oleraceus* L. pourraient être capables d'exercer leur activité antiproliférative par la présence de grandes quantités d'acides gras, de terpénoïdes et de polyphénols, à la lumière de la littérature disponible qui rapporte que les polyphénols antioxydants alimentaires sont capables de moduler la prolifération incontrôlée (Menendez *et al.*, 2007). La différence de polarité de solvant utilisé pour le processus d'extraction peut également être la raison des différentes activités.

En ce qui concerne l'activité antiproliférative, des résultats prometteurs d'inhibition de la croissance cellulaire ont été obtenus grâce aux extraits polaires de la partie aérienne de *Sonchus oleraceus* L., ce qui indique que cette plante mérite des études phytochimiques et pharmacologiques détaillées afin d'identifier les composés responsables de l'effet antiprolifératif.

Conclusion

générale et

perspectives

Dans le cadre de recherche de substances naturelles biologiquement actives, l'espèce Algérienne traditionnellement utilisée dans le traitement des maladies hépatiques et dermatologiques de la famille des Astéraceae : *Sonchus oleraceus L.* a fait l'objet d'une étude phytochimique, biologique et toxicologique des extraits à différents solvants.

Trois aspects principaux sont visés par ce travail. Le premier est l'aspect phytochimique qui consiste à diagnostiquer qualitativement les extraits les plus actives : brut, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique, par la LC-MS/QTOF. 44 composés ont été identifiés dans ces extraits dont principalement étaient des composés phénoliques, des flavonoïdes et des lactones sesquiterpènes ; qui étaient responsables de leurs activités biologiques. Partant de ces résultats, il est nécessaire d'approfondir l'étude phytochimique en utilisant des techniques plus performantes (RMN, LC-MS/MS...) pour une identification fiable de certaine des molécules isolées.

Le deuxième aspect est de nature biologique, qui a été mis en évidence par six tests biologiques différents *in vitro* : un test antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire, anticholinestérasique, photoprotecteur (FPS) et antiprolifératif.

Les potentialités antioxydantes *in vitro* des différents extraits sont évaluées par divers mécanismes : tests de piégeage des radicaux libres DPPH•, galvinoxyle, ABTS^{•+}, blanchiment de β -carotène, chélation des métaux ferreux, phénanthroline et réduction cuprique (CUPRAC). Les résultats ont révélé des activités antioxydantes intéressantes par l'extrait acétate d'éthyle 'EAe' et butanolique 'EBu' qui présentaient la plus forte activité dans les essais de piégeage des radicaux DPPH•, du galvinoxyle, d'ABTS^{•+}, de chélatin CUPRAC et de la phénanthroline. L'extrait de la phase aqueuse (EPa) a la plus forte activité d'anti-péroxydation lipidique en comparaison aux autres extraits testés dans le test de blanchiment de β -carotène/acide linoléique. Ceci pourrait être justifié par la présence d'un contenu relativement important en composés phénoliques, en flavonoïdes et en flavonols comme il a été révélé auparavant par les analyses quantitatives phytochimiques.

L'effet antibactérien des extraits est mis en évidence par la méthode des disques, en présence de trois espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus* ATCC 35556, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae*. Les extraits EAe et EBU ont montré une meilleure activité antibactérienne contre les trois souches, alors que la souche *Klebsiella pneumoniae* était plus résistante à l'extrait chloroformique, dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (6-23 mm) pour *E. coli*, de (10-24 mm) pour *S. aureus* et de (6-

18,8) mm pour *K.pneumoniae*. On remarque que l'activité antibactérienne des extraits polaires est plus importante que celle des extraits apolaires. Ceci peut être dû à la nature et la richesse de chacun de ces extraits en composants antibactériens (acide gallique, catéchol, acide sinapinique, corchoionoside C, sonchuside H, ester méthylique d'apigénine-7-O-β-D-glucuronide, acide glucuronide 7-O-β-D- lutéoline).

Une activité particulière en tant qu'inhibiteurs dans la dénaturation de l'albumine sérique bovine *in-vitro* a été observée aussi bien pour l'extrait butanolique avec un pourcentage d'inhibition de 91.69% et de 90.32% pour l'extrait acétate d'éthyle ; qui sont proche de celui du standard diclofénac (98.50% à 1000 µg/mL).

L'effet anti-cholinestérasique de ces différents extraits est mis en évidence par la méthode d'Ellman en utilisant l'enzyme acétylcholinestérase AChE en vue de déterminer le taux d'inhibition de cette enzyme. L'extrait le plus puissant est l'extrait brut 'EBr' avec une CI_{50} de 27.07 µg/mL. Cette étude a donné un premier aperçu de l'efficacité de l'extraction pour un traitement prometteur de la maladie d'Alzheimer.

L'activité photoprotectrice d'extraits de plante a été utilisée pour évaluer les effets dermato-protecteurs et a été mesurée *in vitro* en déterminant le facteur de protection solaire (FPS). Les résultats indiquent que l'EBu, EAe et EBr ont révélé une activité photoprotectrice plus élevée. L'analyse phytochimique de la plante a montré la présence de flavonoïdes (apigénine), des triterpènes (lupéol) et des sesquiterpènes lactones dans les parties aériennes des extraits qui facilitent plus l'absorption de la lumière UV.

L'extrait de la phase aqueuse EPa a montré une activité cytotoxique faible contre la ligne cellulaire cancéreuse de macrophage de murin J774.A1 avec une concentration inhibitrice de (CI_{50} : 51.62 µM). Nos résultats n'ont pas révélé d'effet cytotoxique significatif pour les extraits restants à des concentrations différentes, en exerçant une action beaucoup plus importante de manière sélective contre la même lignée cellulaire permettant ainsi de justifier et de confirmer les indications thérapeutiques des formulations traditionnelles.

Parmi les plantes médicinales traditionnelles il y en a celles qui peuvent être toxiques à de fortes doses ou après administration prolongée, en même temps qu'elles sont une source de molécules naturelles actives douées de propriétés pharmacologiques. Malgré la disponibilité de diverses applications d'écran solaire synthétique, ses applications sont limitées à cause de leurs effets nocifs sur la peau. Compte tenu de l'utilisation humaine en tant que FPS, il est indispensable d'étudier les effets toxiques des extraits. C'est pour cela que le troisième aspect

consiste à tester l'effet toxicologique aiguë et subaiguë de deux extraits les plus actives de la plante. La DL_{50} de l'effet toxique aiguë *in vivo* des extraits EBr et EAe étaient supérieurs à 5 g/kg p.c donc non toxique par voie orale en une seule prise selon le protocole de Lorke. Alors que, l'effet subaiguë des deux extraits montre de importantes lésions hépatiques, rénales et pulmonaires jusqu'à la dose maximale de 2000 mg/kg p.c. Ces tests ont été complétés par des analyses biochimiques et hématologiques. L'application orale à dose répétée de l'extrait brut de la plante, à la dose suscitée, entraîne une perturbation de LDL ainsi que la fonction hépatorenale notamment la bilirubine indirecte. Tandis que l'extrait acétate d'éthyle, a entraîné un trouble lipidique et hépatorenal : au niveau de cholestérol, d'ALAT, d'urée, de créatinine et des protéines totales chez les souris. En outre, l'analyse hématologique du sang a révélé des changements significatifs et une forte perturbation des paramètres calculés. Toutefois, ces changements ne sont pas produits simultanément dans les groupes d'animaux et n'étaient pas dose-dépendant. L'ensemble des données biochimiques, hématologiques et histologiques confirme l'effet toxique au niveau hépatique, rénal et pulmonaire de la plante *Sonchus oleraceus L.*

En perspectives, les résultats obtenus lors de cette étude, nous encourage à :

- Achever l'isolement, la purification, l'identification structurale et la caractérisation des composés originaux. Les molécules actives identifiées pourront par la suite être réévaluées et éventuellement modulées par rapport à leurs réponses biologiques et toxicologiques.
- Evaluer leurs effets anti-cholinestérasique sur un modèle animal.
- Réaliser des tests *in vivo* de toxicité subchronique et même chronique des extraits, de la mutagénicité et de la cancérogénicité afin de mieux comprendre le profil de sécurité de la plante. Idéalement, une telle exploration de la recherche conduira à un effet pharmacologique plus sûr et plus efficace dans le traitement de l'hépatotoxicité médicamenteuse.
- Développer des crèmes antisolaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.

Références

bibliographiques

1. Abhijeet, V. P., Prakash, D. K., Yunus, N. A. (2018). A review on ethnomedicinal, pharmacological and a review on ethnomedicinal, pharmacological and phytochemical aspects of *Sonchus oleraceus* LINN (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(3), 01–09.
2. Adedapo, A. A., Abatan, M. O., Akinloye, A. K., Idowu, S. O., & Olorunsogo, O. O. (2003). Morphometric and histopathological studies on the effects of some chromatographic fractions of *Phyllanthus amarus* and *Euphorbia hirta* on the male reproductive organs of rats. *Journal of veterinary science*, 4(2), 181-185.
3. Adeyemi, O., & Osubor, C. C. (2010). Toxicological evaluation of the effect of *Clarias gariepinus* (African catfish) cultivated in water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on liver of albino rats. *African journal of food science*, 4(1), 026-031.
4. Afolayan, A. J. (2003). Extracts from the shoots of *Arctotis arctotoides* inhibit the growth of bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41(1), 22-25.
5. Afşar, H., Apak, R., & Tor, İ. (1990). Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using tris (1, 10-phenanthroline) iron (II). *Analyst*, 115(1), 99-103.
6. Agra, M. D. F., Baracho, G. S., Nurit, K., Basílio, I. J. L. D., & Coelho, V. P. M. (2007). Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 383-395.
7. Ahmad, S. S., Khan, S. M., & Butt, A. (2015). Exploring the Medicinal Plants Wealth: An Assessment of Traditional Medico-Botanical Knowledge of Local Communities in Changa Manga Forest, Pakistan. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, 2(3), 24-32.
8. Akindele, A. J., Adeneye, A. A., Salau, O. S., Sofidiya, M. O., & Benebo, A. S. (2014). Dose and time-dependent sub-chronic toxicity study of hydroethanolic leaf extract of *Flabellaria paniculata* Cav. (Malpighiaceae) in rodents. *Frontiers in pharmacology*, 5, 78.
9. Al-Easa, H.S., & Rizk, A. M. (1992). Constituents of *Centaurea* species. *Qatar Univ. Sci. J*, 12, 27–57.
10. Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food research international*, 41(1), 1-15.
11. Alkhatib, R. (2010). *Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de Ferula elaeochytris Korovin et Ferula lycia Boiss (Apiacées)*. (Thèse de doctorat : Université Lille, France).
12. Alkreaty, H. M., Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S. (2014). CCl4 induced genotoxicity and DNA oxidative damages in rats : hepatoprotective effect of *Sonchus arvensis*. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 452.
13. Allison, A. C., Cacabelos, R., Lombardi, V. R., Álvarez, X. A., & Vigo, C. (2001). Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(7), 1341-1357.
14. Al-Mamary, M., Al-Habori, M., Al-Aghbari, A. M., & Baker, M. M. (2002). Investigation into the toxicological effects of *Catha edulis* leaves : a short term study in animals. *Phytotherapy Research : An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(2), 127-132.
15. Alothman, E. A., Awaad, A. S., Safhi, A. A., Almoqren, S. S., El-Meligy, R. M., Zain, Y. M., Alasmary, F. A., & Alqasoumi, S. I. (2018). Evaluation of anti-ulcer and

- ulcerative colitis of *Sonchus oleraceus* L. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(7), 956-959.
16. Alrekabi, D. G., & Hamad, M. N. (2018). Phytochemical Investigation of *Sonchus oleraceus* (Family : Asteraceae) Cultivated in Iraq, Isolation and Identification of Quercetin And Apigenin. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(9), 2242-2248.
 17. Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2016). Histological stains: a literature review and case study. *Global journal of health science*, 8(3), 72.
 18. Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [On an unusual disease of the brain cortex]. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizine*, 64, 146-148.
 19. Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 4(1), 356-385.
 20. Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, 76(1), 55-61.
 21. Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International journal of biomedical science: IJBS*, 5(1), 1-11.
 22. Amin, F.U., Shah, S.A., & Kim, M.O. (2017). Vanillic acid attenuates Aβ1-42-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Scientific reports*, 7(1).
 23. Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food chemistry*, 98(1), 23-31.
 24. Angel, G. R., Vimala, B., & Nambisan, B. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of proteins isolated from eight *Curcuma* species. *Phytopharmacology*, 4(1), 96-105.
 25. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
 26. Aratanechemuge, Y., Hibasami, H., Sanpin, K., Katsuzaki, H., Imai, K., & Komiya, T. (2004). Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncology reports*, 11(2), 289-292.
 27. Arnould, R., Dubois, J., Abikhalil, F., Libert, A., Ghanem, G., Atassi, G., & Lejeune, F. J. (1990). Comparison of two cytotoxicity assays--tetrazolium derivative reduction (MTT) and tritiated thymidine uptake--on three malignant mouse cell lines using chemotherapeutic agents and investigational drugs. *Anticancer research*, 10(1), 145.
 28. Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Med Cell Longev*, 2016 : 5276130.
 29. Aszyk, J., & Kot-Wasik, A. (2016). The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several "legal highs" products. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 147(8), 1407-1414.
 30. Awaad, A. S., Almoqren, S. S., Safhi, A. A., Zain, Y. M., El-Meligy, R. M., & Al-Asamary, F. A. (2018). Gastroprotective extracts of *Sonchus oleraceus* L. *U.S. Patent No. 10, 137, 162*. Washington, DC : U.S. Patent and Trademark Office.
 31. Ayaz, M., Junaid, M., Ahmed, J., Ullah, F., Sadiq, A., Ahmad, S., & Imran, M. (2014). Phenolic contents, antioxidant and anticholinesterase potentials of crude extract,

- subsequent fractions and crude saponins from *Polygonum hydropiper* L. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 145.
32. Ayoola, G. A., Coker, H. A., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.
 33. Azevedo, J. S., Viana Jr, N. S., & Soares, C. D. V. (1999). UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry. *II Farmaco*, 54(9), 573-578.
 34. Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid : a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances*, 5(35), 27540-27557.
 35. Bai, Y. H., Chang, Y. H., & Masayoshi, N. D. (2008). A Chemical constituents of Japanese herb *Sonchus oleraceus* L., 39, 279-81.
 36. Bailey, R., & Boltz, D. F. (1959). Differential Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using 1, 10-phenanthroline and bathophenanthroline. *Analytical Chemistry*, 31(1), 117-119.
 37. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
 38. Balogun, S. O., Da Silva Jr, I. F., Colodel, E. M., De Oliveira, R. G., Ascêncio, S. D., & de Oliveira Martins, D. T. (2014). Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. *Journal of ethnopharmacology*, 157, 285-291.
 39. Banerjee, K., & Mandal, M. (2015). Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. *Redox Biology*, 5, 153-162.
 40. Banerjee, M., Kumar, H., Sahu, S., Das, A., & Parasar, P. (2011). Synthesis and in-vitro protein denaturation screening of novel substituted isoxazole/pyrazole derivatives. *Rasayan J. Chem*, 4(2), 413-417.
 41. Banso, A., & Adeyemo, S. (2006). Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritanium*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*. *Biokemistri*, 18(1), 39-44.
 42. Bell, T. W. (1890). Medical notes on New Zealand. *New Zealand Medical Journal*, 3(65-83), 129-145.
 43. BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (2012). *Industrial gums : polysaccharides and their derivatives*. (Eds). Academic Press.
 44. Ben Saad, H., Gargouri, M., Kallel, F., Chaabene, R., Boudawara, T., Jamoussi, K., ... & Ben Amara, I. (2017). Flavonoid compounds from the red marine alga *Alsidium corallinum* protect against potassium bromate-induced nephrotoxicity in adult mice. *Environmental toxicology*, 32(5), 1475-1486.
 45. Bendif, H. (2017). *Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae : Ajuga iva (L.) Schreb., Teucrium polium L., Thymus munbyanus subsp. coloratus (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et Rosmarinus eriocalyx Jord & Fourr.* (Thèse de doctorat : Ecole normal supérieure de Kouba, Alger).
 46. Bentamène, A., Benayache, S., Crèche, J., Petit, G., Bermejo-Barrera, J., Leon, F., & Benayache, F. (2005). New guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae). *Biochemical systematics and ecology*, 33, 1061-1065.
 47. Benzeggouta, N. (2005). Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister en

- pharmaco-chimie., Université Mentouri de Constantine Institut de Chimie, Algérie, 118p.
48. Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease : Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of aging*, 19(3), 173-189.
 49. Best, E. (1905). Maori medical lore. Notes on sickness and disease among the maori people of new zealand, and their treatment of the sick; together with some account of various beliefs, superstitions and rites pertaining to sickness, and the treatment thereof, as collected from the tuhoe tribe. Part I.—(Continued). *The Journal of the Polynesian Society*, 14(1), 1-23.
 50. Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., & Severino, L. (2012). Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon*, 59(6), 644-650.
 51. Bin Sayeed, M. S., & Ameen, S. S. (2015). Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutrition and cancer*, 67(8), 1216-1222.
 52. Birbrair, A., & Frenette, P. S. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1370(1), 82-96.
 53. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
 54. Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA, 79-82.
 55. Bondarenko, V. G., Glyzin, V. I., & Sheliuto, V. L. (1978). Sonchoside, a new flavonoid glycoside from *Sonchus arvensis*. *Khimiia prirodnykh soedinenii. Plenum Publishing Corporation*, 860(3), 340.
 56. Bondarenko, V. G., Glyzin, V. I., & Shelyuto, V. L. (1983). Flavonoids of the flowers of *Sonchus oleraceus*. *Chemistry of natural compounds*, 2, 234-235.
 57. Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., ... & Weber, P. (2013). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. In *Recommandations*.
 58. Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., & Khanahmad, H. (2017). Aptamers against pro-and anti-inflammatory cytokines : a review. *Inflammation*, 40(1), 340-349.
 59. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, 114(4), 1198-1205.
 60. Boumerfeg, S., Baghiani, A., Djarmouni, M., Ameni, D., Adjadj, M., Belkhiri, F., Khennouf, S., & Arrar, L. (2018). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium L.* extracts. *Chinese Medicine*, 3, 30-41.
 61. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
 62. Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2ème édition. Paris, France : Édition Tec et Doc.
 63. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Paris : Tec & Doc/Lavoisier, 279-281.
 64. Bruneton, J.(1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. Paris : Edition Tec et Doc.

65. Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
66. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
67. Cao, G., & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 44(6), 1309-1315.
68. Careri, M., Mangia, A., & Musci, M. (1998). Overview of the applications of liquid chromatography–mass spectrometry interfacing systems in food analysis : naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2), 263-297.
69. Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E., & Minna, J. D. (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *British Journal of Cancer*, 57(6), 540-547.
70. Chaabi, M. (2008). *Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae)*. (Thèse doctorat en science, L'université Frère Mentouri, Constantine & L'université de Strasbourg).
71. Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178-S180.
72. Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops : A comparative study. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2014, 1-9.
73. Chanforan, C. (2010). *Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate*. Avignon. (Thèse de doctorat : Université d'Avignon et des pays de vaucluse).
74. Chatha, S. A. S., Arshad, M. U., Arshad, W., Hussain, A. I., Saif, M. J., & Majeed, M. (2012). Effect of extraction regimes on antioxidant potential of rice (*Oryza sativa*) bran extracts. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 34(5), 1290-1294.
75. Cheftel, J. C., Cheftel, H., & Besançon, R. (1989). *Aspect toxicologique : introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*. Paris : Edition Lavoisier, 137-162.
76. Chioloro, A., Würzner, G., & Burnier, M. (2000). Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2 : moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques. *Néphrologie*, 21(8), 425-430.
77. Cici, S. Z-H., Adkins, S., Hanan, J. (2009). Modelling the morphogenesis of annual sowthistle, a common weed in crops. *Computers and Electronics in Agriculture*, 69(1), 40-45.
78. Cioffi, G., Dal Piaz, F., De Caprariis, P., Sanogo, R., Marzocco, S., Autore, G., & De Tommasi, N. (2006). Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*. *Journal of natural products*, 69(9), 1323-1329.
79. Colditz, G. A., Wolin, K. Y., & Gehlert, S. (2012). Applying what we know to accelerate cancer prevention. *Science translational medicine*, 4(127), 127.
80. Conforti, F., Marrelli, M., Carmela, C., Menichini, F., Valentina, P., Uzunov, D., Statti, G.A., Duez, P., & Menichini, F. (2011). Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), in vitro inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food chemistry*, 129(4), 1413-1419.

81. Costa, S. C., Detoni, C. B., Branco, C. R., Botura, M. B., & Branco, A. (2015). In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(4), 413-418.
82. Costa-Silva, J. H., Lima, C. R., Silva, E. J. R., Araújo, A. V., Fraga, M. C. C. A., e Ribeiro, A. R., ... & Wanderley, A. G. (2008). Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 495-500.
83. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
84. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
85. Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
86. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
87. Dalton, D. A. (1995). Antioxidant defenses of plants and fungi. In *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*, 298-355. Springer, Boston, MA.
88. Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food control*, 19(4), 346-352.
89. Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 38(3), 674-677.
90. Dehmlow, E. V., Guntenhöner, M., & Van Ree, T. (1999). A novel alkaloid from *Fluggea virosa* : 14, 15-epoxynorsecurinine. *Phytochemistry*, 52(8), 1715-1716.
91. Derache, R.G. (1986). *Toxicologie et sécurité des aliments*. Ed. Lavoisier, 08.
92. Descheemaeker, K. (2004). Nutri-et phytothérapie. Développements récents-1. Garant, 41-51.
93. Devkota, K. P. (2005). *Cholinesterase Inhibiting and Antiplasmodial Steroidal Alkaloids from Sarcococca Hookeriana*. (Thèse de doctorat, Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi, Pakistan).
94. Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193-S1199.
95. Diezi, J. (1992). Principe de base et répercussion clinique. Schoderet M. Pharmacologie: des principes fondamentaux aux applications thérapeutiques. Frison-roche, editor. 2nd ed. Slatkine, Genève : paris, 33-38.
96. Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., & Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.
97. Du, C., Bhatia, M., Tang, S. C., Zhang, M., & Steiner, T. (2015). Mediators of inflammation : Inflammation in cancer, chronic diseases, and wound healing. *Mediators of inflammation*, 1-2.
98. Du, Y., Feng, J., Wang, R., Zhang, H., & Liu, J. (2015). Effects of flavonoids from *Potamogeton crispus* L. on proliferation, migration, and invasion of human ovarian cancer cells. *PLoS One*, 10(6), e0130685.
99. Dubick, M. A., Zaucha, G. M., Korte Jr, D. W., & Wade, C. E. (1993). Acute and subacute toxicity of 7.5% hypertonic saline-6% dextran-70 (HSD) in dogs 2. biochemical and behavioral responses. *Journal of applied toxicology*, 13(1), 49-55.

100. Duganath, N., Kumar, S. R., Kumanan, R., & Jayaveera, K. N. (2010). Activity of traditionally used medicinal plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 2.
101. Duh, P. D., Yen, G. C., Yen, W. J., & Chang, L. W. (2001). Antioxidant effects of water extracts from barley (*Hordeum vulgare L.*) prepared under different roasting temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3), 1455-1463.
102. Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007). *Botanique : systématique moléculaire*. Elsevier Health Sciences. 14^{ème} édition révisée. Masson.
103. Dutra, E. A., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Santoro, M. I. R. M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(3), 381-385.
104. Ebrahimi, S. N., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110(4), 927-931.
105. Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., & Czyzowska, A. (2021). Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(1), 149-178.
106. Effa, A. M. E., Gantier, E., Hennebelle, T., Roumy, V., Rivière, C., Dimo, T., Kamtchouing, P., Desreumaux, P. & Dubuquoy, L. (2018). *Neoboutonia melleri var velutina Prain* : in vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous stem bark extract on acute hepatitis models. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 24.
107. Eleyinmi, A., Adebowale, Y., Oluwalana, I., Ajisafe, O., & Akintomide, T. (2006). Effect of dietary inclusion of *Garcinia kola*, *Gongronema latifolium* and *Vernonia amygdalina* on the nutritional quality of a complementary diet. *Journal of Biological Sciences*, 1, 43-49.
108. El-Ghorab, A. H., El-Massry, K. F., Marx, F., & Fadel, H. M. (2003). Antioxidant activity of Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts. *Food/Nahrung*, 47(1), 41-45.
109. Elkhayat, E. S. (2009). Cytotoxic and antibacterial constituents from the roots of *Sonchus oleraceus L.* growing in Egypt. *Pharmacognosy magazine*, 5(20), 324.
110. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
111. Elmi, A., Spina, R., Abdoul-Latif, F., Yagi, S., Fontanay, S., Risler, A., ... & Laurain-Mattar, D. (2018). Rapid screening for bioactive natural compounds in *Indigofera caerulea Rox* fruits. *Industrial Crops and Products*, 125, 123-130.
112. Emerenciano, V. P., Militão, J. S. L. T., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. A. C., Zambon, M., & Brant, A. J. C. (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9), 947-957.
113. Engelmann, M. D., Hutcheson, R., & Cheng, I. F. (2005). Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5, 7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3', 4'-Dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2953-2960.
114. Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7), 939-953.
115. Es-Safi, N. E., Kollmann, A., Khlifi, S., & Ducrot, P. H. (2007). Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure-activity relationship. *LWT-Food science and technology*, 40(7), 1246-1252.

116. Ezeja, M. I., Anaga, A. O., & Asuzu, I. U. (2015). Antidiabetic, antilipidemic, and antioxidant activities of *Gouania longipetala* methanol leaf extract in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmaceutical biology*, 53(4), 605-614.
117. Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I., Angioni, A., Dessi, S., ... & Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 963-969.
118. Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.
119. Ferrari, J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : "*Gnidia involucrata*" Steud. ex A. Rich. (Thèse de doctorat, Université de Lausanne).
120. Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., & Sczufca, M. (2005). Global prevalence of dementia : a Delphi consensus study. *The lancet*, 366(9503), 2112-2117.
121. Filleul, E. (2019). *Les Astéracées : description botanique, biologique et étude de plantes médicinales et toxiques*. (Thèse d'exercice, Université de Limoges, Limoges).
122. Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Da Cruz, M. G., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., & Marques, M. P. M. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1 : Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(13), 3581-3589.
123. Fouad, I., Mohamed, H. M., Abed, E-A., Ahmida, M., Wesam, A. K. (2015). Chemical and biological evaluation of the diethyl ether extract of wild *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus* growing in Libya. *international journal of pharmacy*, 5 (3), 693 -701.
124. Frank, C.L. (1992). *Toxicologie : Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque*. Paris : Masson, 73-360.
125. Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
126. Fry, L., & Baker, B. S. (2007). Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clinics in dermatology*, 25(6), 606-615.
127. Galtier, P., More, J., Bodin, G., Brunel-Dubech, N., & Alvinerie, M. (1974). Toxines d'*Aspergillus ochraceus wilhelm*. Iii.--toxicité aiguë de l'ochratoxine a chez le rat et la souris adultes. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 5 (2), 233-247.
128. Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., & Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1485-1490.
129. Gatto, M. A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N. A., Nigro, F., Vanadia, S., & Di Venere, D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 72-82.
130. Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., & Fonseca, M. J. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *Aaps Pharmsci*, 5(2), 111.

131. Ghorbanpour, M., & Varma, A. (2017). Plant nanobionics a novel approach to overcome the environmental challenges. In *Medicinal plants and environmental challenges*, 247-257. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-68717-9.
132. Ginsberg, H. N., Zhang, Y. L., & Hernandez-Ono, A. (2006). Metabolic syndrome : focus on dyslipidemia. *Obesity*, 14(2S), 41S-49S.
133. Goldie , W.H. (1905). *Māori medical lore*. Transactions of the New Zealand Institute.
134. Gomathi, R., & Manian, S. (2015). Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae) : An endemic medicinal plant of India. *Industrial Crops and Products*, 73, 134-143.
135. Govindappa, M., & Poojashri, M. N. (2011). Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of pharmacognosy and phytotherapy*, 3(3), 43-51.
136. Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A., & Vernekar, S. N. (2010). Markers of renal function tests. *North American journal of medical sciences*, 2(4), 170-3.
137. Grabarczyk, M., Wińska, K., Mączka, W., Potaniec, B., & Anioł, M. (2015). Loliolide—the most ubiquitous lactone. *Folia Biologica et Oecologica*, 11(1), 1-8.
138. Green, B. T., Welch, K. D., Panter, K. E., & Lee, S. T. (2013). Plant toxins that affect nicotinic acetylcholine receptors : a review. *Chemical research in toxicology*, 26(8), 1129-1138.
139. Greuter, W. (1991). Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of Med-Checklist. *Botanika chronika*, 10, 63-79.
140. Grossberg, G. T. (2003). Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease : getting on and staying on. *Current Therapeutic Research*, 64(4), 216-235.
141. Guarrera, P. M., & Savo, V. (2016). Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of ethnopharmacology*, 185, 202-234.
142. Guil-Guerrero, J. L., Giménez-Giménez, A., Rodríguez-García, I., & Torija-Isasa, M. E. (1998). Nutritional composition of *Sonchus* species (*S asper* L, *S oleraceus* L and *S tenerrimus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(4), 628-632.
143. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
144. Güven, M., Aras, A. B., TOPALOĞLU, N., Özkan, A., ŞEN, H. M., Kalkan, Y., ... & ÇOŞAR, M. (2015). The protective effect of syringic acid on ischemia injury in rat brain. *Turkish journal of medical sciences*, 45(1), 233-240.
145. Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2000). Unit XII, Gastrointestinal Physiology. *Textbook of medical physiology. 10th edition*. WB Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 718-771.
146. Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(5), 1887-1892.
147. Hagos, Z., & SB, P. (2018). Anti-inflammatory Activity of Bioactive Flavonoid Apigenin-7-O-β-D-Glucuronide Methyl Ester from Ethyl Acetate Leaf Extract of *Manilkara zapota* on Lipopolysaccharide-induced Pro-inflammatory Mediators Nitric

- oxide (NO), Prostaglandin E 2 (PGE 2) in Raw 264.7 cells. *Drug Invention Today*, 10(4), 531-535.
148. Hale, A. L. (2005). *Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis*. (Thèse de doctorat, Texas A&M University).
149. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview. In *Methods in enzymology*, 186, 1-85. Academic Press.
150. Ham, A., Lee, S. J., Shin, J., Kim, K. H., & Mar, W. (2012). Regulatory effects of costunolide on dopamine metabolism-associated genes inhibit dopamine-induced apoptosis in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*, 507(2), 101-105.
151. Han, Y. F., Zhang, Q., Gao, K., & Jia, Z. J. (2005). New sesquiterpenes from *Sonchus transcaspicus*. *Planta medica*, 71(06), 543-547.
152. Hanley, K. S., Schmidt, E., & Schmidt, F. M. (1986). Enzymes in serum, their volume in diagnosis. *Illinois : Charles Thomas Springfield*, 79-81.
153. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
154. Hartwell, J. L. (1976). Types of anticancer agents isolated from plants. *Cancer Treat Rep*, 60(8), 1031-1067.
155. Havel, R. J. (1969). Pathogenesis, differentiation and management of hypertriglyceridemia. *Adv Intern Med*, 15, 117-154.
156. Heilmann, J., Wasescha, M. R., & Schmidt, T. J. (2001). The influence of glutathione and cysteine levels on the cytotoxicity of helenanolide type sesquiterpene lactones against KB cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(8), 2189-2194.
157. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. London, New York : Churchill Livingstone, Edinburgh, 245-252.
158. Helal, A. M., Nakamura, N., El-Askary, H., & Hattori, M. (2000). Sesquiterpene lactone glucosides from *Sonchus asper*. *Phytochemistry*, 53(4), 473-477.
159. Hodge, H. C., & Sterner, J. H. (1943). Determination of substance acute toxicity by LD50. *Am Ind Hyg Assoc*, 10, 93.
160. Hor, S. Y., Ahmad, M., Farsi, E., Yam, M. F., Hashim, M. A., Lim, C. P., Sadikum, A., & Asmawi, M. Z. (2012). Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) : Acute and subchronic toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(1), 106-114.
161. Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of endocrinological investigation*, 37(9), 783-788.
162. Hostettmann, K., Borloz, A., Urbain, A., & Marston, A. (2006). Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry*, 10(8), 825-847.
163. Hussain, J., Muhammad, Z., Ullah, R., Khan, F. U., Khan, I. U., Khan, N., & Jan, S. (2010). Evaluation of the chemical composition of *Sonchus eruca* and *Sonchus asper*. *J. Am. Sci*, 6(9), 231-235.
164. Huyan, T., Li, Q., Wang, Y. L., Li, J., Zhang, J. Y., Liu, Y. X., ... & Li, H. Q. (2016). Anti-tumor effect of hot aqueous extracts from *Sonchus oleraceus* (L.) and *Juniperus sabina* L –two traditional medicinal plants in China. *Journal of ethnopharmacology*, 185, 289-299.

165. Ibrahim, R., Abubakar, E. M., Modibbo, S. M., & Lamarin, B. G. (2017). Percentage yield and acute toxicity of the plant extracts of *Ceiba pentandra* grown in Bauchi State, North Eastern Nigeria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 1777-1779.
166. Inbathamizh, L., & Padmini, E. (2013). Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer—a comparative pharmacokinetic approach. *Asian J Pharm Clin Res*, 6(4), 106-112.
167. Ingkaninan, K., De Best, C. M., Van Der Heijden, R., Hofte, A. J. P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U.R., & Verpoorte, R. (2000). High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A*, 872(1-2), 61-73.
168. Itam, A., Abdul Majid, A. M. S., & Ismail, Z. (2015). Antioxidant and Antiangiogenic Properties, and Gas Chromatographic-Time of Flight Analysis of *Sonchus arvensis* Leaves Extracts. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37(6), 1239-1248.
169. Ito, A., Munakata, K., Imazu, Y., & Watanabe, K. (2012). First nationwide attitude survey of Japanese physicians on the use of traditional Japanese medicine (Kampo) in cancer treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
170. Ivancheva, S., & Tsvetkova, R. (2003). Distribution of flavonoid aglycones in tribe Anthemideae (Asteraceae). *Advances in Phytochemistry*, 85-95.
171. Jagtap, V. A., Agasimundim, Y. S., Jayachandran, E., & Sathe, B. S. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of 2-amino-3-(substituted benzyldinecarbohydrazide)-4, 5, 6, 7-tetrahydrobenzothiophenes. *J Pharm Res*, 4(2), 378-379.
172. Jan, S., Khan, M. R., Rashid, U., & Bokhari, J. (2013). Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothecha buxifolia* fruit. *Osong public health and research perspectives*, 4(5), 246-254.
173. Jeannot, K., Bolard, A., & Plesiat, P. (2017). Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International journal of antimicrobial agents*, 49(5), 526-535.
174. Jensen, S. R. (1991). Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. In *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, 133-158.
175. Jensen, S. R. (1992). Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 284-302.
176. Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., & Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease : a critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Annals of Internal Medicine*, 123(11), 860-872.
177. Jiang, L., Yao, Q., & Xie, Y. (2009). Study on chemical constituents of *Sonchus arvensis* L. *Food and Drug*, 11(3), 27-29.
178. Jimoh, F. O., Adedapo, A. A., & Afolayan, A. J. (2011). Comparison of the nutritive value, antioxidant and antibacterial activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. *Rec Nat Prod*, 5(1), 29-42.
179. Joshi, A., Bhoje, M., & Sattarkar, A. (2013). Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(7), 80-87.
180. Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., Bagchi, M., & Bagchi, D. (2000). Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology*, 155(1-3), 83-90.

181. Juhaimi, F. A., Ghafoor, K., Ahmed, I. M., Babiker, E. E., & Özcan, M. M. (2017). Comparative study of mineral and oxidative status of *Sonchus oleraceus*, *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1745-1751.
182. Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., & Dosako, S. I. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food chemistry*, 71(1), 61-66.
183. Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
184. Kandikattu, K., Bharath R. K, P., Venu P, R., Sunil K, K., Ranjith S.B, Rathore.(2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729-730.
185. Karar, M. G., Rezk, A., Abdalla, T., Ebrahim, A., Ullrich, S., & Kuhnert, N. (2017). Antimicrobial, antiparasitic and antioxidant activities of medicinal plants from Sudan. *J. Complement. Med. Altern. Health*, 2(5), 555597.
186. Karou, D., Dicko, M. H., Simpore, J., & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of biotechnology*, 4(8), 823-828.
187. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food chemistry*, 100(2), 584-589.
188. Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., & Athar, M. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of ethnopharmacology*, 108(3), 340-348.
189. Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., & Ahmed, M. (2012a). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 12.
190. Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S. (2012b). Brain antioxidant markers, cognitive performance and acetylcholinesterase activity of rats : efficiency of *Sonchus asper*. *Behavioral and Brain functions*, 8(1), 1-7.
191. Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., & Shah, N. A. (2012). Hepatoprotective activity of *Sonchus asper* against carbon tetrachloride-induced injuries in male rats : a randomized controlled trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 90.
192. Khan, R. A. (2012c). Protective effects of *Sonchus asper* (L.) Hill, (Asteraceae) against CCl₄-induced oxidative stress in the thyroid tissue of rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 181.
193. Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S. (2012c). Protective effects of *Sonchus asper* against KBrO₃ induced lipid peroxidation in rats. *Lipids in health and Disease*, 11(1), 164.
194. Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., & Bokhari, J. (2010). Antimicrobial and phytotoxic screening of various fractions of *Sonchus asper*. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3883-3887.
195. Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., Shah, N. A., Khan, A. M., Khan, Y. M., Bokhari, J., Rashid, U., Ahmad, B., Shabbir, M., Saeed, N., Jan, S., & Afsar, T. (2012). Amelioration of kidney function markers by *Sonchus asper* butanolic extract against KBrO₃-induced toxicity in rat. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1224-1228.
196. Khare, C. P. (2008). *Indian medicinal plants : an illustrated dictionary*. Springer Science & Business Media.

197. Khazaeli, P., & Mehrabani, M. (2010). Screening of sun protective activity of the ethyl acetate extracts of some medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (1), 5-9.
198. Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
199. Kittiwannachot, P., Borisut, P., Wanasawas, P., Ponpanich, L., Rattanasuk, O., & Chulasiri, M. (2008). Antimutagenic potentials of hydroalcoholic herbal extracts towards UV-induced mutation. *Thai Journal of Toxicology*, 23(1), 27-34.
200. Kolthoff, I. M., Leussing, D. L., & Lee, T. S. (1950). Reaction of ferrous and ferric iron with 1, 10-phenanthroline. III. The ferrous monophenanthroline complex and the colorimetric determination of phenanthroline. *Journal of the American Chemical Society*, 72(5), 2173-2177.
201. Konaté, K., Hilou, A., Mavoungou, J. F., Lepengué, A. N., Souza, A., Barro, N., ... & Nacoulma, O. G. (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L.(Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 1-6.
202. Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., ... & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*, 47(8), 2083-2091.
203. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Medicinal spices and vegetables from Africa. *Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. Academic P. Dschang, Cameroon : Mica Haley. ISBN 9780128092866.
204. Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344-352.
205. Kupchan, S. M. (1970). Section of Chemical Sciences : recent advances in the chemistry of tumor inhibitors of plant origin. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 32(1 Series II), 85-106.
206. Kupchan, S. M., Eakin, M. A., & Thomas, A. M. (1971). Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14(12), 1147-1152.
207. Kwok, B. H., Koh, B., Ndubuisi, M. I., Eloffsson, M., & Crews, C. M. (2001). The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chemistry & biology*, 8(8), 759-766.
208. Lai, L. S., Chou, S. T., & Chao, W. W. (2001). Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 963-968.
209. Lameire, N., Jager, K., Van Biesen, W. I. M., De Bacquer, D., & Vanholder, R. (2005). Chronic kidney disease: a European perspective. *Kidney International*, 68, S30-S38.
210. Lane, R. M., Potkin, S. G., & Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 101-124.
211. Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M. G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C., & Cicchetti, F. (2004). Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *The FASEB journal*, 18(6), 717-719.

212. Latha, M. S., Martis, J., Shobha, V., Shinde, R. S., Bangera, S., Krishnankutty, B., ... & Kumar, B. N. (2013). Sunscreening agents : a review. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 6(1), 16.
213. Lee, H. J., Kim, N. Y., Jang, M. K., Son, H. J., Kim, K. M., Sohn, D. H., Lee, S.H., & Ryu, J. H. (1999). A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. *Planta medica*, 65(02), 104-108.
214. Lee, K. H., Huang, E. S., Piantadosi, C., Pagano, J. S., & Geissman, T. A. (1971). Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. *Cancer Research*, 31(11), 1649-1654.
215. Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-7295.
216. Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International journal of drug development and research*, 3(3), 189-196.
217. Lehmann, H. (2013). *Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles*. (Thèse de doctorat, Université de Strasbourg).
218. Lesgards, J. F., Baldovini, N., Vidal, N., & Pietri, S. (2014). Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies : a review. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1423-1446.
219. Li, N., Zhao, B., Yu, Y. F., & Dong, X. P. (2008). Studies on anti-inflammation chemical constituents of *Patrinia villosa*. *Journal of Chinese medicinal materials*, 31(1), 51-53.
220. Li, Q., Dong, D. D., Huang, Q. P., Li, J., Du, Y. Y., Li, B., ... & Huyan, T. (2017). The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 799-809.
221. Li, X. M., & Yang, P. L. (2018). Research progress of *Sonchus* species. *International journal of food properties*, 21(1), 147-157.
222. Liang, Q., Chalamaiah, M., Liao, W., Ren, X., Ma, H., & Wu, J. (2020). Zein hydrolysate and its peptides exert anti-inflammatory activity on endothelial cells by preventing TNF- α -induced NF- κ B activation. *Journal of Functional Foods*, 64, 103598.
223. Liju, V. B., Jeena, K., & Kuttan, R. (2013). Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food and Chemical Toxicology*, 53, 52-61.
224. Lin, J., Opoku, A. R., Geheeb-Keller, M., Hutchings, A. D., Terblanche, S. E., Jäger, A. K., & Van Staden, J. (1999). Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of ethnopharmacology*, 68(1-3), 267-274.
225. Liu, Z.W., & Zhao, X.L. (2010). Effects of different extraction methods on extraction rate of polysaccharide from *Sonchus oleraceus* L. *Medicinal Plant*, 1(5), 31-35.
226. Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287.
227. Lu, J., Li, G., He, K., Jiang, W., Xu, C., Li, Z., ... & Teng, L. (2015). Luteolin exerts a marked antitumor effect in cMet-overexpressing patient-derived tumor xenograft models of gastric cancer. *Journal of translational medicine*, 13(1), 42.

228. Lu, X. H., Tang, W. J., Xie, Y. G., He, J. S., & Chen, G. (2006). Studies on Anti-Inflammatory Effect of *Sonchus Oleraceus* L. Extract. *China Science and Technology of Chinese Medicine*, 13, 240-241.
229. Luo, W., Zhao, M., Yang, B., Ren, J., Shen, G., & Rao, G. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, 126(1), 277-282.
230. Ma, Q., Jiang, J. G., Zhang, X. M., & Zhu, W. (2018). Identification of luteolin 7-O- β -D-glucuronide from *Cirsium japonicum* and its anti-inflammatory mechanism. *Journal of Functional Foods*, 46, 521-528.
231. Macharia, L. W., Mureithi, M. W., & Anzala, O. (2018). Cancer in Kenya : types and infection-attributable. Data from the adult population of two National referral hospitals (2008-2012). *AAS Open Research*, 1, 25.
232. Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques, 192. ISBN : 2 88074 625 6 47.
233. Mahakunakorn, P., Tohda, M., Murakami, Y., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2004). Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 38-46.
234. Maiorov, E. G., Keskin, O., Gursoy, A., & Nussinov, R. (2013). The structural network of inflammation and cancer : merits and challenges. In *Seminars in cancer biology*, 23 (4), 243-251). Academic Press.
235. Makkawi, T. A., Yaseen, N. Y., & Zgheir, Zeinab. R. (2010). Study of the effect of crude extracts of *Sonchus oleraceus* on cancer cell growth (In vivo). *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 34(1), 218-227.
236. Mallik, P., Mishra, S. K., & Satapathy, K. B. (2014). Studies on the antibacterial and antioxidant activities of *Sonchus asper* (L.) Hill and *Seseli diffusum* (Roxb. Ex sm.) Sant. & Wagh. *ISOR J. Pharma. Bio. Sci*, 9(6), 24-27.
237. Malone, M. H., & Robichaud, R. C. (1962). A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. In *Lloydia*, 25(4), 320-331.
238. Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. bras. dermatol*, 61, 121-4.
239. Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.
240. Marfai, L. (2013). *Les difficultés rencontrées lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans l'indication de la maladie d'Alzheimer*. (Thèse de doctorat, Université de Lorraine), 49.
241. Marfak, A. (2003). *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides*. (Thèse de doctorat : Université de LIMOGES), 181.
242. Martey, O. K., Armah, G., & Okine, L. K. N. A. (2010). Absence of organ specific toxicity in rats treated with Tonica, an aqueous herbal haematinic preparation. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(3), 231-240.
243. Marzocco, S., Calabrone, L., Adesso, S., Larocca, M., Franceschelli, S., Autore, G., Martelli, G., & Rossano, R. (2015). Anti-inflammatory activity of horseradish (*Armoracia rusticana*) root extracts in LPS-stimulated macrophages. *Food & function*, 6(12), 3778-3788.

244. Mavi, A., Yiğit, N., Yiğit, D., & Kandemir, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of Turkish endemic *Sonchus erzinicanicus* extracts. *Turkish Journal of Biology*, 35(2), 243-250.
245. Mawalagedera, S. M. M. R. (2014). *Antioxidant Activities of Sonchus Oleraceus L.* (Thèse de doctorat, Victoria University of Wellington).
246. Mbanga, L., Mpiana, P. T., Mbala, M., Ilinga, L., Ngoy, B., Mvingu, K., & Mulenga, M. (2015). Comparative in vitro Sun Protection Factor (SPF) values of some herbal extracts found in Kinhasa by Ultraviolet Spectrophotometry. *J. of Physical and Chemical Sciences*, 2(4), 1-6.
247. Mbanga, L., Mulenga, M., Mpiana, P. T., Bokolo, K., Mumbwa, M., & Mvingu, K. (2014). Determination of Sun Protection Factor (SPF) of some body creams and lotions marketed in Kinshasa by Ultraviolet Spectrophotometry. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*, 1(8), 7-13.
248. McDowell, A., Thompson, S., Stark, M., Ou, Z. Q., & Gould, K. S. (2011). Antioxidant activity of puha (*Sonchus oleraceus L.*) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay. *Phytotherapy research*, 25(12), 1876-1882.
249. Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., ... & Segura-Carretero, A. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC cancer*, 7(1), 80.
250. Mercadante, A. Z., & Rodriguez-amaya, D. B. (1990). Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 25(2), 213-219.
251. Metushi, I. G., Cai, P., Zhu, X., Nakagawa, T., & Uetrecht, J. P. (2011). A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(6), 911-914.
252. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
253. Milane, H. (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques* (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008)).
254. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
255. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.
256. Mishra, A. K., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2011). Evaluation of sun protection factor of some marketed formulations of sunscreens by ultraviolet spectroscopic method. *J Curr Pharm Res*, 5(1), 32-35.
257. Mishra, A. K., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2012). Assessment of in vitro sun protection factor of *Calendula officinalis L.* (Asteraceae) essential oil formulation. *Journal of Young Pharmacists*, 4(1), 17-21.
258. Mishra, N. K., Bstia, S., Mishra, G., Chowdary, K. A., & Patra, S. (2011). Anti-arthritic activity of *Glycyrrhiza glabra*, *Boswellia serrata* and their synergistic activity in combined formulation studied in Freund's adjuvant induced arthritic rats. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2(2), 92.

259. Miyase, T., & Fukushima, S. (1987). Studies on sesquiterpene glycosides from *Sonchus oleraceus* L. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 35(7), 2869-2874.
260. Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
261. Mohammadi, S. (2017). Effects of *Sonchus asper* extract on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Adv Pharmacol Clin Trials*, 2 (1), 1-7.
262. Mohanta, T. K., Patra, J. K., Rath, S. K., Pal, D. K., & Thatoi, H. N. (2007). Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical screening of oils and nuts of *Semicarpus anacardium* L.f. *Scientific Research and Essays*, 2(11), 486-490.
263. More, B. H., Sakharwade, S. N., Tembhurne, S. V., & Sakarkar, D. M. (2013). Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application. *International Journal of Research in Cosmetic Science*, 3(1), 1-6.
264. Moreau, F. (1960). *Botanique : procaryotes (Cyanophytes et Bactéries), Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs), la plante dans ses rapports avec le milieu*. Librairie Gallimard.
265. Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570. In Celikel, N., & Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech journal of food sciences*, 26(3), 174.
266. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
267. Mothibe, M. E., & Sibanda, M. (2019). African traditional medicine: South African perspective. *Traditional and Complementary Medicine*, 1-27.
268. Muhammad, H. L., Makun, H. A., Kabiru, A. Y., Mann, A., Busari, M. B., Abdullah, A. S., & Fatima, A. (2015). In vitro antibacterial activity and in vivo acute toxicological studies of *Nelsonia campestris* aqueous leaf extract. *Int J Biochem Res Rev*, 7(1), 27-35.
269. Mukherjee, P. K., & Houghton, P. J. (Eds.). (2009). *Evaluation of Herbal Medicinal Products: perspectives on quality, safety and efficacy* (pp. 399-401). London : Pharmaceutical press.
270. Mukhopadhyay, D., Dasgupta, P., Roy, D. S., Palchoudhuri, S., Chatterjee, I., Ali, S., & Dastidar, S. G. (2016). A sensitive in vitro spectrophotometric hydrogen peroxide scavenging assay using 1, 10-phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*, 6(1), 124-13.
271. Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
272. N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
273. Nafiu, M. O., Hamid, A. A., Muritala, H. F., & Adeyemi, S. B. (2017). Preparation, standardization, and quality control of medicinal plants in Africa. *Medicinal spices and vegetables from africa*, 171-204.
274. Nakamura, M., Ra, J. H., Jee, Y., & Kim, J. S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *journal of food and drug analysis*, 25(2), 316-326.

275. Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(4), 273-300.
276. Nayak, Y., Venkatachalam, H., Daroji, V. K., Mathew, G., Jayashree, B. S., & Unnikrishnan, M. K. (2014). Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats. *EXCLI journal*, 13, 1055-1074.
277. Nazari S. (2002). Mechanical events in physiopathology of idiopathic pulmonary emphysema : a theoretical analysis. *Internet J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 5.
278. Neergheen-Bhujun, V. S. (2013). Underestimating the toxicological challenges associated with the use of herbal medicinal products in developing countries. *BioMed research international*, 2013, 1-9.
279. Nehir El, S., & Karakaya, S. (2004). Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(1), 67-74.
280. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
281. Nićiforović, N., & Abramović, H. (2014). Sinapic acid and its derivatives : natural sources and bioactivity. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(1), 34-51.
282. Nurianti, Y., Hendriani, R., Sukandar, E. Y., & Anggadiredja, K. (2014). Acute and subchronic oral toxicity studies of ethyl acetate extract of *Sonchus arvensis* L. leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 343-347.
283. OCDE. (1979). Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme. In : *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Paris : OCDE,1-15.
284. OCDE. (2001a). Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, 1 (4), 1-15. OCDE, Paris.
285. OCDE. (2001b). Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, 1(4), 1-14. OCDE, Paris.
286. OCDE. (2008). Guidelines for the testing of chemicals. Acute Oral. Toxic. — *Proced.* 425,27.
287. OCDE. (2008a). Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, 1 (4), 1-29. OCDE, Paris.
288. Odula, T., Adeniyi, F. A. A., Ogunyemi, E. O., Bello, I.S., Idowu, T.O & Subair, H.G. (2007). Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract : biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1), 001-004.
289. OECD, T. N. (2008). 407 : Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, 4*.
290. Ogunlana, O. O., Ogunlana, O. E., Adeneye, A. A., Udo-Chijioke, O. A. C., Dare-Olipede, T. I., Olagunju, J. A., & Akindahunsi, A. A. (2013). Evaluation of the toxicological profile of the leaves and young twigs of *Caesalpinia bonduc* (Linn) roxb. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(6), 504-512.

291. Olorunnisola, O. S., Bradley, G., & Afolayan, A. J. (2012). Acute and sub-chronic toxicity studies of methanolic extract of *Tulbaghia violacea* rhizomes in Wistar rats. *African Journal of Biotechnology*, 11(83), 14934-14940.
292. Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., ... & Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(1), 56-67.
293. OMS. (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. Département Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques (EDM) Organisation mondiale de la Santé
294. OMS. (2006). Le cancer. Aide-mémoire. *W. H. O, World Health Organisation*. 297 : 1-4.
295. Osman, N. I., Sidik, N. J., Awal, A., Adam, N. A. M., & Rezali, N. I. (2016). *In vitro* xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(4), 343.
296. Ou, Z. Q., Schmierer, D. M., Rades, T., Larsen, L., & McDowell, A. (2013). Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 271-279.
297. Ouedraogo, Y., Nacoulma, O., Guissou, I. P., & Guede Guina, F. (2001). Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (Willd). *O. Ktz* (Rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 11, 13-29.
298. Ozgen, U., Sevindik, H., Kazaz, C., Yigit, D., Kandemir, A., Secen, H., & Calis, I. (2010). A new sulfated α -ionone glycoside from *Sonchus erzincanicus* Matthews. *Molecules*, 15(4), 2593-2599.
299. Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., ... & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
300. Pagliara, P., Carlà, E. C., Caforio, S., Chionna, A., Massa, S., Abbro, L., & Dini, L. (2003). Kupffer cells promote lead nitrate-induced hepatocyte apoptosis via oxidative stress. *Comparative hepatology*, 2(1), 1-13.
301. Panda, S. K., Das, R., Leysen, P., Neyts, J., & Luyten, W. (2018). Assessing medicinal plants traditionally used in the Chirang Reserve Forest, Northeast India for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 225, 220-233.
302. Parimelazhagan, T. (2015). *Pharmacological assays of plant-based natural products* (Vol. 71). Springer.
303. Perez, C. (1990). Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp*, 15, 113-115.
304. Perkin, G. D. (2002). *Neurologie : Manuel et atlas*. De Boeck Supérieur.
305. Perry, E. K., Gibson, P. H., Blessed, G., Perry, R. H., & Tomlinson, B. E. (1977). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia : Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *Journal of the neurological sciences*, 34(2), 247-265.
306. Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*) : Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food chemistry*, 96(4), 597-605.
307. Picman, A. K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical systematics and Ecology*, 14(3), 255-281.

308. Pieboji, J. G. (2007). Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. *Thèse de Doctorat Sciences en Biochimie, Liège*.
309. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
310. Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2013). Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity : an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1681-1700.
311. Pissavini, M., Ferrero, L., Alaro, V., Heinrich, U., Tronnier, H., Kockott, D., Lutz, D., Tournier, V., Zambonin, M., Meloni, M. (2003). Determination of the in vitro SPF. *Cosmet. Toiletries, Oak Park*, 118, 63-72.
312. Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
313. Prasad, M. M., & Seenayya, G. (2000). Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research International*, 33(9), 793-798.
314. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
315. Priyanka, S., Mary, S. R. I., Nandini, H. S., Kutty, A. V. M., & Kiranmayee, P. (2018). A pilot study on sun protection factor of plant extracts : an observational study. *Asian J Pharm Clin Res*, 11 (4), 67-71.
316. Psotová, J., Lasovsky, J., & Vicar, J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 147(2), 147-53.
317. Puri, A. V., Khandagale, P. D., & Ansari, Y. N. (2018). A review on ethnomedicinal , pharmacological and a review on ethnomedicinal , pharmacological and phytochemical aspects of *Sonchus oleraceus linn . (asteraceae)*. *IJPBS*, 8(3), 01-09.
318. Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). *Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2*. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, 1170.
319. Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). HPLC–ESI–QTOF–MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical Analysis*, 24(3), 213-223.
320. Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease : antioxidant therapeutic targets. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 1(3), 291-315.
321. Rahmani, S., Belboukhari, N., Sekkoum, K., & Cheriti, A. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei (Plumbaginacea)*. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 6(1), 80-86.
322. Ramaiah, M., Jain, A., Baldwin, J. C., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G. (2011). Characterization of the phosphate starvation-induced glycerol-3-phosphate permease gene family in Arabidopsis. *Plant physiology*, 157(1), 279-291.
323. Rastogi, T., Hildesheim, A., & Sinha, R. (2004). Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 909-917.

324. Ravn, H., Andary, C., Kovács, G., & Mølgaard, P. (1989). Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical systematics and ecology*, 17(3), 175-184.
325. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
326. Resende, J. H. C., de Aquino, G. S. T., do Nascimento, F. R. F., Aguiar, M. M., & Fiorelli, R. K. A. (2015). Oral Use of an Infusion of Leaves of *Solanum paniculatum* L., *Jacaranda brasiliensis* and *Sonchus oleraceus* for Treatment of Vitiligo. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 5(04), 317-331.
327. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
328. Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
329. Rice-Evans, C., & Burdon, R. (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid research*, 32(1), 71-110.
330. Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545-589.
331. Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates: Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(1), 295-302.
332. Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52(2), 35-42.
333. Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 657-691.
334. Rodríguez, N., Amils, R., Jiménez-Ballesta, R., Rufo, L., & de la Fuente, V. (2007). Heavy metal content in *Erica andevalensis*: an endemic plant from the extreme acidic environment of Tinto River and its soils. *Arid Land Research and Management*, 21(1), 51-65.
335. Rollinger, J. M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H., & Prast, H. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal of medicinal chemistry*, 47(25), 6248-6254.
336. Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., & Said, O. (2006). Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4), 433-439.
337. Sahoo, N., Manchikanti, P., & Dey, S. (2010). Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia*, 81(6), 462-471.
338. Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N. (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(1), 146-155.
339. Saleem, U., Ahmad, B., Ahmad, M., Erum, A., Hussain, K., & Irfan Bukhari, N. (2016). Is folklore use of *Euphorbia helioscopia* devoid of toxic effects?. *Drug and chemical toxicology*, 39(2), 233-237.
340. Saleem, H., Ahmad, I., Shahid, M. N., Gill, M. S. A., Nadeem, M. F., Mahmood, W., & Rashid, I. (2016). In vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potentials of *Jatropha gossypifolia* plant extracts. *Acta Pol. Pharm*, 73(2), 419-423.

341. Salem, J. H. (2009). *Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria retusa et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique*. (Thèse de doctorat, Université de Nancy INPL).
342. Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
343. Sánchez-Moreno, C., & Larrauri, J. A. (1998). Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technology International*, 4(6), 391-399.
344. Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., ... & Ruberto, G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and fragrance journal*, 21(6), 890-898.
345. Sax, B. W. (2000). Educating Consumers about sun protection. *Pharmacy Times*, 66(5), 48-54.
346. Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.
347. Schaffer, S., Schmitt-Schillig, S., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2005). Antioxidant properties of Mediterranean food plant extracts : geographical differences. *Journal of Physiology and Pharmacology. Supplement*, 56(1), 115-124.
348. Schalka, S., & VM, R. (2011). Sun protection factor : meaning and controversies. *An Bras Dermatol*, 86(3), 507-15.
349. Schlede, E., Genschow, E., Spielmann, H., Stropp, G., & Kayser, D. (2005). Oral acute toxic class method : a successful alternative to the oral LD50 test. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 42(1), 15-23.
350. Schmidt, T. J. (1997). Helenanolide-type sesquiterpene lactones—III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 5(4), 645-653.
351. Schmidt, T. J. (1999). Toxic activities of sesquiterpene lactones : structural and biochemical aspects. *Curr. Org. Chem*, 3(4), 577-608.
352. Seaman, F. C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The botanical review*, 48(2), 121-594.
353. Seeley, R., Stephens, T., & Tate, P. (2006). *Reproduction and Development. Anatomy & Physiology*. 7th ed. New York, St Louis : McGraw-Hill Publishers.
354. Segall, A. I., & Moyano, M. A. (2008). Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. *International journal of cosmetic science*, 30(6), 453-458.
355. Sell, C. S. (2007). *A fragrant introduction to terpenoid chemistry*. Royal Society of Chemistry.
356. Shah, U., Shah, R., Acharya, S., & Acharya, N. (2013). Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese journal of natural medicines*, 11(1), 16-23.
357. Shenekar, P. N., Ukirade, P. S., Salunkhe, S. D., Sutar, S. T., Magdum, C. S., Mohite, S. K., ... & Metri, S. M. (2014). In vitro evaluation of sun protection factor of fruit extract of *Carica papaya L.* as a lotion formulation. *European Journal of Experimental Biology*, 4(2), 44-47.
358. Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. In *Methods in enzymology*, 335, 157-166. Academic Press.

359. Shi, M. D., Shiao, C. K., Lee, Y. C., & Shih, Y. W. (2015). Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Cell International*, 15(1), 33.
360. Shukla, S., & Gupta, S. (2010). Apigenin : a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical research*, 27(6), 962-978.
361. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.
362. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
363. Smach, M. A., Hafsa, J., Charfeddine, B., Dridi, H., & Limem, K. (2015). Effects of sage extract on memory performance in mice and acetylcholinesterase activity. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73 (4), 281-288. Elsevier Masson.
364. Smith, M. A., Richey, G. P. P., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., & Kowal, N. (1996). Test for oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382(6587), 120-121.
365. Soubrier, M., Rosenbaum, D., Tatar, Z., Lahaye, C., Dubost, J. J., & Mathieu, S. (2013). Anti-inflammatoires non stéroïdiens et vaisseaux. *Revue du rhumatisme*, 80(3), 204-208.
366. Strack, D. (1997). Phenolic Metabolism. *Plant biochemistry*, 387. In Dey, P.M., Harborne, J.B. (1997). *Plant Biochemistry*. London : Academic Press, 388-92.
367. Syad, A. N., & Devi, K. P. (2014). Botanic : a potential source of new therapies for Alzheimer's disease. *Botanics*, 4, 11-16.
368. Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
369. Tachakittirungrod, S., Ikegami, F., & Okonogi, S. (2007). Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand. *Scientia pharmaceutica*, 75(4), 179-193.
370. Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S. I., Yamano, K., Kamiya, M., Shiota, T., & Endo, T. (2013). Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell metabolism*, 17(5), 709-718.
371. Taniguchi, M., Kataoka, T., Suzuki, H., Uramoto, M., Ando, M., Arao, K., Magae, J., Nishimura, T., Otake, N., & Nagai, K. (1995). Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(11), 2064-2067.
372. Tatefuji, T., Yanagihara, M., Fukushima, S., & Hashimoto, K. (2014). Safety assessment of melinjo (*Gnetum gnemon L.*) seed extract : acute and subchronic toxicity studies. *Food and chemical toxicology*, 67, 230-235.
373. Teugwa, C. M., Mejiato, P. C., Zofou, D., Tchinda, B. T., & Boyom, F. F. (2013). Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants : *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 175.
374. Thapa, B. R., & Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *The Indian Journal of Pediatrics*, 74(7), 663-671.
375. Thavamoney, N., Sivanadian, L., Tee, L. H., Khoo, H. E., Prasad, K. N., & Kong, K. W. (2018). Extraction and recovery of phytochemical components and antioxidative properties in fruit parts of *Dacryodes rostrata* influenced by different solvents. *Journal of food science and technology*, 55(7), 2523-2532.

376. Thiesen, L. C., de Oliveira Nunes, M. L., Meyre-Silva, C., Pastor, V. D., de Andrade, S. F., Couto, A. G., ... & Santin, J. R. (2018). The hydroethanolic Litchi chinensis leaf extract alleviate hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl4) through inhibition of hepatic inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 929-936.
377. Tir, M., Feriani, A., Labidi, A., Mufti, A., Saadaoui, E., Nasri, N., ... & Tlili, N. (2019). Protective effects of phytochemicals of *Capparis spinosa* seeds with cisplatin and CCl4 toxicity in mice. *Food bioscience*, 28, 42-48.
378. Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.
379. Trease, E., & Evans, W. C. (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. *London*, 13, 28. In Karumi, Y., Onyeyili, P.A., & Ogugduaja, V.O. (2004). Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume de la pomme). *Journal of Medicine and scientific*, 4(3), 179-182.
380. Trevan, J. W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 101(712), 483-514.
381. Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation : an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annual review of immunology*, 30, 677-706.
382. Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of food quality*, 2019.
383. Ul-Haq, Z., Khan, W., Kalsoom, S., & Ansari, F. L. (2010). In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2, 3-dihydro-1, 5-benzothiazepine against BChE in the formation of β -amyloid plaques associated with Alzheimer's disease. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 7(1), 22.
384. Unies, N. (2011). *Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)*. 4ème Edition. Annabel MAISON. Nation Unies, New York et Genève.
385. Usher, G. (1966). *Dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics*. London : Constable and Company Ltd. ISBN 0094504903.
386. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
387. Véla, E., & Benhouhou, S. (2007). Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes rendus biologies*, 330(8), 589-605.
388. Vendruscolo, G. S., & Mentz, A. (2006). Ethnobotanical survey of the medicinal plants used by the community of Ponta Grossa neighborhood, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iherigia Série Botânica*, 61, 83-103.
389. Verheugen, G. (2006). *Recommandation de la commission du 22 septembre 2006 relative aux produits de protection solaire et aux allégations des fabricants quant à leur efficacité*. Bruxelles : commission des communautés européennes.
390. Verma, A. M., Kumar, A., Kavitha, D., & Anurag, K. B. (2011). Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in-vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), 1-6.
391. Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Ed. Netherlands, SPRINGER, 1-70.

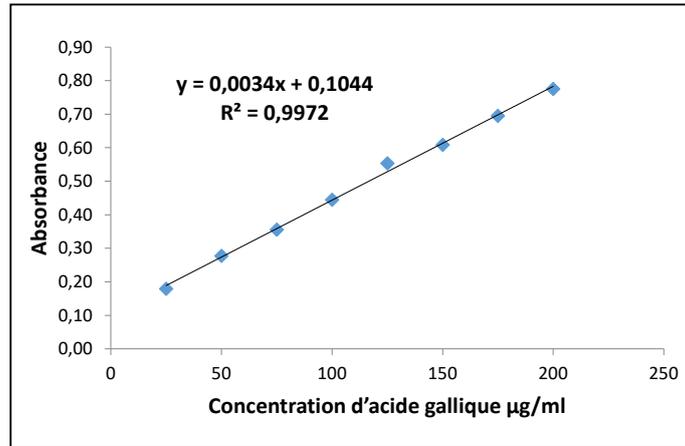
392. Vieira, B. S., & Barreto, R. W. (2006). First record of *Bremia lactucae* infecting *Sonchus oleraceus* and *Sonchus asper* in Brazil and its infectivity to lettuce. *Journal of Phytopathology*, 154(2), 84-87.
393. Viladomiu, M., Hontecillas, R., & Bassaganya-Riera, J. (2016). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, 785, 87-95.
394. Vilela, F. C., Bitencourt, A. D., Cabral, L. D., Franqui, L. S., Soncini, R., & Giusti-Paiva, A. (2010). Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 127(3), 737-741.
395. Vilela, F. C., de Mesquita Padilha, M., dos Santos-e-Silva, L., Alves-da-Silva, G., & Giusti-Paiva, A. (2009a). Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 124(2), 306-310.
396. Vilela, F. C., Soncini, R., & Giusti-Paiva, A. (2009b). Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 124(2), 325-327.
397. Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & metabolism*, 12(1), 60.
398. Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R., ... & Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 359-363.
399. Visioli, F., Borsani, L., & Galli, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease : the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*, 47(3), 419-425.
400. Waibel, J. S., Mi, Q. S., Ozog, D., Qu, L., Zhou, L., Rudnick, A., ... & Mordon, S. (2016). Laser-assisted delivery of vitamin C, vitamin E, and ferulic acid formula serum decreases fractional laser postoperative recovery by increased beta fibroblast growth factor expression. *Lasers in surgery and medicine*, 48(3), 238-244.
401. Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. *Environmental health perspectives*, 106(suppl 2), 497-503.
402. Wang, H. M. D., Fu, L., Cheng, C. C., Gao, R., Lin, M. Y., Su, H. L., & Hsieh, L. P. (2019). Inhibition of LPS-Induced oxidative damages and potential anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* extract via down-regulating NF- κ B, COX-2, and iNOS in RAW 264.7 Cells. *Antioxidants*, 8(8), 270.
403. Wang, L., Xu, M. L., Liu, J., Wang, Y., Hu, J. H., & Wang, M. H. (2015). *Sonchus asper* extract inhibits LPS-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in RAW264. 7 macrophages. *Nutrition Research and Practice*, 9(6), 579-585.
404. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J., Huang, T. C., & Ho, C. T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4869-4873.
405. Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-23.
406. Wang, Y., Kong, D., Wang, X., Dong, X., Tao, Y., & Gong, H. (2015). Molecular mechanisms of luteolin induced growth inhibition and apoptosis of human osteosarcoma cells. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 14(2), 531-538.
407. Waşık, A., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. *Pharmacological Reports*, 69(5), 851-860.

408. Weber, M., Dindo, D., Demartines, N., Ambühl, P. M., & Clavien, P. A. (2002). Kidney transplantation from donors without a heartbeat. *New England Journal of Medicine*, 347(4), 248-255.
- Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37(3), 208-222.
409. Weill, B., & Batteux, F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur, (Paris) ; 12-23.
410. Wertz, P. W., Miethke, M. C., Long, S. A., Strauss, J. S., & Downing, D. T. (1985). The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *Journal of investigative dermatology*, 84(5), 410-412.
411. Widyarini, K. D., Sukandar, E. Y., & Fidrianny, I. R. D. A. (2015). Xanthine oxidase inhibitory and antihyperuricemic activities of *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis, *Sonchus arvensis* L. and its combination. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7(3), 87-90.
412. Widyarini, K.D., Sukandar, E. Y., & Fidrianny, I. R. D. A. (2015). Xanthine oxidase inhibitory and antihyperuricemic activities of *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis, *Sonchus arvensis* L. and its combination. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7(3), 87-90.
413. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
414. Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
415. Wu, H., Zhang, X., Li, X., Wu, Y., & Pei, F. (2005). Acute biochemical effects of La (NO₃)₃ on liver and kidney tissues by magic-angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition. *Analytical biochemistry*, 339(2), 242-248.
416. Xia, D. Z., Yu, X. F., Zhu, Z. Y., & Zou, Z. D. (2011). Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus spp.*) in China. *Natural product research*, 25(20), 1893-1901.
417. Xia, Z., Qu, W., Lu, H., Fu, J., Ren, Y., & Liang, J. (2010). Sesquiterpene lactones from *Sonchus arvensis* L. and their antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Fitoterapia*, 81(5), 424-428.
418. Xu, F., Huang, X., Wu, H., & Wang, X. (2018). Beneficial health effects of lupenone triterpene : A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 198-203.
419. Xu, Y. J., Sun, S. B., Sun, L. M., Qiu, D. F., Liu, X. J., Jiang, Z. B., & Yuan, C. S. (2008). Quinic acid esters and sesquiterpenes from *Sonchus arvensis*. *Food chemistry*, 111(1), 92-97.
420. Xu, Y., & Liang, J. Y. (2005). Chemical constituents of *Sonchus oleraceus* L. *Journal of China Pharmaceutical University*, 5, 7.
421. Yam, M. F., Ang, L. F., Ameer, O. Z., Salman, I. M., Aziz, H. A., & Asmawi, M. Z. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Elephantopus tomentosus* ethanolic extract. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 2(4), 280-287.
422. Yan, F., Wang, H., Gao, Y., Xu, J., & Zheng, W. (2017). Artemisinin protects retinal neuronal cells against oxidative stress and restores rat retinal physiological function from light exposed damage. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(8), 1713-1723.
423. Yasmeen, S., & Gupta, P. (2016). In vitro demonstration of *Dalbergia sissoo* (Indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for sunscreens and DNA nick prevention. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, 8(6), 175-181.
424. Yin, J., Kwon, G. J., & Wang, M. H. (2007). The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. *Nutrition research and Practice*, 1(3), 189-194.

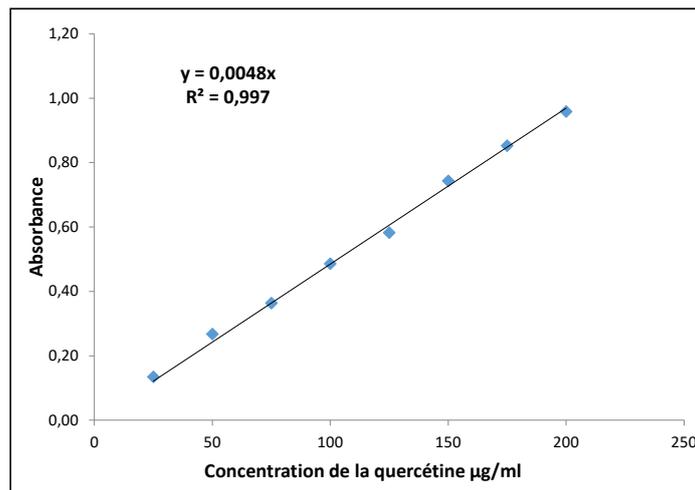
425. Yokoe, I., Azuma, K., Hata, K., Mukaiyama, T., Goto, T., Tsuka, T., ... & Okamoto, Y. (2015). Clinical systemic lupeol administration for canine oral malignant melanoma. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(1), 89-92.
426. Yoshioka, H., Mabry, T. J., & Timmermann, B. N. (1973). *Sesquiterpene lactones ; chemistry, NMR and plant distribution*. University of Tokyo Press.
427. Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 C. *Meat science*, 81(4), 686-692.
428. Zhang, S., Won, Y. K., Ong, C. N., & Shen, H. M. (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones : bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(3), 239-249.
429. Zhang, Z. X., Xie, W. D., Li, P. L., Shi, Y. P., & Jia, Z. J. (2006). Sesquiterpenoids and phenylpropane derivatives from *Sonchus uliginosus*. *Helvetica chimica acta*, 89(12), 2927-2933.
430. Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.
431. Zhou, R., & Li, S. (2009). *In vitro* antioxidant analysis and characterisation of antler velvet extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1321-1327.
432. Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.
433. Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients*, 9(9), 970-977.

Annexes

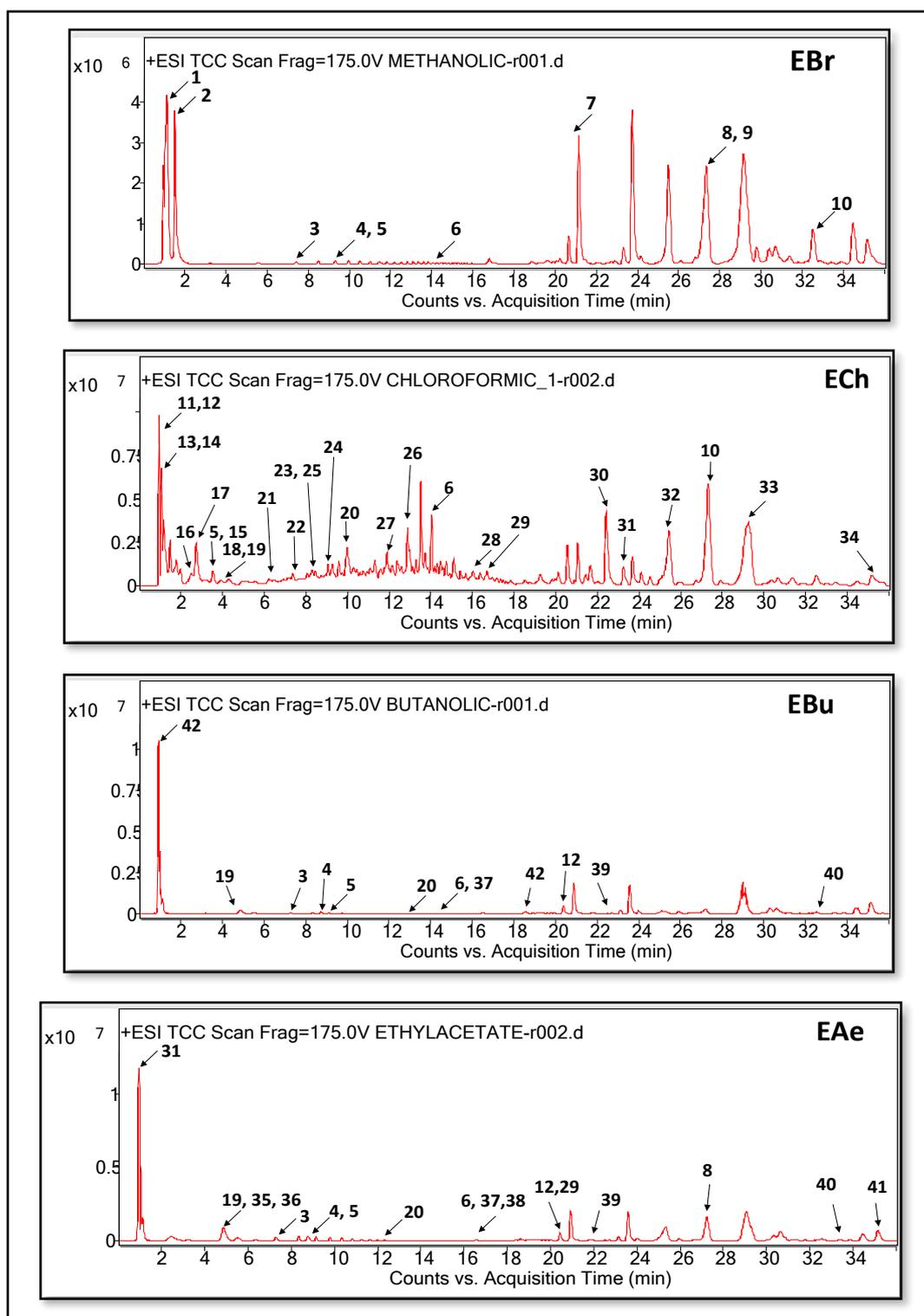
Annexes



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.



Annexe 3 : Profils des chromatogrammes dans le mode positif des extraits de la partie aérienne de *S. oleraceus* L. obtenus par LC-MS/QTOF. Les conditions expérimentales sont décrites sous 3.2.2.

EBr : extrait brut ; ECh : extrait chloroformique ; EAe : extrait acétate d'éthyle ; EBu : extrait butanolique. Numérotation des composés selon Tableau 13.

Annexe 4 : Composés identifiés par LC-MS/QTOF des quatre extraits de *Sonchus oleraceus L.*

Extraits	N°	TR	[M-H] ⁺	Masse	Composés identifiés	Formules
	Pic	(min)	(m/z)		Nom de la molécule	moléculaires
EBr	1	1.070	204.0669	203.0606	Acide quininique	C ₁₁ H ₉ NO ₃
	2	1.187	379.0409	340.0744	Esculine	C ₁₅ H ₁₆ O ₉
	3	7.417	321.1326	298.1437	3-(acétyl-oxy)-1-méthoxy-1-(3,4,5-triméthoxyphényl) propane	C ₁₅ H ₂₂ O ₆
	4	9.308	409.1837	386.1952	Corchoionoside C	C ₁₉ H ₃₀ O ₈
	5	9.962	453.2086	430.2201	Sonchuside H	C ₂₁ H ₃₄ O ₉
	6	14.440	197.1164	196.1098	Loliolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
	7	21.990	255.1353	232.1458	Melampolide, costunolide,	C ₁₅ H ₂₀ O ₂
	8	27.270	481.1455	442.1804	15-O-β-D-glucopyranosyl-11β,13-dihydro urospermal A,	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀
	9	27.335	287.1265	264.1372	Tanacetin	C ₁₅ H ₂₀ O ₄
	10	33.047	463.1354	424.1691	Macrocliniside A	C ₂₁ H ₂₈ O ₉
ECh	11	0,971	281,1208	560,2104	1 β-O- β-D-Glucopyranosyl-15-O-(p-hydroxyphénylacétyl)-5α,6βH-eudesma-3,11 (13)-dien-12,6 α-olide	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₁
	12	0,973	291,1552	268,1651	15-Hydroxy-4β, 15,11 β, 13-tétrahydroreynosine	C ₁₅ H ₂₄ O ₄
	13	1,502	263,1296	262,1222	jacquenelin	C ₁₅ H ₁₈ O ₄
	14	1,509	401,1999	400,194	1β -Hydroxy-15-O-(p-hydroxyphénylacétyl)-5α,6βH-eudesma-3-en-12,6α-olide ;	C ₂₃ H ₂₈ O ₆
	15	3,868	305,1337	282,1447	Artémisinine	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
	16	2,758	247,1328	246,1255	Tubérférine	C ₁₅ H ₁₈ O ₃
	17	2,974	435,1974	412,211	Sonchuside A	C ₂₁ H ₃₂ O ₈
	5	3,337	453,2062	430,2136	Sonchuside H	C ₂₁ H ₃₄ O ₉
	18	4,222	273,1451	250,1559	Dihydrosantamarine (11 alpha,13-Dihydrosantamarine)	C ₁₅ H ₂₂ O ₃

				Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅
19	4,996	171,0286	170,0209	Catéchol	C ₆ H ₆ O ₂
20	10,547	111,0444	110,0372	Acide syringique	C ₉ H ₁₀ O ₅
21	6,519	199,0597	198,0531	1 β-O- β-D-Glucopyranosyl-(6'-O-	
22	7,436	717,2553	694,265	p-hydroxyphénylacétyl)-15-O-(p-	C ₃₇ H ₄₂ O ₁₃
				hydroxyphénylacétyl)-5α,6βH-	
				eudesma-3,11 (13)-dien-12,6 α-	
				olide	
				Acide vanillique	C ₈ H ₈ O ₄
23	8,111	169,0493	168,0416	Lupéol	C ₂₅ H ₂₆ O ₄
24	9,648	413,1715	390,1837	1β -O- β-D-Glucopyranosyl-(6'-O-	
25	8,445	355,1465	708,276	p-méthoxyphénylacétyl)-15-O(p-	C ₃₈ H ₄₄ O ₁₃
				hydroxyphénylacétyl)-5α,6βH	
				eudesma-3,11(13)-dien-12,6α-olide	
				(1β,3β,25R)-3-Hydroxyspirost-5-	
				en-1-yl β-D-glucopyranosyl-(1-2)-	
26	13,128	436,2396	870,4555	[β-D-xylopyranosyl-(1-3)]-6-	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₇
				désoxy-β-D-galactopyranoside	
				Célastrol	
				Loliolid	C ₂₉ H ₃₈ O ₄
27	12,459	489,244	450,2772	Acide 2-(3,4-dihydroxyphényl)-5-	
6	14,361	197,1173	196,1085	hydroxy-4-oxo-4H-chromène-7-yl	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
				β-D-glucopyranosiduronique	
28	15,958	501,0438	462,0799	3-hydroxy-1-méthoxyl-(3,4,5-	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
				triméthoxyphényl)propane	
				Scopolétine	
29	17,827	257,1383	256,1319	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2- {[2-	C ₁₃ H ₂₀ O ₅
30	18,183	193,0509	192,0436	(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-	C ₁₀ H ₈ O ₄
31	22,658	595,1459	594,1371	dihydroxy-3,4-dihydro-2H-	
				chromen-3-yl]oxy}-3,4,5,7-	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
				chromanetetrol.	
				(1β,6α)-1,6,14-trihydroxyeudesm-	
				3-en-12-oic acid γ-lactone	
32	25,915	267,1607	266,1536	Macrocliniside A	C ₁₅ H ₂₂ O ₄
10	26,893	425,1783	424,1711	Hexadecanoic methyl ester	
				(Palmitate de méthyle)	C ₂₁ H ₂₈ O ₉
				9-Octadecenoic acid ethyl ester	

		31,249	309,2195	270,2566		C ₁₇ H ₃₄ O ₂
	33					C ₂₀ H ₃₈ O ₂
		35,313	311,2942	310,2831		
	34					
EAc	31	0.976	298.0736	594.1421	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-[[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl]oxy]-3,4,5,7-chromanetetrol	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
	19	4.866	171.0285	170.0211	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅
	35	4.869	463.0905	462.0853	Luteolin 7- β -D-glucosiduronic acid	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
	36	4.880	263.0335	224.0701	Acide sinapinique	C ₁₁ H ₁₂ O ₅
	3	7.300	321.1313	298.1416	3-(acetyl-oxy)-1-methoxy-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propane	C ₁₅ H ₂₂ O ₆
	4	9.153	409.1833	386.1938	Corchoionoside C	C ₁₉ H ₃₀ O ₈
	5	9.801	453.2114	430.2211	Sonchuside H	C ₂₁ H ₃₄ O ₉
	20	13.712	111.0449	110.0373	Catéchol	C ₆ H ₆ O ₂
	6	14.240	197.1172	196.1106	Loliolid	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
	37	14.942	461.1049	460.1012	apigenin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
	38	16.797	271.0581	270.0493	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
	12	20.148	269.1751	268.1665	15-Hydroxy-4β,15,11β,13-tetrahydroreynosin	C ₁₅ H ₂₄ O ₄
	29	20.361	265.105	242.1169	3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-methoxypropane	C ₁₂ H ₁₈ O ₅
	39	22.471	183.0872	182.0786	D-(-)-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆
	8	27.145	443.1882	442.1798	15-O- β-D-glucopyranosyl-11 β,13-dihydro urospermal A	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀
	40	33.642	309.2771	308.2723	Linoléate d'éthyle	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
	41	35.045	365.1097	728.211	Quinic acid	C ₃₉ H ₃₆ O ₁₄

EBu	42	0.859	177.042	176.036	Acide ascorbique (vitamine C)	C ₆ H ₈ O ₆
	19	4.863	171.0284	170.0205	Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅
	3	7.281	321.1328	298.1439	3-(acetyl-oxy)-1-methoxy-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propane	C ₁₅ H ₂₂ O ₆
	4	9.119	409.1826	386.1923	Corchoionoside C	C ₁₉ H ₃₀ O ₈
	5	9.755	453.2067	430.2179	Sonchuside H	C ₂₁ H ₃₄ O ₉
	20	13.652	111.0448	110.0376	Catéchol	C ₆ H ₆ O ₂
	6	14.163	197.1177	196.1109	Loliolid	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
	37	14.899	461.1084	460.1016	Apigenin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
	42	18.544	261.0517	238.0632	3-hydroxyflavone	C ₁₅ H ₁₀ O ₃
	12	20.044	269.1771	268.1698	15-Hydroxy-4β, 15,11 β, 13-tetrahydroreynosin	C ₁₅ H ₂₄ O ₄
	39	22.408	183.0867	182.078	D-(-)-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆
	40	33.645	309.2801	308.2751	Ethyl linoleate	C ₂₀ H ₃₆ O ₂

TR(temps de rétention) ; M-H⁺ (m/z): spectre de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits ; EBr: extrait brut ; ECh : extrait chloroformique ; EAe: extrait acétate d'éthyle ; EBu : extrait butanolique.

Annexe 5 : Pourcentages d'inhibition de l'activité d'acétylcholinestérase des extraits de *Sonchus oleraceus* L.

Extraits	% d'inhibition de l'activité d'acétylcholinestérase
EBr	27.07 ± 1.86^c
ECh	39.62 ± 13.79^{bc}
E Ae	48.51 ± 4.43^{bc}
EBu	69.71 ± 4.62^{abc}
EPa	66.60 ± 1.64^{abc}
EAM	139.38 ± 4.27^a
EAD	79.34 ± 1.001^{abc}
EE	76.62 ± 3.43^{abc}
EAT	109.49 ± 2.32^{ab}
Gal*	6.27 ± 1.15^c

Les valeurs ont été exprimées en moyenne±SD de triplicats biologiques.

*Gal : Galantamine, composé utilisé comme témoin positif. ^{a-c}: les résultats avec différentes lettres sont significativement différents.

Annexe 6 : Les valeurs du facteur de protection solaire (FPS).

	EBr	ECh	E Ae	EBu	EPa	EAM	EAD	EE	EAT
FPS	34,02±2 ,55 ^{ab}	19,09±0 ,28 ^d	37,55±0 ,64 ^{ab}	39,99± 1,08 ^a	30,34±0 ,22 ^{bc}	22,69 ±0,57 ^{cd}	22,79 ±0,96 ^{cd}	31,90±0 ,36 ^{abc}	31,63± 0,22 ^{abc}

Le test statistique utilisé est l'ANOVA suivi de Post Hoc : Tukey, $p < 0,0001$

ملخص

إن الهدف الرئيسي من هذا العمل هو الدراسة الكيمائية النباتية والبيولوجية والسمية لمختلف المستخلصات من الأجزاء الهوائية لنبات جزائري من منطقة قالمة: *Sonchus oleraceus* L. (Asteraceae) والتي تستخدم في الطب التقليدي.

سمح التحليل النوعي بواسطة LC-MS / QTOF للمستخلصات الخام 'EBr': الكلوروفورميك "ECh"، و إيثيل الأسيتات "EAe" و بيوتانوليك "EBu" بتحديد 44 مركبًا، معظمها مركبات فينولية ومركبات الفلافونويد، lactones و sesquiterpéniques ومشتقات فينيل بروبانويد. تم الانتهاء من التحليل الكمي عن طريق قياس المحتوى الكلي للبوليفينول والفلافونويد والفلافونول في المستخلصات المختلفة. حيث احتوت كل من EAe و EBU على أعلى تركيز من هذه المركبات.

أظهرت الاختبارات: DPPH• و galvinoxyl و ABTS•+ و phenanthroline و CUPRAC أن مستخلصات EAe و EBU لها نشاط مضاد للأوكسدة عالي وهذا نظرًا لاحتوائهما على نسبة عالية من المركبات الفينولية والفلافونويد والفلافونول. كما أظهر اختبار التبييض بـ β -carotène/acide linoléique أن مستخلص المرحلة المائية (Epa) يحتوي على أعلى نشاط بيروكسيد مضاد للدهون. كما تتميز مستخلصات EAe و EBU بفاعلية مضادة للجراثيم أفضل ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 و *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Klebsiella pneumoniae*، في حين كانت مستخلصات الالتهاب الرئوي K أكثر مقاومة لمستخلص الكلوروفورم. كما أظهر النشاط المضاد للتحوّل الطبيعي لألبومين مصل الأبقار في المختبر أن مستخلصات EAe و EBU تتمتع بقوة تثبيط عالية تبلغ 91.69% و 90.32%. وهي قريبة من معيار diclofénac (98.50% عند 1000 ميكروغرام / مل).

بالإضافة إلى ذلك، أظهر مستخلص EBr التأثير المثبط الأكثر فاعلية ضد acétylcholinestérase مع IC50 من 27.07 ميكروغرام / مل بواسطة طريقة Ellman's. كما تم قياس تأثير الحماية الجلدية في المختبر عن طريق تحديد عامل الحماية من الشمس (FPS)، حيث أشارت النتائج: EBr (FPS : 39.99)، EAe (FPS : 37.55)، EBU (FPS : 34.02) إلى نشاط ضوئي أعلى. أظهر مستخلص "Epa" ضعف في النشاط السام للخلايا ضد خط الخلايا السرطانية للبلعجات الفئران (J774.A1) بتركيز مثبط IC50 يبلغ 51.62 ميكرومتر عن طريق اختبار MTT. لم تكشف بياناتنا عن تأثير سام للخلايا كبير للمستخلصات المتبقية بتركيزات مختلفة.

سمحت الدراسة السمية الحادة لدى إناث الفئران بحساب قيم الجرعة المميّنة النصفية DL 50 من المستخلصين الأكثر نشاطًا. وفقًا لبروتوكول Lorke، فإن الجرعة المميّنة DL 50 للمستخلصين EBr و EAe كانت أكبر من 5 غ / كغ من وزن الجسم، لذا تعتبر غير سامة. أما عن تأثير السمية تحت حادة (28 يوم) فكان بأخذ المستخلصين عن طريق الفم بجرعات (250 - 2000 ملغ / كغ)، حيث تسبب مستخلص EBr في حدوث اضطراب في LDL ووظيفة الكبد-الكلوية بما في ذلك البيليروبين غير المباشر. بينما تسبب مستخلص EAe في اضطرابات في الدهون والكبد والكلية، خاصة في مستوى الكوليسترول، ALAT، اليوريا، الكرياتينين والبروتينات الكلية. بالإضافة إلى ذلك، هناك تغييرات مهمة في معايير الدم واضطرابا قويا العوامل المحسوبة بما في ذلك GR و Hb و MCV و MCH و CCMH و GB و Neu و Lym و Eos و Mono و Baso و PLT. ومع ذلك، تشير هذه التغييرات إلى أن EBr و EAe من المحتمل أن يكونا سامين لنظام الدم. حيث سجلت الملاحظة النسيجية احتقان في الأوعية الدموية الكبدية، والتهاب الكلى واحتقان النزيف، والتتسكس النزفي للرنيتين حتى الجرعة القصوى 2000 ملغ/كغ من وزن الجسم. تؤكد جميع البيانات البيوكيميائية والدموية والنسيجية التأثير السمي لنبات *Sonchus oleraceus* L.

الكلمات المفتاحية: *Sonchus oleraceus* L.، Asteraceae، LC-MS / QTOF، البوليفينول الكلي، مضادات الأوكسدة، مضاد للبكتيريا، مضاد للالتهابات، السمية الخلوية، Anticholinesterase، FPS، السمية الحادة، LD50.

Abstract

The main objective of this work is the phytochemical, biological and toxicological study of the different extracts of the aerial parts of an Algerian plant from the region of Guelma : *Sonchus oleraceus L. (Asteraceae)* used in traditional medicine.

Qualitative analysis by LC-MS/QTOF of the crude 'EBr', chloroformic 'ECh', ethyl acetate 'EAe' and butanolic 'EBu' extracts allowed the identification of 44 compounds in these extracts of which mainly were phenolic compounds, flavonoids, sesquiterpene lactones and phenylpropanoid derivatives. Quantitative analysis was completed by measuring the total polyphenol, flavonoid and flavonol content of the different extracts. EAe and EBu contained the highest concentration of these compounds.

Extracts EAe and EBu also exhibited the highest antioxidant activity in the assays : DPPH•, galvinoxyl, ABTS^{•+}, phenanthroline and CUPRAC due to their high contents of phenolic compounds, flavonoids and flavonols. The aqueous phase extract (EPa) has the highest lipid anti-peroxidation activity in the β -carotene/linoleic acid bleaching test. EAe and EBu extracts have better antibacterial activity against *Staphylococcus aureus ATCC 35556*, *Escherichia coli ATCC 25922* and *Klebsiella pneumoniae*, while the *K.pneumoniae* strain was more resistant to the chloroform extract. The anti-denaturation activity of bovine serum albumin *in-vitro* showed that EAe and EBu extracts have a high inhibition power of 91.69% and 90.32% ; which are close to that of diclofenac standard (98.50% at 1000 μ g/mL).

In addition, EBr extract showed the strongest inhibitory effect against acetylcholinesterase with an IC₅₀ of 27.07 μ g/mL by Ellman's method. The dermatoprotective effect was measured *in vitro* by determining the sun protection factor (SPF). The results indicate that EBu (SPF: 39.99), EAe (SPF: 37.55) and EBr (SPF: 34.02) showed the highest photoprotective activity. The 'EPa' extract showed weak cytotoxic activity against murine macrophage cancer cell line (J774.A1) with an inhibitory concentration of IC₅₀ of 51.62 μ M by MTT assay. Our data did not reveal any significant cytotoxic effect for the remaining extracts at different concentrations.

The acute toxicity study in female mice allowed the calculation of LD₅₀ values of the two most active extracts. According to Lorke's protocol, the LD₅₀ of the EBr and EAe extracts was greater than 5 g/kg bw, therefore it is considered non-toxic. Subacute toxicity (28 days) was performed by oral route of both extracts with the doses (250-2000mg/kg). The EBr extract caused a disturbance of LDL and hepato-renal function especially indirect bilirubin. While the EAe extract, caused lipid and hepato-renal disorders, especially cholesterol, ALAT, urea, creatinine and total protein. In addition, there were significant changes in haematological parameters and a strong disturbance in calculated parameters including RBC, Hb, MCV, MCH, MCHC, WBC, Neu, Lym, Eos, Mono, Baso and PLT. However, these changes suggest that EBr and EAe are probably toxic to the bloodstream. Histological observation recorded hepatic vascular congestion, renal nephritis and hemorrhagic congestion, and hemorrhagic degeneration of the lungs up to the maximum dose of 2000 mg/kg b.w. All the biochemical, haematological and histological data confirm the toxic effect of the plant *Sonchus oleraceus L.*

Keywords : *Sonchus oleraceus L.*, *Asteraceae*, LC-MS/QTOF, total polyphenols, Antioxidant, Antibacterial, Anti-inflammatory, Cytotoxicity, Anticholinesterase, SPF, Acute toxicity, LD₅₀.

Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude phytochimique, biologique et toxicologique des différents extraits des parties aériennes d'une plante Algérienne de la région de Guelma : *Sonchus oleraceus* L. (Asteraceae) utilisée en médecine traditionnelle.

L'analyse qualitative par LC-MS/QTOF des extraits brut 'EBr', chloroformique 'ECh', acétate d'éthyle 'EAe' et butanolique 'EBu' a permis d'identifier 44 composés dans ces extraits dont principalement étaient des composés phénoliques, des flavonoïdes, des lactones sesquiterpéniques et des dérivés phénylpropanoïdes. L'analyse quantitative a été achevée en mesurant le contenu en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux des différents extraits. L'EAe et l'EBu contenaient la plus grande concentration en ces composés.

Les extraits EAe et EBU ont présenté également la plus forte activité antioxydante dans les tests : DPPH•, galvinoxyle, ABTS^{•+}, phénanthroline et CUPRAC en raison de leurs teneurs élevées en composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols. L'extrait de la phase aqueuse (EPa) a la plus forte activité d'anti-péroxydation lipidique dans le test de blanchiment de β -carotène/acide linoléique. Les extraits EAe et EBU possèdent une meilleure activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 35556, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae*, alors que la souche *K.pneumoniae* était plus résistante à l'extrait chloroformique. L'activité anti-dénaturation de l'albumine sérique bovine *in-vitro* a montré que les extraits EAe et EBU sont dotés d'un pouvoir d'inhibition élevé de 91.69% et de 90.32% ; qui sont proche de celui du standard diclofénac (98.50% à 1000 μ g/mL).

En outre, l'extrait EBr a montré l'effet inhibiteur le plus puissant contre l'acétylcholinestérase avec une CI_{50} de 27.07 μ g/mL par la méthode d'Ellman. L'effet dermato-protecteur a été mesuré *in vitro* en déterminant le facteur de protection solaire (FPS). Les résultats indiquent que l'EBU (FPS : 39.99), EAe (FPS : 37.55) et EBr (FPS : 34.02) ont révélé une activité photoprotectrice la plus élevée. L'extrait 'EPa' a montré une activité cytotoxique faible contre la lignée cellulaire cancéreuse de macrophage de murin (J774.A1) avec une concentration inhibitrice d' CI_{50} de 51.62 μ M par le test de MTT. Nos données n'ont pas révélé d'effet cytotoxique significatif pour les extraits restants à des concentrations différentes.

L'étude de la toxicité aiguë chez les souris femelles a permis de calculer les valeurs de la DL50 des deux extraits les plus actifs. Selon le protocole de Lorke, la DL50 des extraits EBr et EAe était supérieur à 5 g/kg p.c, donc elle est considérée comme non toxique. La toxicité subaiguë (28 jours) a été effectuée par voie orale des deux extraits avec les doses (250-2000mg/kg). L'extrait EBr a entraîné une perturbation de LDL et de la fonction hépato-rénale notamment la bilirubine indirecte. Tandis que l'extrait EAe, a provoqué des troubles lipidiques et hépato-rénales, notamment au niveau de cholestérol, d'ALAT, d'urée, de créatinine et des protéines totales. En outre, les paramètres hématologiques ont connus des changements significatifs et une forte perturbation des paramètres calculés, y compris GR, Hb, MCV, MCH, CCMH, GB, Neu, Lym, Eos, Mono, Baso et PLT. Toutefois, ces changements suggèrent que l'EBr et l'EAe sont probablement toxique pour le système sanguin. L'observation histologique a enregistré une congestion vasculaire hépatique, une néphrite et congestion hémorragique rénal, et une dégénérescence hémorragique des poumons jusqu'à la dose maximale de 2000 mg/kg p.c. L'ensemble des données biochimiques, hématologiques et histologiques confirme l'effet toxique de la plante *Sonchus oleraceus* L.

Mots-clés : *Sonchus oleraceus* L., Asteraceae, LC-MS/QTOF, polyphénols totaux, Antioxydant, Antibactérien, Anti-inflammatoire, Cytotoxicité, Anticholinestérase, SPF, Toxicité aiguë, DL₅₀.

