



Royaume du Maroc  
Université Mohammed V-Rabat  
Faculté de Médecine et de Pharmacie



Année : 2021

Thèse N° : 30/21/CSVS

CENTRE DES ETUDES DOCTORALES DES SCIENCES  
DE LA VIE ET DE LA SANTE

Formation doctorale : Biologie médicale, Pathologie humaine et Expérimentale et  
Environnement

Thèse de doctorat

---

**Étude phytochimique et toxicologique et évaluation de l'activité  
antioxydante, antidiabétique et antibactérienne des racines  
d'*Aristolochia longa* L.**

---

Présentée et soutenue publiquement le : 11/02/2022

Par : **Nasreddine EL OMARI**

**MEMBRES DE JURY**

**Pr. Souad ABOUDRAR**

*Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat*

**Présidente**

**Pr. Omar CHOKAIRI**

*Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat*

**Directeur**

**Pr. Malika BARKIYOU**

*Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat*

**Co-directrice**

**Pr. Khalid TAGHZOUTI**

*Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat*

**Rapporteur**

**Pr. Abdelmajid SKALLI**

*École Nationale Supérieure d'Arts et Métiers, Université Mohammed V de Rabat*

**Rapporteur**

**Pr. Nouredine EL AOUAD**

*Faculté Polydisciplinaire Larache, Université Abdelmalek Essaadi de Tétouan*

**Rapporteur**

**Pr. Taoufik HARMOUCH**

*Faculté de Médecine, de Pharmacie et de Médecine Dentaire, Université Sidi Mohamed Ben  
Abdellah de Fés*

**Examineur**

## *Dédicace*

*Je dédie cette thèse,*

*À mes chers parents, Hassan El Omari & Ftimou Erroudi, Pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour votre confiance permanente. Pour tous les sacrifices et les encouragements que vous avez consentis pour moi, J'en suis conscient et très reconnaissant. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de vos attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous vos efforts. Que Dieu vous garde.*

*A mes frères Othman et Abdessamad, En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde gratitude, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite. Que tous vos rêves soient exaucés.*

*En mémoire de mes grands-mères Mbarka & Fatna, Vous êtes toujours présentes dans nos esprits. Vous nous manquez tellement ce jour-là. Aucune dédicace ne peut traduire notre amour profond et notre gratitude pour tout l'amour et l'affection que vous nous avez offerts. Que le paradis soit votre demeure céleste.*

*À la grande famille El Omari,*

*À mes amis et collègues, particulièrement Abdelaali Balahbib, Abdelhakim Bouyahya, Soufiane Boutahli, Youness El Hakour, Adil Khay, Jad Eddib, Khalid Bentaleb, Chmiti Mohammed, et à tous ceux qui me sont chers.*

*À toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail, que j'ai involontairement omis de citer.*

## Remerciements

Ce travail n'aurait pu avoir lieu sans la contribution de nombreuses personnes. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en remerciant tous ceux qui m'ont aidé à mener à bien ce travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements au Professeur et cher Maître **Omar Chokairi**, Chef du Service d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire de recherche. Sous sa direction, j'ai beaucoup appris et acquis une solide expertise dans de nombreux domaines. Je lui suis également très reconnaissant pour sa grande contribution en facilitant toutes les étapes de ma formation, dans la réalisation de ce travail et pour m'avoir donné autant de liberté et de responsabilité au sein de son laboratoire. Monsieur, veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude, ma profonde reconnaissance et ma grande estime.

Mes profondes gratitudes vont également à Madame le Professeur **Malika Barkiyou**, du Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et co-directrice de ma thèse, pour toute son attention, sa disponibilité, sa gentillesse, son encadrement, ses encouragements continus, et sa générosité du cœur dont elle a fait preuve tout au long de mon cursus doctoral. J'espère Madame de tout mon cœur que cette thèse sera un remerciement suffisant pour le soutien et la confiance que vous m'avez témoignés.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur **Souad Abouddrar**, Directrice du Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance malgré ses multiples obligations. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je témoigne de ma gratitude à l'égard de Maître **Khalid Taghzouti**, Professeur du Laboratoire de Physiologie et Physiopathologie, du Centre de Recherche en Génomique des Pathologies Humaines, à la Faculté des Sciences de Rabat, qui a fait l'honneur d'examiner ce travail en qualité de rapporteur, ainsi que pour sa

contribution majeure à l'expérimentation animale de ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma très haute considération.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur **Noureddine El Aouad** de l'Equipe de Recherche de Génie Biologique, Agroalimentaire et Aquaculture, de la Faculté Polydisciplinaire de Larache, Université Abdelmalek Essaâdi, Tétouan, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère considération.

Je remercie chaleureusement le Professeur **Abdelmajid Skalli**, de l'École Nationale Supérieure d'Arts et Métiers de Rabat, d'avoir aimablement accepté d'examiner mon travail de thèse et aussi de faire partie du jury malgré tous ses engagements.

Je remercie profondément Monsieur **Taoufik Harmouch**, Professeur au Service de Pathologie, Hôpital Al Ghassani, CHU Hassan II de Fès, d'avoir accepté de siéger parmi le jury de cette thèse en qualité d'examineur. Je le prie de trouver ici l'expression de ma plus haute estime.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon cher ami **Abdelhakim Bouyahya**, Professeur au Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines, Département de Biologie à la Faculté des Sciences de Rabat, pour sa générosité, sa disponibilité et son orientation, ainsi que ses précieux conseils et son extrême expertise multidisciplinaire qui m'ont énormément aidé à accomplir et mener à bien ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour sa participation active à tous les travaux scientifiques de grande qualité que nous avons réalisés ensemble. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier profondément Monsieur le Professeur **Maâmar Yagoubi**, du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour son aide, ses précieux conseils et sa généreuse contribution à la réalisation des tests antibactériens et à l'acquisition des bases scientifiques théoriques et pratiques en microbiologie. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma gratitude.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Faouzi My El Abbes**, Professeur au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour son aide et son orientation dans l'élaboration de ce projet.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Abdennebi El Hassane**, Professeur au Laboratoire de Toxicologie/Pharmacie à l'institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, d'avoir accepté ma demande d'effectuer un stage au sein du laboratoire et d'obtenir les différents extraits végétaux étudiés dans ce travail.

Mes remerciements vont à Monsieur **Mohamed Oukessou**, Professeur au Département des Sciences Vétérinaires, Biologiques et Pharmaceutiques à l'institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat. Merci pour l'énorme contribution que vous m'avez apportée afin de mener à bien ce projet. Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Toute ma reconnaissance à tous les professeurs et le personnel du Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, en particulier le Professeur **Hadda Hajji**, le Professeur **Rajae Tahri** et le Professeur **Khalid Ben Kaddour** que j'ai eu l'honneur et le plaisir de côtoyer au cours des travaux pratiques et dirigés d'histologie et d'embryologie. Merci, chers professeurs, de me faire profiter de vos riches expériences en recherche scientifique et pour l'environnement de travail convivial et chaleureux que vous créez à chaque session.

Merci également à Monsieur **Mohamed El Fellahi**, du Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, avec qui j'ai trouvé un soutien fort et inconditionnel pour mener à bien la partie histologique de ce travail. Je vous remercie vivement pour votre confiance, vos conseils et l'amitié dont vous m'avez honoré. Puissiez-vous trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci à Monsieur **Mohamed Fennane**, Professeur au Département de Botanique et Écologie Végétale à l'Institut Scientifique de Rabat, pour son aide dans l'identification de l'espèce végétale étudiée dans ce travail.

Je remercie également mon cher ami **Omar El Blidi**, qui m'a beaucoup aidé avec ses grandes compétences et connaissances. Merci pour l'énorme contribution que tu m'as apporté pour la réalisation de ce travail et pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble pendant nos heures de manipulation.

Je ne peux pas oublier mon meilleur ami **Abdelaali Balahbib**, Docteur au Laboratoire de Biodiversité, Ecologie et Génome de la Faculté des Sciences de Rabat, pour son aimable amitié et pour sa précieuse contribution dans la réalisation des différentes parties de ma thèse ainsi que la gestion des références bibliographiques *via* le logiciel « Zotero ».

Je remercie également Madame **Khadija Harrat**, secrétaire du Centre d'Etudes Doctorales « Sciences de la Vie et de la Santé », Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide dans toutes les démarches administratives.

Je remercie très sincèrement Docteur **Hassan Lamzouri**, le Directeur du Centre Hospitalier Provincial, Hôpital Mohammed-VI de M'diq, ainsi que mes amis et collègues, particulièrement Adil Khay, Ali Hanabal, Rachid Jbari, Youness Aftyss, Ali Chenouf et Adnane Mazzaoui, pour leur amitié, leur soutien et leurs encouragements continus à mon égard tout au long de mon cursus doctoral.

Un vif merci à tous les amis et collègues que j'ai connus à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et à la Faculté de Médecine Dentaire de Rabat, en particulier Abdelaali Balahbib, Laila Zine, Karima Sayah, Rokia Ghchime, Younes El Hakour, Sanae Akkaoui, Mourad Kharbach, Bahia Belatar, Radouane El Mansouri, Najoua Salhi, Saad Fettach et Ali Kaddafi. Merci pour tous les moments forts que nous avons passés ensemble. Sans votre soutien, votre disponibilité, vos encouragements et la bonne ambiance que vous avez créée, mes années de thèse auraient eu une saveur complètement différente.

Le plus ineffable et le plus immense merci va à mes Parents qui m'ont toujours soutenu et aidé dans mes choix, et qui ont été présents chaque fois que nécessaire. Merci Maman, merci Papa, merci mes frères. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies et mes peines, vous m'avez soutenu par votre écoute, votre affection, votre sourire et votre amitié. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde gratitude pour toute la patience et les sacrifices que vous avez consentis pour moi et pour lesquels je vous serai éternellement redevable. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

## Fiche présentative de la thèse

- **Doctorant :** Nasreddine El Omari
- **Formation Doctorale :** Sciences de la Vie et de la Santé, branche « Biologie médicale, pathologie humaine et expérimentale et environnement ».
  
- **Intitulé du travail :** Étude phytochimique et toxicologique et évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et antibactérienne des racines d'*Aristolochia longa* L.
  
- **Encadrant :**
  - Prénom et nom : Pr. Omar Chokairi
  - Laboratoire et institution : Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
- **Co-encadrante :**
  - Prénom et nom : Pr. Malika Barkiyou
  - Laboratoire et institution : Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
  
- **Lieux de réalisation des travaux :**
  - Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
  - Equipe de Recherche d'Analyse Biopharmaceutique et Toxicologique, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.



- Laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie Médicale Clinique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
  - Laboratoire de Recherche en Biologie Orale et Biotechnologie, Faculté de Médecine Dentaire, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
  - Département de chimie analytique, de chimiométrie appliquée et de modélisation moléculaire, Université libre de Bruxelles, Belgique.
  - Laboratoire de Toxicologie/Pharmacie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.
  - Laboratoire de biochimie, centre hospitalier provincial, hôpital Mohammed-VI de M'diq, Maroc.
- 
- **Période de réalisation du travail de thèse : Février 2016 – Décembre 2019**

## Principales publications et communications en rapport avec le sujet de thèse

### Publications

1. **Nasreddine El Omari**, Karima Sayah, Saad Fettach, Omar El Blidi, Abdelhakim Bouyahya, My El Abbas Faouzi, Rabie Kamal, and Malika Barkiyou (2019). « Evaluation of *in vitro* antioxidant and antidiabetic activities of *Aristolochia longa* extracts ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 7384735, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/7384735>
2. **Nasreddine El Omari**, Sanae Akkaoui, Omar El Blidi, Rokia Ghchime, Abdelhakim Bouyahya, Mourad Kharbach, Maâmar Yagoubi, Abdelaali Balahbib, Omar Chokairi, and Malika Barkiyou (2020). « HPLC-DAD/TOF-MS Chemical Compounds Analysis and Evaluation of Antibacterial Activity of *Aristolochia longa* Root Extracts ». *Natural Product Communications*, 15(8), 1 – 6, [DOI: 10.1177/1934578X20932753](https://doi.org/10.1177/1934578X20932753)
3. **Nasreddine El Omari**, Omar El Blidi, Abdelhakim Bouyahya, Karima Sayah, Saad Bakrim, Saad Fettach, Rajae Tahri, Khalid Taghzouti, Omar Chokairi, and Malika Barkiyou. (2020). Toxicological Investigations of *Aristolochia longa* Root Extracts. *Journal of Toxicology*. Volume 2020, Article ID 7643573, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/7643573>

### Communications dans des congrès nationaux et internationaux

- **N. El Omari**, O. El Blidi, Y. Kamara-Zaman, A. Balahbib, B. Belatar, H. Hardizi, J. Khanfri, O. Chokairi, M. Barkiyou « Evaluation histologique et biochimique de l'intoxication à l'acetaminophène chez les rats adultes : Effets sur le foie et le rein » 8<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du CEDoc-SVS et aux 5<sup>èmes</sup> Journées

Scientifiques d'AMADOC SVS, Du 27 au 31 mars 2018, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

- **N. El Omari**, S. Akkaoui, O. El Blidi, R. Ghchime, A. Bouyahya, M. Kharbach, M. Yagoubi, A. Balahbib, O. Chokairi, and M. Barkiyou « HPLC-DAD/TOF-MS Chemical Compounds Analysis and Evaluation of Antibacterial Activity of *Aristolochia longa* Root Extracts » 9<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de CEDOC-SVS, 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de l'AMADOC SVS sous le thème : « Thérapie ciblée du cancer entre les avancées pharmaceutiques et l'application médicale », le 19 et 20 avril à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.
- **N. El Omari**, O. El Blidi, A. Bouyahya, K. Sayah, S. Bakrim, S. Fettach, R. Tahri, K. Taghzouti, O. Chokairi, and M. Barkiyou « Toxicological Investigations of *Aristolochia longa* Root Extracts » La 5<sup>ème</sup> Edition de la Journée de Biotechnologie Médicale, organisée par le Laboratoire de Biotechnologie (Medbiotech) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, sous le thème : Les Outils de Biotechnologie au Service de la Recherche Biomédicale Marocaine. Du 18 au 23 Décembre 2017.
- **N. El Omari**, K. Sayah, S. Fettach, O. El Blidi, A. Bouyahya, M. Faouzi, R. Kamal, and M. Barkiyou « Evaluation of *In Vitro* Antioxidant and Antidiabetic Activities of *Aristolochia longa* Extracts » Conference internationale, recherche scientifique et études doctorales ICIMAS'6. 30-31 Juillet 2019, Ecole Nationale des Sciences Appliquées Fès Maroc, ISSN 2665-8763.

## Résumé

### Étude phytochimique et toxicologique et évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et antibactérienne des racines d'*Aristolochia longa* L.,

Nasreddine EL OMARI

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation des extraits aqueux (EA), et des fractions méthanoliques (FM), aqueuses (FA) et d'acétate d'éthyle (FAE) des racines d'*Aristolochia longa* par la justification scientifique de leur réputation médicinale, l'évaluation de leur toxicité et l'identification des composés phytochimiques susceptibles d'être responsables de leurs activités biologiques.

L'évaluation des activités antidiabétiques et antibactériennes a montré que la FAE présente les meilleurs résultats. En effet, cette fraction avait une capacité inhibitrice élevée contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase ( $CI_{50} = 1,112 \pm 0,026$  mg/mL) et une bonne action bactériostatique contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (CMI = 12,5 mg/mL). Concernant l'activité antioxydante examinée par trois méthodes (DPPH, ABTS et FRAP), elle a été caractérisée par des résultats relativement modérés. En fait, la FA avait la valeur d'inhibition des radicaux DPPH la plus élevée ( $CI_{50} = 125,40 \pm 2,40$   $\mu$ g/mL), tandis que la FM était la plus active contre le cation ABTS ( $CI_{50} = 61,58 \pm 2,15$   $\mu$ g/mL). Ce potentiel thérapeutique est clairement lié à la richesse de ces extraits en composés phénoliques révélés par l'étude phytochimique réalisée.

Nos investigations toxicologiques nous ont permis de déduire qu'un traitement oral de courte durée par un extrait aqueux des racines d'*A. longa* est dépourvu de toute toxicité systémique, et que les véritables signes de toxicité n'apparaissent qu'à partir de la troisième semaine du traitement. En conséquence, si les préparations aqueuses de ces racines sont utilisées correctement, les gens peuvent en bénéficier sans effets indésirables.

A la lumière de ces résultats, des investigations plus approfondies (études *in vivo* et essais cliniques) sur cette plante devraient être menées afin de développer de nouveaux phytomédicaments au Maroc.

**Mots-clés:** *Aristolochia longa* ; extraits ; toxicité ; étude phytochimique ; composés phénoliques ; tests biologiques.

## **Abstract**

### **Phytochemical and toxicological study and evaluation of the antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activity of *Aristolochia longa* L., roots**

**Nasreddine EL OMARI**

This thesis work is part of the contribution to the valuation of aqueous extracts (AE), and methanolic (MF), aqueous (AF) and ethyl acetate (EAF) fractions of *Aristolochia longa* roots by the scientific justification of their medicinal reputation, the evaluation of their toxicity and the identification of phytochemicals likely to be responsible for their biological activities.

Evaluation of antidiabetic and antibacterial activities showed that EAF shows the best results. Indeed, this fraction had a high inhibitory capacity against the  $\alpha$ -glucosidase enzyme ( $IC_{50} = 1,112 \pm 0,026$  mg/mL) and a good bacteriostatic action against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (MIC = 12,5 mg/mL). Regarding the antioxidant activity examined by three methods (DPPH, ABTS, and FRAP), it was characterized by moderate results. In fact, AF had the highest DPPH radical inhibition value ( $IC_{50} = 125,40 \pm 2,40$   $\mu$ g/mL), while MF was the most active against the ABTS cation ( $IC_{50} = 61,58 \pm 2,15$   $\mu$ g/mL). This therapeutic potential is clearly linked to the richness of these extracts in phenolic compounds revealed by the phytochemical study carried out.

Our toxicological investigations enabled us to deduce that a short oral treatment with an aqueous extract of *A. longa* roots is devoid of any systemic toxicity, and serious signs of toxicity do not appear until the third week of treatment. Consequently, if the aqueous preparations of these roots are used correctly, people can benefit from them without adverse effects.

In the light of these results, more in-depth investigations (*in vivo* studies and clinical trials) on this herb should be carried out in order to develop new phytomedicines in Morocco.

**Keywords:** *Aristolochia longa* ; extracts ; toxicity ; phytochemical study ; phenolic compounds ; biological tests.

## ملخص

دراسة الكيمياء النباتية والسمية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة والسكري والبكتيريا لجذور

### *Aristolochia longa* L.,

نصر الدين العمري

تندرج أبحاث هذه الأطروحة في إطار تثمين المستخلصات المائية (EA)، والمستحضرات الميثانول (FM) والمائية (FA) وإيثيل الأسيتات (FAE) لجذور *Aristolochia longa* من خلال التبرير العلمي لاستعمالاتها الطبية التقليدية، تقييم سميتها وتحديد المواد الكيميائية التي يحتمل أن تكون مسؤولة عن أنشطتها البيولوجية. من خلال تقييم الأنشطة المضادة لمرض السكري و للبكتيريات، أظهر FAE أفضل النتائج. حيث أظهر هذا المستحضر قدرة عالية ضد أنزيم  $\alpha$ -glucosidase (مجم/مل =  $1.112 \pm 0.026$ )  $CI_{50}$  وقدرة كبح بكتيريا جيدة ضد ATCC *Pseudomonas aeruginosa* (مجم/مل = 12.5 CMI).

فيما يتعلق بنشاط مضادات الأكسدة الذي تم تقييمه في هذه الدراسة بثلاث طرق مختلفة (DPPH و ABTS و FRAP)، تم تسجيل نتائج معتدلة نسبيا. في حين كان لدى AF أعلى نشاط كمضاد للأكسدة ضد DPPH

(ميكروغرام/مل =  $125.40 \pm 2.40$ )  $CI_{50}$ ، بينما كان FM هو الأكثر فعالية ضد الكاتيون ABTS

(ميكروغرام/مل =  $61.58 \pm 2.15$ )  $CI_{50}$ . هذه الإمكانيات العلاجية، ترتبط بغنى هذه المستخلصات بمركبات البوليفينول

التي كشفت عنها الدراسة الكيميائية التي أجريناها.

مكنتنا دراسة السمية من استنتاج أن العلاج عن طريق الفم لمدة قصيرة بمستخلص مائي لجذور

*Aristolochia longa* خالي من أي سمية. بالمقابل، تظهر علامات السمية الواضحة بدءا من الأسبوع الثالث من العلاج.

وبالتالي، يمكن للناس الاستفادة من المستحضرات المائية لهذه الجذور دون آثار جانبية إذا تم استخدامها بشكل صحيح.

على ضوء هذه النتائج، يجب إجراء المزيد من الدراسات المعمقة (دراسات على الجسم الحي والتجارب السريرية) على

هذه النبتة من أجل تطوير أدوية نباتية جديدة في المغرب.

الكلمات المفتاحية: *Aristolochia longa* ; المستخلصات ; السمية ; دراسة الكيمياء النباتية ; مركبات البوليفينول ;

الاختبارات البيولوجية.

## Liste des abréviations

<b>AA</b> : Acide Aristolochique	<b>DPPH<sup>••</sup></b> : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>ABTS<sup>••</sup></b> : Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique	<b>DPP4</b> : Dipeptidyl peptidase-4
<b>Abs</b> : Absorbance	<b>EA</b> : Extrait Aqueux
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>EAA</b> : Equivalent d'Acide Ascorbique
<b>AGPI</b> : Acides Gras Polyinsaturés	<b>EAAL</b> : Extrait Aqueux d' <i>A. longa</i>
<b>AGE</b> : Glycation Avancée	<b>EAG</b> : Equivalents d'Acide Gallique
<b>ALiA</b> : Aristolactam la	<b>ERN</b> : Espèces Réactives de l'Azote
<b>ALT</b> : Alanine Aminotransférase	<b>ERO</b> : Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>FA</b> : Fraction Aqueuse
<b>AST</b> : Aspartate Aminotransférase	<b>FAE</b> : Fraction d'Acétate d'Ethyle
<b>ATCC</b> : American Type Culture Collection	<b>FDA</b> : Food and Drug Administration
<b>BHT</b> : Hydroxytoluène Butylé	<b>FM</b> : Fraction méthanolique
<b>CAT</b> : Catalase	<b>FRAP</b> : Pouvoir réducteur de l'ion ferrique
<b>CCM</b> : Chromatographie sur Couche Mince	<b>GLP-1</b> : Glucagon-like peptide-1
<b>CE<sub>50</sub></b> : Concentration Efficace Médiane	<b>GLUT</b> : Glucose transporter
<b>CI<sub>50</sub></b> : Concentration Inhibitrice de 50%	<b>GPX</b> : Glutathion peroxydase
<b>CLHP</b> : Chromatographie Liquide à Haute Performance	<b>HE</b> : Huile essentielle
<b>CMI</b> : Concentration Minimale Inhibitrice	<b>LDL</b> : Lipoprotéines de basse densité
<b>CMB</b> : Concentration Minimale Bactéricide	<b>MDA</b> : Malondaldéhyde
<b>DMSO</b> : DiméthylSulfOxyde	<b>M.H</b> : Mueller-Hinton
	<b>NF-κB</b> : Nuclear factor-κB
	<b>ORAC</b> : Capacité d'absorption des radicaux oxygénés
	<b>PARP</b> : Poly(ADP-ribose) Polymérase

**PI** : Pourcentage d'Inhibition

**PPARs** : Proliférateurs de Peroxysomes

**PPAR- $\gamma$**  : Récepteur gamma activé par  
les proliférateurs de peroxysomes

**RI** : Résistance à l'Insuline

**RL** : Radicaux Libres

**SGLT** : Co-Transporteurs Sodium-  
Glucose

**SM** : Spectrométrie de Masse

**SOD** : Superoxyde Dismutase

**TEAC** : Capacité antioxydante en  
équivalent Trolox

**TEAC** : Trolox equivalent antioxidant  
capacity

**UV** : Ultraviolet



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Résultats du criblage phytochimique des racines d' <i>Aristolochia longa</i>	<b>101</b>
<b>Tableau 2:</b> Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins catéchiques	<b>102</b>
<b>Tableau 3:</b> Composés phénoliques quantifiés des extraits d' <i>Aristolochia longa</i>	<b>106</b>
<b>Tableau 4:</b> Effet de l'EAAL sur la fonction hépatique (AST et ALT) chez les rats	<b>118</b>
<b>Tableau 5:</b> Effet de l'EAAL sur la fonction rénale (urée et créatinine) chez les rats	<b>119</b>
<b>Tableau 6:</b> Valeurs $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits et du Trolox pour l'activité d'inhibition du DPPH et de l'ABTS	<b>139</b>
<b>Tableau 7:</b> Résultats des tests d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et de la $\beta$ -galactosidase	<b>146</b>
<b>Tableau 8:</b> Diamètres d'inhibition (mm) des différents extraits d' <i>Aristolochia longa</i>	<b>155</b>
<b>Tableau 9:</b> Valeurs de CMI <sub>50</sub> et de CMBs des extraits d' <i>Aristolochia longa</i>	<b>158</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> <i>Aristolochia longa</i> (plante entière)	44
<b>Figure 2:</b> Transport du glucose dans l'épithélium intestinal	68
<b>Figure 3:</b> Principaux mécanismes de l'activité antidiabétique des produits naturels	77
<b>Figure 4:</b> Procédé d'extraction	94
<b>Figure 5:</b> Structures chimiques des acides phénoliques	104
<b>Figure 6:</b> Structures chimiques des flavonoïdes	104
<b>Figure 7:</b> Structures chimiques des terpénoïdes	105
<b>Figure 8:</b> Structures chimiques des acides gras (1: acide palmitique)	105
<b>Figure 9:</b> Structures chimiques des caroténoïdes (1: bêta-carotène; 2: lycopène)	106
<b>Figure 10:</b> Profil chromatographique de la fraction méthanolique d' <i>A. longa</i>	201
<b>Figure 11:</b> Profil chromatographique de la fraction aqueuse d' <i>A. longa</i>	201
<b>Figure 12:</b> Profil chromatographique de la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>A. longa</i>	202
<b>Figure 13:</b> Profil chromatographique de l'extrait aqueux d' <i>A. longa</i>	202
<b>Figure 14:</b> Préparation de coupes histologiques pour observation au microscope optique	113
<b>Figure 15:</b> Modifications du poids corporel chez les rats traités avec l'extrait aqueux	115
<b>Figure 16:</b> Effets de l'EAAL sur le poids relatif des foies. Les valeurs sont la moyenne de deux déterminations $\pm$ écart-type	116
<b>Figure 17:</b> Effets de l'EAAL sur le poids relatif des reins. Les valeurs sont la moyenne de deux déterminations $\pm$ écart-type	117
<b>Figure 18:</b> Le 6 <sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Légère dilatation sinusoidale centrolobulaire avec macro- et microvésicules (grossissement $\times$ 20)	121
<b>Figure 19:</b> 11 <sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Accentuation de la dilatation sinusoidale (grossissement $\times$ 20)	121
<b>Figure 20:</b> Le 11 <sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2 g/kg. Macro- et microvésicules avec clarification et ballonnisation du cytoplasme (grossissement $\times$ 20)	122
<b>Figure 21:</b> Le 11 <sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2 g/kg. Nécrose générale et rétraction nucléaire discrète (grossissement $\times$ 20)	122

- Figure 22:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Nécrose de liquéfaction (signe de souffrance hépatique) avec congestion et dissociation cordonale (grossissement × 20) **123**
- Figure 23:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Cellule géante (Kupffer) (grossissement × 20) **123**
- Figure 24:** Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Présence de foyers hémorragiques, œdème, congestion parenchymateuse, dissociation cordonale et nécrose étendue (grossissement × 10) **123**
- Figure 25:** Le 6<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Structures normales (grossissement × 10) **125**
- Figure 26:** Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Rétraction des glomérules et élargissement des chambres de filtration (× 20) **125**
- Figure 27:** (a) Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Distorsion de l'architecture cortico-médullaire avec congestion et œdème (grossissement × 10). (b) Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 1,25 g/kg. Hémorragie et collapsus luminale (grossissement × 20) **125**
- Figure 28:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 2 g/kg. Distorsion et rétraction des glomérules (grossissement × 10) **126**
- Figure 29:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 2,5 g/kg. Hémorragie et ballonnisation des cellules des tubules urinaires (grossissement × 10) **126**
- Figure 30:** Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 0,8 g/kg. Infiltrat inflammatoire non spécifique avec rétraction des glomérules (grossissement × 20) **126**
- Figure 31:** (a) Le 6<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Structures normales (grossissement × 20). (b) Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 1,25 g/kg. Structures normales (glandes et villosités) (grossissement × 20) **128**
- Figure 32:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Structures normales (grossissement × 10) **128**
- Figure 33:** (a) Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Fragilité des villosités (grossissement × 10). (b) Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Fragilité et signes d'hémorragie avec infiltrat inflammatoire abondant (grossissement × 20) **128**

<b>Figure 34:</b> Activité de piégeage des radicaux DPPH. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations $\pm$ écart-type	<b>136</b>
<b>Figure 35:</b> Activité de piégeage des radicaux ABTS. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations $\pm$ écart-type	<b>137</b>
<b>Figure 36:</b> Pouvoir antioxydant réducteur du fer. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations $\pm$ écart-type	<b>138</b>
<b>Figure 37:</b> Protocole expérimental d'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu solide	<b>152</b>

# Sommaire

Dédicace	2
Remerciements	3
Fiche présentative de la thèse	8
Principales publications et communications en rapport avec le sujet de thèse	10
Résumé	12
Abstract	13
Liste des abréviations	15
Liste des tableaux	17
Liste des figures	18
Introduction générale	28

## PREMIÈRE PARTIE Synthèse bibliographique

<b>I. Plantes médicinales</b>	<b>32</b>
<b>II. Composition chimique des plantes médicinales</b>	<b>34</b>
1. Composés organiques volatils	34
1.1. Terpénoïdes	35
2. Composés organiques non volatils	36
2.1. Composés phénoliques	36
2.1.1. Acides phénoliques	37
2.1.2. Flavonoïdes	37
2.1.2.1. Flavones	38
2.1.2.2. Flavonols	38
2.1.2.3. Flavanones	38
2.1.2.4. Isoflavonoïdes	39
2.1.2.5. Flavanols, flavan-3-ols ou catéchines	39
2.1.2.6. Anthocyanes	39
2.1.2.7. Chalcones	39
2.1.3. Tanins	40
2.2. Alcaloïdes	41

<b>III. Données bibliographiques sur <i>Aristolochia longa</i> L.</b>	<b>42</b>
1. Présentation de la famille des Aristolochiaceae	42
1.1. Classification	43
1.2. Distribution	43
1.3. Description botanique	44
1.4. Utilisation traditionnelle	44
2. Phytochimie d' <i>Aristolochia longa</i>	45
2.1. Principaux composés	45
2.2. Composition en acides gras	47
3. Activités pharmacologiques et biologiques des composés et des extraits d' <i>Aristolochia longa</i>	48
3.1. Activités anti-tumorales	48
3.2. Activités antibactériennes et antifongiques	49
3.3. Activités antidiabétiques	51
3.4. Activités antioxydantes	51
3.5. Activités anti-inflammatoires	52
3.6. Activités immunostimulantes	52
4. Etudes toxicologiques d' <i>Aristolochia longa</i>	53
<b>IV. Plantes médicinales aux propriétés anti-oxydantes</b>	<b>54</b>
1. Stress oxydatif	54
1.1. Espèces réactives de l'oxygène	54
1.1.1. Ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )	55
1.1.2. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )	55
1.1.3. Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )	55
1.1.4. Oxygène singulet ( $^1O_2$ )	56
1.2. Effets biologiques des ERO	56
1.2.1. Effets positifs	56
1.2.2. Effets négatifs	56
1.2.2.1. Oxydation des lipides	57
1.2.2.2. Oxydation des protéines	57
1.2.2.3. Oxydation de l'ADN	58
2. Antioxydants	59
2.1. Antioxydants enzymatiques	59
2.1.1. Superoxyde dismutase	59
2.1.2. Catalase	59
2.1.3. Glutathion peroxydase	60

2.2. Antioxydants non enzymatiques	60
2.2.1. Vitamine E (tocophérol)	60
2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)	60
2.2.3. $\beta$ -carotène et vitamine A (rétinol)	61
3. Propriétés antioxydantes des plantes médicinales marocaines	61
3.1. Extraits de plantes	62
3.2. Huiles essentielles	64
<b>V. Plantes médicinales aux propriétés antidiabétiques</b>	<b>66</b>
1. Glucides	66
1.1. Digestion des glucides	66
1.2. Absorption des glucides	67
2. Diabète sucré	68
2.1. Complications du diabète sucré	69
2.2. Classification du diabète sucré	70
2.2.1. Diabète sucré de type 1	70
2.2.2. Diabète sucré de type 2	71
2.2.3. Diabète gestationnel	72
2.3. Physiopathologie du diabète sucré	72
3. Effet des plantes sur le diabète	73
4. Propriétés antidiabétiques des plantes médicinales marocaines	74
4.1. Effets antidiabétiques <i>in vitro</i>	74
4.2. Effet antidiabétique <i>in vivo</i>	74
5. Mécanismes d'action des plantes antidiabétiques	75
5.1. Augmentation de la sécrétion d'insuline	75
5.2. Augmentation de l'expression des PPARs	76
5.3. Inhibition de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase	76
5.4. Augmentation de la sécrétion de glucagon-like peptide-1 (GLP-1)	76
5.5. Inhibition de la formation des produits de glycation avancée (AGE)	76
5.6. Augmentation et translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4)	76
5.7. Réduction de la résistance à l'insuline	77
<b>VI. Plantes médicinales aux propriétés antibactériennes</b>	<b>77</b>
1. Introduction	77
2. Résistance aux agents antimicrobiens	79
2.1. Résistance par mutation	80

2.2. Résistance par transfert d'ADN	81
3. Propriétés antibactériennes des plantes médicinales	81
4. Activité antibactérienne des plantes médicinales marocaines	82
4.1. Activité antibactérienne des extraits végétaux	83
4.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles	86

## DEUXIÈME PARTIE

### Partie expérimentale

<b>Introduction</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre 1: Matériel végétal et étude phytochimique</b>	<b>92</b>
I. Introduction	92
II. Matériel et méthodes	92
1. matériel végétal	92
1.1. Sélection du matériel végétal	92
1.2. Récolte et identification du matériel végétal	93
1.3. Préparation et rendement des extraits végétaux	93
2. Etude phytochimique	94
2.1. Screening phytochimique	95
2.1.1. Recherche des flavonoïdes	95
2.1.2. Recherche des terpénoïdes	95
2.1.3. Recherche des tanins	95
2.1.4. Recherche des alcaloïdes	96
2.1.5. Recherche des anthraquinones	96
2.1.6. Recherche des saponines	96
2.2. Dosage phytochimique	97
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	97
2.2.2. Dosage des flavonoïdes	97
2.2.3. Dosage des tanins condensés	98
2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse (CLHP/SM)	98
3. Analyses statistiques	100
III. Résultats et discussion	100
1. Rendement d'extraction	100
2. Screening phytochimique	100



3. Dosage phytochimique	101
4. Identification et quantification des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse	103
IV. Conclusion	108
<b>Chapitre 2: Etude toxicologique de l'extrait aqueux d'<i>Aristolochia longa</i></b>	<b>109</b>
I. Introduction	109
II. Matériel et méthodes	110
1. Animaux	110
2. Test de toxicité	110
3. Changements du comportement	111
4. Poids corporel	112
5. Paramètres biochimiques	112
6. Histopathologie	112
III. Résultats et discussion	113
1. Comportement des animaux	114
2. Poids corporel des animaux	114
3. Poids relatif des organes	116
4. Paramètres biochimiques	117
5. Histopathologie	120
5.1. Foie	121
5.2. Reins	124
5.3. Intestins	127
IV. Conclusion	129
<b>Chapitre 3: Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> des extraits d'<i>Aristolochia longa</i></b>	<b>130</b>
I. Introduction	130
II. Matériel et méthodes	131
1. Test d'inhibition du radical DPPH	131
1.1. Principe	131
1.2. Mode opératoire	131
2. Test d'inhibition du radical ABTS <sup>•+</sup>	132
2.1. Principe	132
2.2. Mode opératoire	132
3. Pouvoir réducteur du fer, FRAP	133
3.1. Principe	133

3.2. Mode opératoire	133
III. Résultats et discussion	134
IV. Conclusion	141
<b>Chapitre 4: Etude de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i> des extraits d'<i>Aristolochia longa</i></b>	<b>142</b>
I. Introduction	142
II. Matériel et méthodes	143
1. Test d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase	143
2. Test d'inhibition de la $\beta$ -galactosidase	144
III. Résultats et discussion	144
IV. Conclusion	148
<b>Chapitre 5: Etude de l'activité antibactérienne des extraits</b>	<b>149</b>
I. Introduction	149
II. Matériel et méthodes	150
1. Souches bactériennes	150
2. Détermination des diamètres d'inhibition	150
2.1. Test de diffusion sur disque	150
2.2. Test de diffusion en puits	151
2.3. Expression des résultats	151
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	152
4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	153
III. Résultats et discussion	153
1. Méthode de diffusion sur disque	153
2. Méthode de diffusion en puits	155
3. Détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB)	157
IV. Conclusion	159
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>161</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>165</b>
<b>Annexe</b>	<b>200</b>

## **INTRODUCTION GENERALE**

## **Introduction générale**

Les sociétés humaines ont été en contact étroit avec leur environnement depuis le début de leur formation, et ont utilisé les ressources de l'environnement pour obtenir de la nourriture et des médicaments. En effet, à travers les âges, les êtres humains ont dépendu de la nature pour leurs simples besoins en tant que sources de médicaments, d'abris, de nourritures, de parfums, de vêtements, de saveurs, d'engrais et de moyens de transport. La prise de conscience et l'application des plantes dans la préparation des aliments et des médicaments ont été obtenues par essais et erreurs, et progressivement l'homme est devenu capable de répondre à ses besoins à partir de son environnement. L'information sur les plantes médicinales s'est longtemps transmise progressivement, et de génération en génération, un savoir humain s'est progressivement enrichi avec la formation des civilisations et la mise à disposition de plus d'équipements.

Par ailleurs, les plantes médicinales sont utilisées comme ressource médicale dans presque toutes les cultures. Et pour une grande partie de la population mondiale, elles continuent de jouer un rôle de premier plan dans le système de santé et cela est principalement vrai dans les pays en développement, où la phytothérapie a une longue histoire d'utilisation. Certaines des propriétés bénéfiques attribuées aux plantes ont été reconnues comme imparfaites, et le traitement par les plantes est basé sur des découvertes expérimentales il y a des centaines à des milliers d'années.

Assurer l'innocuité, la qualité et l'efficacité des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes est devenu très récemment un enjeu majeur dans les pays industrialisés et en développement.

Les médicaments à base de plantes peuvent contribuer à l'émergence d'une nouvelle ère du système de santé pour traiter les maladies humaines à l'avenir. La sensibilisation aux connaissances traditionnelles et aux plantes médicinales peut jouer un rôle clé dans l'exploitation et la découverte des ressources végétales naturelles. Afin de maintenir ces connaissances, une approche globale et des collaborations sont nécessaires pour préserver les archives historiques des plantes

médicinales de notre pays et utiliser ces ressources au profit des êtres humains, avant qu'elles ne soient détruites à jamais.

Le Maroc, par son emplacement géographique particulier et son climat méditerranéen favorable, possède une grande diversité floristique dont un potentiel important en plantes médicinales souvent endémiques. Malgré la richesse botanique du pays, les données pharmacologiques et phytochimiques la concernant sont jugées insuffisantes. Pour ce faire, la contribution à la valorisation de cette biodiversité constitue un enjeu scientifique et industriel incontournable.

Ainsi, l'objectif du présent travail est la valorisation d'une espèce marocaine du genre *Aristolochia* (Aristolochiaceae); *Aristolochia longa*, contenant environ 500 espèces largement réparties dans la plupart des pays méditerranéens, tropicaux et subtropicaux (Benarba et al., 2012). Les propriétés thérapeutiques de cette plante, démontrées par l'expérience, nécessitent une validation scientifique pour confirmer leurs usages traditionnels et par la suite d'isoler les composés bioactifs susceptibles d'être responsables de ces vertus thérapeutiques. Cependant, cette plante est incriminée dans de nombreuses situations de toxicité accidentelle. Malgré des tests toxicologiques *in vivo* qui ont confirmé une certaine toxicité aux doses élevées, il était impératif de vérifier ceci dans le temps. En effet, la valorisation de cette plante a été effectuée à l'aide de tests toxicologiques et pharmacologiques, ainsi que d'analyses phytochimiques de ses différents extraits, permettant d'identifier et de quantifier les composés chimiques susceptibles d'être responsables des propriétés thérapeutiques testées.

Ce manuscrit est divisé en deux parties principales; la première est consacrée à la synthèse bibliographique et la seconde à la partie expérimentale que nous avons proposé de la subdiviser en chapitres. La première partie a permis de situer le contexte général du travail, en présentant l'état des connaissances botaniques, phytochimiques et pharmacologiques d'*A. longa*, ainsi que l'effet des plantes médicinales vis-à-vis de certains déséquilibres, à savoir le stress oxydatif, le diabète et la résistance bactérienne. Concernant la partie expérimentale, elle a été subdivisée

en cinq chapitres afin de bien organiser les résultats issus de ce travail de recherche, en commençant par une étude phytochimique des différents extraits utilisés ([Chapitre 1](#)), suivie d'une étude toxicologique *in vivo* ([Chapitre 2](#)) et les autres chapitres étaient consacrés aux propriétés pharmacologiques d'*A. longa*, à savoir l'activité antioxydante ([Chapitre 3](#)), l'activité antidiabétique ([Chapitre 4](#)) et l'activité antibactérienne ([Chapitre 5](#)). À la fin, nous avons terminé par une conclusion générale et les perspectives tirées de ce travail.

**PREMIÈRE PARTIE**  
**Synthèse bibliographique**

## I. Plantes médicinales

La phytothérapie est un mot d'origine grecque composé de «phytos» signifiant plante et «therapeuo» qui signifie soigner. En d'autres termes, c'est la thérapie par les plantes ou par leurs formes dérivées. Une plante médicinale est une plante dont l'un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce, possède des propriétés thérapeutiques, et parfois toxiques selon la dose. Elle est rarement utilisée entière, le plus souvent il s'agit d'une partie de la plante, celle la plus concentrée en principes actifs (le bulbe, la racine, les parties aériennes, etc.), qui s'utilise fraîche ou sèche. En plus, différentes parties d'une même plante peuvent avoir des utilisations différentes. Les plantes peuvent être consommées sous plusieurs formes; telles quelles (infusions) ou après transformation (médicaments à base de plantes, extraits, teintures, etc.). Cela dépend de la nature du principe actif (hydrophile ou hydrophobe) et de la partie de la plante concernée.

Pendant des siècles, l'homme s'est soigné par les plantes de manière empirique (Djeridane et al., 2006b). La plupart des grands médecins du passé étaient des phytothérapeutes (Goeb, 1999), et la corrélation entre leurs savoirs ancestraux et les connaissances scientifiques actuelles a constitué un domaine de recherche interdisciplinaire. Jusqu'à présent, plusieurs investigations menées dans le domaine de l'ethnopharmacologie ont révélé que les plantes utilisées en médecine traditionnelle sont, d'une part, des plantes aux propriétés pharmacologiques indéniables et, d'autre part, celles dépourvues d'effets nocifs (Alves and Rosa, 2007). Effectivement, la médecine traditionnelle, appelée encore médecine alternative/parallèle/douce, est l'ensemble des compétences, des pratiques et des connaissances basées sur des expériences, des croyances et des théories propres à une culture dans la prévention, le soulagement et la guérison des maladies (OMS, 2000). Cette thérapie est pratiquée par 70% de la population du tiers-monde.

Actuellement, les plantes médicinales possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive de leurs applications dans les soins de santé ainsi que dans



d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs multiples usages font qu'elles sont sujettes à une demande croissante sur le marché mondial. En effet, l'exploitation des plantes médicinales est un secteur qui a pris de l'importance au cours des 20 dernières années, tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Cette confiance a été attribuée à l'efficacité thérapeutique des plantes, dont l'utilisation est davantage contrôlée selon des critères scientifiques et une approche clinique rigoureuse. A long terme pourront remplacer les médicaments de synthèse qui peuvent présenter des effets secondaires associés à une efficacité parfois insuffisante ou nulle.

Parmi 300000 espèces dénombrées aujourd'hui, 200000 poussent sous les tropiques d'Afrique. Le Maroc, possède une flore riche en raison de sa position géographique stratégique. Grâce à ses deux façades maritimes qui s'étendent sur plus de 3500 km, dont 450 km en Méditerranée. Les variations des climats et des reliefs sont également des éléments fondamentaux expliquant cette richesse florale ([Benabid, 2000](#)).

De nombreux travaux ont été réalisés concernant la pharmacopée marocaine. Près de 50% de la population des différentes régions du pays utilise des plantes médicinales. Pour s'informer sur l'utilisation de ces plantes, les marocains se tournent vers l'expérience des autres, l'herboriste et le pharmacien. Ces espèces médicinales sont utilisées dans le traitement d'une variété de maladies et d'infections ([Belakhdar, 1997](#)). Habituellement, les gens utilisent la décoction et l'infusion d'une seule plante ou d'un mélange de plantes ([Carabajal et al., 2017](#)). Cependant, le marché local, en particulier dans les zones de production, souffre de multiples difficultés dues notamment à la prédominance du secteur informel et au manque d'organisation des circuits de production, de distribution et de commercialisation. Alors qu'au niveau international, ce secteur est marqué par un mouvement d'internationalisation et de regroupement de petites unités industrielles en firmes multinationales. Les exportations marocaines se font vers diverses destinations sur les cinq continents.

## **II. Composition chimique des plantes médicinales**

La nature est le magasin de nombreux principes actifs transformés en produits pharmaceutiques que nous utilisons aujourd'hui. Les plantes synthétisent de nombreux métabolites secondaires, leur permettant de survivre et de se reproduire (Jing et al., 2014). Ces métabolites secondaires sont les polyphénols, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les stéroïdes, les glycosides et les phytoalexines. Ils présentent des activités biodynamiques, applicables à la fois à la santé humaine et animale. Ces métabolites secondaires également appelés composés chimiques sont des substances naturelles appartenant à différentes familles et espèces végétales (Anulika et al., 2016), et caractérisées par des structures différentes, une grande variété et une large gamme de propriétés biologiques. Ces composés sont synthétisés en réponse à plusieurs stimuli tels que les variations climatiques, écologiques et édaphiques (la nature du sol) ainsi que les interactions plantes-plantes et plantes-microorganismes. Leur concentration varie en fonction de la partie, de l'âge et de l'espèce de la plante ainsi que de la saison de récolte. Cette catégorie de molécules naturelles constitue aujourd'hui les composants majeurs d'une grande partie de nos produits pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des plantes sur l'organisme, il est impératif d'évaluer leur composition chimique à travers différentes techniques d'extraction, d'isolement et d'identification.

On peut distinguer deux types de composés chimiques; les composés organiques volatils, en particulier les terpènes représentant la famille chimique la plus répandue des huiles essentielles, et les composés organiques non volatils qui se divisent principalement en deux grandes familles chimiques, à savoir les composés phénoliques et les alcaloïdes.

### **1. Composés organiques volatils**

Les huiles essentielles (HE) sont des composés volatils et complexes de faible poids moléculaire caractérisés par une forte odeur et sont formés par des plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Les huiles essentielles sont extraites

par entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation ou extraction par solvant. En fait, le type d'extraction est choisi en fonction du but de l'utilisation. Le produit d'extraction peut varier en qualité, en quantité et en composition selon le climat, la composition du sol, l'organe de la plante et le stade du cycle végétatif (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). Outre leur utilisation répandue comme substances aromatisantes, les huiles essentielles représentent une alternative dans les domaines nutritionnels, pharmaceutiques, cosmétiques et agricoles (Kaloustian et al., 2008), en raison de leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes, antioxydantes, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticancéreuses, nématocides et insecticides (Aazza et al., 2014; Böhme et al., 2014; Tepe and Ozaslan, 2020). Ce large éventail d'applications résulte de la grande variété dans la composition chimique des huiles essentielles. Cette composition peut être affectée par de nombreux facteurs, incluant la variation génétique des plantes, la nutrition des plantes, l'emplacement géographique des plantes, le stress exercé pendant la croissance ou la maturité, les variations saisonnières, le climat environnant ainsi que le séchage et le stockage après récolte. Par ailleurs, une analyse phytochimique approfondie a conduit à la caractérisation et à l'identification des principaux composants des huiles essentielles qui sont également d'un grand intérêt, en particulier pour les industries cosmétiques et pharmaceutiques (Raut and Karuppayil, 2014). En effet, les huiles essentielles peuvent constituer 20 à 100 substances individuelles différentes appartenant à diverses classes chimiques (Carson and Hammer, 2011). Les terpénoïdes forment les principaux constituants des huiles essentielles, leur conférant un arôme et des propriétés biologiques caractéristiques (Raut and Karuppayil, 2014).

### **1.1. Terpénoïdes**

Les terpénoïdes, également appelés terpènes, sont l'un des groupes les plus caractéristiques et les plus diversifiés, plusieurs nouveaux composés étant découverts chaque année. Ils sont synthétisés à partir de seulement deux isomères à cinq carbones; l'isopentényl diphosphate et le diméthylallyl diphosphate. Sur la base des structures (McGarvey and Croteau, 1995), les terpénoïdes sont composés de

plusieurs sous-classes, notamment les monoterpénoïdes, les sesquiterpénoïdes, les diterpénoïdes, les triterpénoïdes et les tétraterpénoïdes (Huang et al., 2012), ayant des applications pratiques potentielles dans les industries des parfums et des arômes, et en particulier dans les industries pharmaceutique et chimique (Gershenson and Dudareva, 2007). Les monoterpènes (ex: linalol, menthol, cinéol, géraniol, lavandulol et alpha terpinéol) ainsi que leurs dérivés oxygénés (acétates, esters, alcools, etc.) constituent les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, Ils sont responsables de l'arôme que possède la plante ( Robinson, 1991; Loza-Tavera, 1999). La plupart du temps, les bioactivités d'une huile essentielle particulière sont déterminées par un ou plusieurs de ses principaux composants (Bakkali et al., 2008).

## **2. Composés organiques non volatils**

### **2.1. Composés phénoliques**

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des molécules appartenant au métabolisme secondaire des plantes et jouant un rôle protecteur contre les menaces environnementales. Ces phytomicronutriments sont également responsables de plusieurs processus physiologiques tels que la maturation des fruits, la germination des graines et la croissance cellulaire (Boizot and Charpentier, 2006). Ce sont aussi des pigments et donc responsables des couleurs et des teintes des différentes parties des plantes (fruits, fleurs et feuilles). Les polyphénols s'accumulent dans les plantes qualitativement et quantitativement selon les différentes parties de la plante et selon les espèces végétales. Ils sont solubles dans les solvants polaires. Par ailleurs, ils constituent plus de 10000 composés, allant des molécules simples (p.ex. les acides phénoliques) aux composés hautement polymérisés (p.ex. les tanins) (Lugasi, 2003), divisés en plusieurs classes comme les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, les stérols, les saponines, les lignanes et les stilbènes. Les classes principales sont les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins (King and Young, 1999; Tapiero et al., 2002). Cette diversité leur permet d'avoir diverses propriétés biologiques importantes, notamment des activités anti-oxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-athéroscléroses ainsi qu'une protection

cardiovasculaire, une inhibition de l'angiogenèse et une amélioration de la fonction endothéliale (Han et al., 2019).

### **2.1.1. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques (ou acides phénols) sont des phénols ayant la fonction acide carboxylique et formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont parmi les formes les plus simples des composés phénoliques, dérivés soit de l'acide cinnamique (Malgras, 1992) soit de l'acide benzoïque (Guignard, 1974), permettant d'identifier respectivement deux groupes distincts; les acides hydroxycinnamiques (comme l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide sinapique) et les acides hydroxybenzoïques (comme l'acide vanillique, l'acide gallique et l'acide salicylique). Bien que le squelette de base reste le même, les nombres et les positions des groupes hydroxyles sur le cycle aromatique créent la variété (Robbins, 2003).

### **2.1.2. Flavonoïdes**

En 1930, une nouvelle substance a été isolée des oranges, que l'on pense être un membre d'une nouvelle classe de vitamines, et a été désignée comme vitamine P (Nijveldt et al., 2001). Quand il est devenu clair que cette substance était un flavonoïde (rutine), une vague de recherches a commencé pour isoler les différents flavonoïdes individuels et pour étudier le mécanisme par lequel ces composés agissent. En effet, les flavonoïdes appartiennent à une classe de composés phénoliques de bas poids moléculaire largement répandus dans le règne végétal. Ils possèdent une variété d'activités biologiques associées à diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, le cancer, etc. (Burak and Imen, 1999; Lee et al., 2009). Chez les plantes, les flavonoïdes sont responsables de la couleur et de l'arôme des fleurs et des fruits pour attirer les pollinisateurs et par conséquent la dispersion des fruits pour aider à la germination des graines et des spores, ainsi qu'à la croissance et au développement des plantules (Griesbach, 2005). En outre, les flavonoïdes protègent les plantes de différents stress biotiques et abiotiques. Ils agissent comme des filtres UV (Takahashi et al., 2015), et fonctionnent comme des molécules de signal, des agents détoxifiants et des composés antimicrobiens. Les

flavonoïdes ont un rôle contre la résistance à la sécheresse et peuvent jouer un rôle fonctionnel dans l'acclimatation des plantes à la chaleur (Samanta et al., 2011). Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes sous-classes sur la base de leur structure moléculaire (Rice-Evans et al., 1996), à savoir les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les flavanols ou les catéchines, les anthocyanes et les chalcones (Panche et al., 2016).

#### **2.1.2.1. Flavones**

Les flavones sont largement présentes dans les feuilles, les fleurs et les fruits sous forme de glucosides. Le céleri, le persil, les poivrons rouges, la camomille, la menthe et le ginkgo biloba sont parmi les principales sources de flavones. La lutéoline, l'apigénine et la tangéritine appartiennent à cette sous-classe de flavonoïdes. Les écorces d'agrumes sont riches en flavones polyméthoxylées, tangéritine, nobilétine et sinensétine (Scalbert et al., 2005).

#### **2.1.2.2. Flavonols**

Les flavonols sont des flavonoïdes avec un groupe cétone. Ce sont des éléments constitutifs des proanthocyanines. Les flavonols sont présents en abondance dans une variété de fruits et légumes. Les flavonols les plus étudiés sont le kaempférol, la quercétine, la myricétine et la fisétine. Les oignons, le chou frisé, la laitue, les tomates, les pommes, les raisins et les baies sont de riches sources de flavonols. Outre les fruits et légumes, le thé et le vin rouge sont également des sources de flavonols. L'apport de flavonols est associé à un large éventail d'avantages pour la santé, notamment un potentiel antioxydant et un risque réduit de maladie vasculaire.

#### **2.1.2.3. Flavanones**

Les flavanones sont une autre classe importante qui est généralement présente dans tous les agrumes tels que les oranges, les citrons et les raisins. L'hésperidine, la naringénine et l'ériodictyol sont des exemples de cette classe de flavonoïdes. Les flavanones sont associées à un certain nombre d'avantages pour la santé en raison de leurs propriétés anti-radicaux libres. Ces composés sont responsables du goût amer du jus et de l'écorce des agrumes. Les flavonoïdes des agrumes exercent des effets

pharmacologiques intéressants en tant qu'agents antioxydants, anti-inflammatoires, hypolipémiants et hypocholestérolémiants.

#### **2.1.2.4. Isoflavonoïdes**

Les isoflavonoïdes sont un sous-groupe très distinctif de flavonoïdes. Ils se trouvent principalement dans le soja et d'autres plantes légumineuses. Ils jouent un rôle important en tant que précurseurs du développement des phytoalexines (composés antimicrobiens) lors d'interactions avec les microbes végétaux (Aoki et al., 2000; Richard and Daneel, 2002). Les isoflavonoïdes présentent un énorme potentiel pour lutter contre un certain nombre de maladies. En effet, les isoflavones comme la génistéine et la daidzéine sont communément considérées comme des phyto-œstrogènes en raison de leur activité œstrogénique dans certains modèles animaux (Casanova et al., 1999).

#### **2.1.2.5. Flavanols, flavan-3-ols ou catéchines**

Les flavanols sont également appelés flavan-3-ols car le groupe hydroxyle est toujours lié à la position 3 du cycle C. Ils se trouvent en abondance dans les bananes, les pommes, les myrtilles, les pêches et les poires. Contrairement à de nombreux flavonoïdes, il n'y a pas de double liaison entre les positions 2 et 3.

#### **2.1.2.6. Anthocyanes**

Les anthocyanes sont des pigments responsables des couleurs des plantes, des fleurs et des fruits. La cyanidine, la delphinidine, la malvidine, la pélagonidine et la péonidine sont les anthocyanes les plus étudiés. Ils se produisent principalement dans les couches cellulaires externes de divers fruits tels que les canneberges, les cassis, les raisins rouges, les raisins merlot, les framboises, les fraises, les myrtilles et les mûres. La stabilité de ces composés, associée aux bienfaits pour la santé, facilite leur utilisation dans l'industrie alimentaire dans une variété d'applications (Giusti and Wrolstad, 2003).

#### **2.1.2.7. Chalcones**

Les chalcones sont caractérisés par l'absence de «cycle C» de la structure du squelette des flavonoïdes de base. Cependant, ils peuvent également être appelés flavonoïdes

à chaîne ouverte. Les principaux exemples de chalcones comprennent la phloridzine, l'arbutine, la phlorétine et la chalconaringénine. Les chalcones sont présentes en quantités importantes dans les tomates, les poires, les fraises et certains produits du blé. Les chalcones et leurs dérivés ont suscité une attention considérable en raison de nombreux avantages nutritionnels et biologiques (Salehi et al., 2020).

### 2.1.3. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, astringents et solubles dans l'eau connus pour réduire la biodisponibilité des nutriments dans l'intestin (Sharma et al., 2019). Ils sont naturellement présents dans les feuilles, les graines, l'écorce, les racines, les fruits, les légumes, les céréales, les arbustes et dans plus de 40 espèces végétales (Hassanpour et al., 2011). Ils sont également présents en grande quantité dans la noix de kola qui est couramment mâchée par les habitants des pays d'Afrique de l'Ouest, ainsi que dans les graines de Guarana; qui est ajouté dans les boissons gazeuses des pays américains et du Brésil (Kumar et al., 2018). Les tanins sont consommés par plus de 80% de la population mondiale sous une forme ou une autre. Cependant, en raison de leur astringence, les applications alimentaires sont très limitées; alors qu'ils ont de larges applications dans les industries pharmaceutiques. Fait intéressant, ces polyphénols possèdent diverses activités médicinales et thérapeutiques; en présentant des effets antioxydants, anticancéreux, anti-allergiques, anti-inflammatoires, antiparasitaires, antiviraux et antimicrobiens, ainsi que des effets de cicatrisation des plaies, de guérison de la dysenterie, etc. (Ghosh, 2015). Cependant, les tanins possèdent certains effets indésirables, qui sont des effets antinutritionnels en formant des complexes avec des éléments mineurs tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, etc., ainsi qu'avec des éléments majeurs tels que les glucides et les protéines en les rendant indisponibles pour une utilisation par l'organisme (Waghorn et al., 1994; Hagerman et al., 1998). Ils forment également des complexes avec des enzymes impliquées dans la digestion des glucides, des protéines et des pectines, ce qui à son tour diminue la qualité nutritionnelle des aliments. La consommation d'une grande quantité de tanins dans les boissons telles



que le thé et le café sans lait peut souvent conduire à des maladies comme l'anémie et l'ostéoporose (Ricardo-da-Silva et al., 1991).

Les tanins sont principalement classés en deux groupes, à savoir les tanins condensés, également appelés tanins catéchiques ou proanthocyanidines, et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont en outre subdivisés en gallotannins et ellagitanins. Les tanins condensés se retrouvent généralement dans les tiges, les légumineuses, les arbres, etc. (Hassanpour et al., 2011), alors que les tanins hydrolysables se retrouvent dans les gousses, l'écorce, les feuilles, les fruits, etc. Le rôle des tanins condensés est de protéger la plante contre la prédation par les herbivores et les insectes; principalement en réduisant l'appétence des plantes, en particulier dans les jeunes feuilles (Barbehenn and Constabel, 2011). Dans les racines, ces tanins constituent une barrière chimique contre la pénétration et la colonisation par des agents pathogènes. Dans les graines, ils maintiennent la dormance des plantes et ont des propriétés bactéricides (Constabel et al., 2014).

## **2.2. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes végétaux, l'un des plus grands groupes de produits naturels, représentent un groupe très diversifié d'entités chimiques. Ils englobent une énorme classe d'environ 12000 produits naturels. Le terme alcaloïdes comprend les substances basiques qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote, généralement en combinaison dans le cadre d'un système cyclique (Barbosa-Filho et al., 2006). Il est parfois difficile de distinguer la fine ligne entre les alcaloïdes et les autres métabolites naturels azotés (Bribi, 2018). Les alcaloïdes existent principalement dans les plantes à fleurs, et généralement chez les papavéracées (coquelicots), les papilionacées (lupins), les renonculacées (aconits) et les solanacées (tabac) (Jing et al., 2014). Ils sont retrouvés également dans les végétaux inférieures, les insectes, les organismes marins, les micro-organismes et les animaux (Lewis, 1989). En outre, il existe plusieurs médicaments commercialisés, qui sont de nature alcaloïde (Cordell, 1981; Debnath et al., 2015). Des recherches de pointe sont en cours sur les alcaloïdes pour la découverte de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, ils ont un large

spectre d'activité pharmacologique, en présentant des propriétés antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Adamski et al., 2020). Ainsi, la sanguinarine et la berbérine, deux alcaloïdes végétaux, ont révélé une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses hématopoïétiques et induisant l'apoptose dans les lignées cellulaires testées (Och et al., 2019). En plus, il a été prouvé que la curine, un alcaloïde de type bisbenzylisoquinoléine, modulait les effets inflammatoires chez la souris, en raison de l'inhibition de l'activation des macrophages et du recrutement des neutrophiles, de l'inhibition de la production de cytokines et de la diminution du taux d'oxyde nitrique (Ribeiro-Filho et al., 2019). Malheureusement, la consommation de certains alcaloïdes peut entraîner des effets toxiques. Parmi eux, il y a l'arécoline, un alcaloïde trouvé dans les noix de bétel. Une surconsommation de cette substance peut conduire à la cancérogenèse (Chang et al., 2019). Cette toxicité est exploitée par les plantes pour se protéger contre l'agression d'autres organismes, et cette action instinctive constitue une fonction écologique importante.

### III. Données bibliographiques sur *Aristolochia longa* L.

#### 1. Présentation de la famille des Aristolochiaceae

*Aristolochia longa* appartient au genre *Aristolochia* (Aristolochiaceae) contenant environ 500 espèces largement distribuées dans la plupart des pays tropicaux, subtropicaux et méditerranéens (Benarba et al., 2012). En effet, ce genre est principalement trouvée dans les forêts d'Amérique, d'Asie, d'Afrique, d'Europe et rarement dans d'autres pays, avec des espèces différentes selon le pays, à savoir *Aristolochia indica* en Inde, *Aristolochia didyma* en Amérique du Sud, *Aristolochia clematitis* en Europe et *Aristolochia heppii* en Afrique de l'Est (Heinrich et al., 2009; Dey and De, 2011; González and Pabón-Mora, 2018). De nombreuses plantes du genre ont présenté une longue liste d'utilisations médicinales; des traitements antiasthmatiques, anti-inflammatoires (Machado and Lopes, 2008), analgésiques et anticancéreuses, ainsi que des traitements contre la néphrotoxicité (Huang et al.,

2014) et les maladies cardiovasculaires (Yu et al., 2007; Heinrich et al., 2009). Des activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-insectes des espèces d'*Aristolochia* ont également été signalées (Gadhi et al., 1999; Li et al., 2013). En plus, les espèces d'*Aristolochia* cultivées comme plantes ornementales sont couramment utilisées comme sources d'agents abortifs, emménagogues, sédatifs, nourrissants, relaxants et antiallergiques (Pacheco et al., 2009). D'autre part, *A. longa*, une espèce méditerranéenne d'Afrique du Nord communément appelé "Barraztam" par la population marocaine locale, était largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle est recommandée depuis l'antiquité contre l'insuffisance ovarienne et les morsures de serpents (Paul, 1977; Carvalho et al., 2013). Les propriétés biologiques d'*A. longa* ont été attribuées à un large éventail de familles chimiques, notamment les flavonoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes, l'acide tannique et les acides gras (Benarba and Meddah, 2014). D'autres études ont montré que cette plante possède des molécules bioactives, telles que l'acide aristolochique (AA), le limonène, le  $\beta$ -carotène et l'acide palmitique, qui ont prouvé leurs effets pharmacologiques (Cherif et al., 2009; Talbaoui et al., 2016; Merouani et al., 2017). C'est pourquoi il est nécessaire de bien déterminer les doses thérapeutiques dépourvues d'effets indésirables.

### 1.1. Classification

Règne : Plantae

Branche : Angiosperme

Classe : Magnoliopsida

Famille : Aristolochiaceae

Genre : *Aristolochia*

Espèce : *Aristolochia longa* L.

Sous espèces : *Aristolochia paucinervis* Pomel

### 1.2. Distribution

*A. longa* est commune dans tout le bassin méditerranéen. Au Maroc, elle pousse dans l'anti atlas, le haut atlas, le moyen atlas et le rif (Fennane et al., 1999).

### 1.3. Description botanique

*A. longa* est une plante vivace, glabrescente (20-50 cm de haut), à tiges élancées, étalées, souvent rameuses, à feuilles triangulaires, ovales, légèrement en forme de cœur (3-5 cm de large), à la base cordée, aux marges entières. Fleurs solitaires et vert brunâtre (Figure 1). Elle donne également des fruits très longs, par rapport à d'autres espèces d'*Aristolochia* (Coste, 2011).



Figure 1: *Aristolochia longa* (plante entière)

### 1.4. Utilisation traditionnelle

*A. longa* est utilisée traditionnellement depuis l'antiquité et plusieurs études ethnobotaniques ont évalué l'effet de différentes parties de cette plante dans le traitement des maladies, notamment le cancer, le diabète, l'asthme et les infections cutanées et intestinales (Benarba and Meddah, 2014; Amine, 2015; Dhouioui et al., 2016). Selon la zone, la région et le pays, les gens utilisent les différentes parties de la plante avec des modes de préparation variables. La racine était l'organe le plus recommandé. En effet, elle a été utilisée pour traiter la leishmaniose cutanée, les palpitations, les infections des voies respiratoires supérieures, les morsures de serpents venimeux, et également en association au henné, utilisée comme cataplasme pour traiter les maladies de la peau (Bammi and Douira, 2002; Salhi et al., 2010). De

plus, les avortements provoqués sont traités avec cette racine (Bammi and Douira, 2002). La plante entière, en décoction, était utilisée contre les affections intestinales et, mélangée avec du miel ou du beurre salé, comme traitement du cancer ou avec du cumin noir, de la pégame, du cumin et du poivre contre les morsures et les piqûres de divers animaux (Bammi and Douira, 2002; Lahsissene et al., 2009; Rhattas, 2016). Aussi, la consommation de la plante diffère d'une région à l'autre; soit en poudre sèche, infusion, décoction ou cataplasme. Au Maroc, des études ethnobotaniques ont noté que cette plante a été utilisée comme antalgique, emménagogue et galactogène (Benkhniqie et al., 2010). Une équipe de recherche marocaine a rapporté que cette plante est utilisée contre la «magie» (El-Hilaly et al., 2003). Cependant, l'innocuité des doses utilisées n'a pas été déterminée. Par conséquent, cette plante a provoqué de sérieuses complications, comme des lésions rénales irréversibles ainsi qu'une hématurie, une paralysie des membres et un haut potentiel de cancérogénicité (Ghourri et al., 2013). Il a été établi qu'*A. longa* est disponible en vente libre au Maroc. Alors que son utilisation est contrôlée en Algérie, interdite en Australie et restreinte en Europe. Ainsi, la commission européenne a interdit l'utilisation des espèces d'*Aristolochia* et leurs préparations dans les produits cosmétiques (Humans and Cancer, 2002; Dhouioui et al., 2016; Dauncey and Larsson, 2018).

## **2. Phytochimie d'*Aristolochia longa***

Depuis quelques années, l'effet de cette plante suscite un intérêt croissant suite aux nombreuses toxicités déclarées par le centre anti-poison et de pharmacovigilance du Maroc (Khouchlaa et al., 2018). Comme déjà indiqué, ses propriétés biologiques ont été associées à une large gamme de composés bioactifs. Un aperçu de ces composés pour chaque partie de la plante a été présenté ci-dessous.

### **2.1. Principaux composés**

La répartition des composés actifs dans les plantes diffère entre ses différentes parties, le lieu et la saison de croissance (Dhouioui et al., 2016). La phytochimie d'*A. longa* n'a pas été largement discutée et peu d'études ont exploré sa composition chimique. Les composés phénoliques totaux dans les racines étaient les principaux

composés avec une valeur de 6,07 mg/g suivis des fruits (Benarba and Meddah, 2014; Merouani et al., 2017). La teneur en flavonoïdes variait et la quantité élevée était trouvée dans l'extrait de racines (0,81 mg/g) (Djeridane et al., 2006a). Des tanins catéchiques, des C-hétérosides, des glucides et des saponines étaient présents dans l'extrait de racines d'*A. longa* avec un test qualitatif (Benarba and Meddah, 2014), alors qu'ils n'ont pas été identifiés quantitativement. Le  $\beta$ -caryophyllène, responsable des effets antibactériens et antioxydants, a été identifié dans l'huile essentielle des parties aériennes d'*A. longa* (Teresa et al., 1983; Calleja et al., 2013). En outre, Aneb et ses collègues ont identifié des quantités élevées de limonène-6-ol, de limonène-9-ol et d'octadécane dans les tubercules (Talbaoui et al., 2016). De plus, le limonène-6-ol a démontré des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses et était couramment utilisé dans les parfums, les nettoyeurs ménagers et les aliments (Goncharov et al., 2016). Les fruits d'*A. longa* étaient riches en lycopène et en  $\beta$ -carotène (Merouani et al., 2017), qui font partie des antioxydants les plus importants de l'alimentation et peuvent réduire le risque de certaines maladies, comme le cancer (Pennathur et al., 2010). Dans les feuilles, quatre composés ont été identifiés; le deenax, le diisocylfalte, l'acide acétique et le s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)- (Cherif et al., 2009). Il a été démontré que l'acide acétique possède des effets antifongiques, antibactériens, antioxydants, antidiabétiques et anti-tumoraux importants (Ryssel et al., 2009; Hassan et al., 2012; Chen et al., 2016).

L'AA, un acide nitrophénanthrène carboxylique, est le principal constituant rapporté dans une large gamme d'espèces d'*Aristolochiaceae*, et sa quantité varie selon les espèces. Cet alcaloïde peut être trouvé dans d'autres genres appartenant à la famille des *Aristolochiaceae*, tels que *Asarum* et *Bragantia* (Trujillo et al., 2006). L'AA a été identifié dans l'extrait aqueux et l'huile essentielle de tubercules et de racines d'*A. longa* (Teresa et al., 1983; Cherif et al., 2009; Merouani et al., 2017). Treize AAs d'origine naturelle ont été identifiés à partir de différentes plantes de la famille des espèces d'*Aristolochiaceae* (Michl et al., 2014). Les chercheurs ont montré que *A.*

*bracteolata* contient une quantité élevée d'AA-II (49,03 g/kg) par rapport à *A. debilis* (0,18 g/kg), *A. fangchi* (0,22 g/kg) et *A. manshuriensis* (1,0 g/kg). Les mêmes résultats ont été trouvés pour l'AA-I avec une quantité élevée pour *A. bracteolata* (12,98 g/kg) par rapport aux autres espèces (Abdelgadir et al., 2011). Ces acides ont des propriétés immunostimulantes, anti-inflammatoires et antibactériennes remarquables (Merouani et al., 2017).

## 2.2. Composition en acides gras

Les autres classes de composés phytochimiques identifiées chez *A. longa* étaient les acides gras, bien que peu de travaux aient étudié leur répartition dans la plante. Cette répartition, comprenant les acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés, diffère entre les différentes parties de la plante. Dhouioui et ses collaborateurs ont enregistré une teneur très élevée en acides gras saturés dans les racines. L'acide palmitique était l'acide gras le plus présent dans les extraits d'hexane de racine et l'huile essentielle de tige, représentant respectivement des pourcentages de 34,22% et 40,23% (Cherif et al., 2009; Dhouioui et al., 2016a). Cet acide a montré une activité antitumorale et antimicrobienne potentielle (Harada et al., 2002; Zheng et al., 2005). Alors que l'extrait méthanolique de feuilles était très riche en acide linoléique (62,45%) (Cherif et al., 2009), qui possédait des propriétés médicinales telles que des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, insectifuges et antibactériennes (Zheng et al., 2005; Singh et al., 2008). De plus, il a été démontré que l'acide linoléique représente l'acide gras le plus abondant des extraits méthanoliques de rizhome et qu'il est responsable des activités anti-inflammatoires et antibactériennes (Cherif et al., 2009; Calder, 2012). *A. longa* contient également de petites quantités de composés d'huiles essentielles, tels que l'acide arachidique, l'acide caprylique et l'acide laurique, qui peuvent être efficaces en raison de la synergie entre eux et des quantités élevées des principaux constituants de la plante. Des recherches récentes ont démontré la distribution d'autres acides gras longs tels que l'acide 9,12,15-octadécatriénoïque, l'ester méthylique, le 3-Hexadecyloxycarbonyl-5- (2-hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion et le *trans-Z- $\alpha$*

Bisabolène époxyde (Talbaoui et al., 2016). Ces molécules doivent être isolées et testées pour différents effets biologiques puisque les extraits et l'huile essentielle ont montré des activités prometteuses. Des recherches plus poussées ont montré que le maaliol et l'éremophilone ont été trouvés en grande quantité en mars. Alors que d'autres composés, tels que l'isospathulénol et le 2,3-dihydro-benzofurane, n'étaient pas présents pendant cette période (Dhouioui et al., 2016a). Evidemment, la saison de croissance est un facteur à prendre en compte, qui pourrait affecter les voies métaboliques de la composition phytochimique dans la même partie de la plante. C'est pourquoi des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les acides gras influencés par la saison de croissance dans d'autres parties de cette plante.

### **3. Activités pharmacologiques et biologiques des composés et des extraits d'*Aristolochia longa***

Au cours des dernières décennies, *A. longa* a attiré beaucoup d'attention et a fait l'objet de plusieurs études pharmacologiques. Les bénéfices thérapeutiques des composés et/ou extraits d'*A. longa* ont été mis en évidence par différents modèles expérimentaux.

#### **3.1. Activités anti-tumorales**

Des études anti-tumorales *in vitro* de l'extrait aqueux de racines d'*A. longa* ont révélé des effets contre des cellules tumorales. En effet, Benarba et ses collègues ont démontré qu'un extrait aqueux de racines d'*A. longa* était capable d'induire l'apoptose des cellules du lymphome de Burkitt (BL41) avec une  $CI_{50}$  de 15,63  $\mu\text{g/mL}$  (Benarba et al., 2012). Récemment, le même extrait a montré, contre deux lignées cellulaires de cancer du sein; MDA-MB-231 et HBL100, des valeurs de 97 et 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Benarba et al., 2016). Un autre travail a démontré que le  $\beta$ -caryophyllène stimule l'apoptose et supprime la croissance tumorale (Legault and Pichette, 2007).

les mêmes résultats ont été obtenus avec le lycopène et l'acide palmitique, qui inhibaient la prolifération cellulaire et induisaient l'apoptose en activant les pores



mitochondriaux dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  et en provoquant la libération de cytochromes c des mitochondries (Pennathur et al., 2010; Belosludtsev et al., 2006). D'autres mécanismes d'action peuvent être attribués aux composés d'*A. longa* qui sont impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose par l'activation de la caspase-3/7 et de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), le clivage de la caspase-9 et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par l'éosinophile (Benarba et al., 2012; Benzakour et al., 2012; Alves-Silva et al., 2017). Des auteurs ont étudié les activités cytotoxiques de l'extrait de tubercule d'*A. longa* contre trois lignées cellulaires cancéreuses. Les extraits d'hexane et de dichlorométhane ont présenté des effets inhibiteurs significatifs avec une activité cytotoxique importante, ce qui est cohérent avec des recherches antérieures concernant la famille des Aristolochiaceae, en particulier deux principes actifs, l'AA et l'aristolactame (Hinou et al., 1990; Arlt et al., 2007). En revanche, une étude contre la tumorigenèse gingivale chez des rats Wistar a montré que l'extrait aqueux d'*A. longa* (EAAL) induit des réactions pro-inflammatoires significatives non limitées au tissu traité, mais étendu à différents tissus de la cavité buccale (langue et lèvres) et aux tissus pulmonaires (Benzakour et al., 2012). Cet effet peut être dû aux principaux composés phytochimiques aux propriétés immunostimulantes (Pozdzik et al., 2010). Dans l'ensemble, ces rapports ont fourni des preuves que *A. longa* peut être considéré comme une source de biomolécules naturelles dans le traitement du cancer.

### **3.2. Activités antibactériennes et antifongiques**

L'activité antibactérienne d'*A. longa* a été évaluée contre plusieurs souches. En effet, l'huile essentielle de racines d'*A. longa* a été testée contre *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. L'activité la plus élevée a été observée contre *S. agalactiae*, qui était particulièrement sensible avec une zone d'inhibition de 41,8 mm (Dhouioui et al., 2016a). Le mécanisme d'action peut être attribué aux composés de l'huile essentielle d'*A. longa* qui induisent une fuite de sodium intracellulaire et une altération du potentiel membranaire, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité

membranaire et une perte des activités respiratoires et enzymatiques (Abdelhakim Bouyahya et al., 2017). D'autres études ont montré que l'acide palmitoléique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique inhibent l'énoyl-acyl transporteur protéine réductase, un composant essentiel de la synthèse bactérienne des acides gras, qui a servi de cible prometteuse pour de nombreux médicaments antibactériens (Zheng et al., 2005). Cependant, les bactéries à Gram négatif ont développé une certaine résistance contre l'huile essentielle d'*A. longa* (Dhouioui et al., 2016a). Les extraits d'*A. longa* ont également montré des niveaux variables d'activité antimicrobienne contre les souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives. Des extraits d'hexane et de dichlorométhane de parties aériennes d'*A. longa* ont montré un fort effet inhibiteur sur tous les *Rhodococcus* testés, ce qui peut s'expliquer par la présence d'une forte teneur en chlorure d'acide linoléique, d'acide oléique et de limonène-6-ol dans cette plante. Alors qu'aucune activité significative n'a été observée avec l'extrait méthanolique (Talbaoui et al., 2016). D'autres études ont enregistré une teneur élevée en alcaloïdes, ayant une capacité antimicrobienne exercée en interférant avec le processus de réplication de l'ADN et de transcription de l'ARN (Hajj et al., 2016). En outre, des études ont prouvé que les polyphénols associés à la bicouche phospholipidique et de peptidoglycane de la membrane externe des bactéries, réduisent l'intégrité de la membrane cellulaire. Ces composés affectent les activités des enzymes intracellulaires bactériennes en réagissant avec les groupes amino et carboxyle des protéines ainsi qu'avec l'ion de métal de transition chélatant pour inhiber la croissance des bactéries (Chen et al., 2016). En effet, la variation de ces résultats était influencée par le type d'extrait, la structure de la membrane bactérienne, la saison, la concentration et la composition chimique des extraits.

Des études ont rapporté les effets des extraits d'*A. longa* sur la croissance des espèces de champignons. Ils ont démontré que tous les extraits (acétone, méthanol et aqueux) étaient incapables d'inhiber la croissance des champignons testés (*Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936, and *Candida albicans* ATCC 1024) (Merouani et

al., 2017). A l'inverse, l'huile essentielle des racines a inhibé *C. albicans* ATCC 10231 (12,1 mm) (Dhouioui et al., 2016a) en raison de la puissante activité d'un alcane, l'octadécane (Girija et al., 2014).

### 3.3. Activités antidiabétiques

Peu d'études ont évalué l'activité antidiabétique d'*A. longa*. En effet, une autre espèce appartenant à la même famille (*A. indica*) a montré une excellente activité antihyperglycémique qui était corrélée avec des quantités élevées de composés phénoliques connus pour leur pouvoir à inhiber les activités des enzymes hydrolysant les glucides en raison de leur capacité à se lier aux protéines (Karan et al., 2012). De plus, les flavonoïdes ont un potentiel inhibiteur élevé vis-à-vis de l' $\alpha$ -glucosidase (Adefegha and Oboh, 2012). Le  $\beta$ -caryophyllène a significativement diminué la glycémie avec une augmentation des taux d'insuline plasmatique et amélioré les activités modifiées des enzymes métaboliques glucidiques à un niveau proche de la normale (Basha and Sankaranarayanan, 2014). Par ailleurs, Chen et ses collaborateurs ont prouvé que l'acide acétique régule la concentration du glucose sanguin en inhibant l'activité disaccharidase, en améliorant la sensibilité à l'insuline et en favorisant la production de glycogène (Chen et al., 2016).

### 3.4. Activités antioxydantes

De nombreuses études ont étudié la capacité des extraits d'*A. longa* à inhiber les radicaux libres en appliquant la méthode DPPH utilisant le radical DPPH<sup>••</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et la méthode ABTS utilisant le radical ABTS<sup>••</sup> (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)). Ces deux méthodes sont les plus utilisées par la majorité des travaux. Merouani et al. (2017) ont révélé dans leur étude que parmi les trois extraits testés (acétone, méthanol et eau distillée); l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*A. longa* présentait la plus grande capacité antioxydante contre le DPPH et le pouvoir réducteur le plus important (55,04  $\mu$ g/mL et 0,2 mg/mL, respectivement). Tandis que l'extrait d'acétone des parties aériennes a montré la capacité antioxydante la plus élevée dans le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène (57%). Dans un autre travail, l'extrait phénolique de racines d'*A. longa* a

montré un effet bénéfique contre les dommages des radicaux libres par rapport à l'antioxydant standard, Trolox (Djeridane et al., 2006a). D'autre part, l'extrait chloroformique des parties aériennes d'*A. indica* a montré une activité antioxydante significative contre les radicaux DPPH et superoxydes avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 7,325 et 8,498  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Karan et al., 2012). Une autre étude a observé que l'activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle et du méthanol des feuilles d'*A. bracteolata* était la plus puissante dans la méthode ABTS (Badami et al., 2005). D'autre part, une étude *in vivo* a montré que cette plante était bénéfique dans le traitement du stress oxydatif induit par le plomb (Pb) sur le cœur des rats en raison de la grande quantité de composés piègeurs de radicaux chez *A. longa* avec la capacité de don de protons (Samir et al., 2018).

### 3.5. Activités anti-inflammatoires

Une seule étude *in vivo* a testé les extraits d'*A. longa* avec les méthodes de dénaturation des protéines. Effectivement, l'extrait d'acétone des parties aériennes a montré l'inhibition la plus élevée de la dénaturation des protéines (78,35%) suivi de l'extrait de méthanol des fruits (68,04%), ce qui impliquait probablement une altération électrostatique des liaisons hydrogène, hydrophobe et disulfure (Merouani et al., 2017). Rufino et al. (2015) ont examiné l'effet anti-inflammatoire du limonène, qui a inhibé la production d'oxyde nitrique induite par l'IL-1 $\beta$  ( $CI_{50}$  = 85,3  $\mu\text{g/mL}$ ) et diminué l'activation de NF- $\kappa$ B et p38 ainsi que l'expression des gènes inflammatoires (iNOS). En effet, l'acide linoléique a inhibé la transcription des cytokines pro-inflammatoires par la régulation positive du récepteur des proliférateurs de peroxysomes  $\alpha/\gamma$  (Dipasquale et al., 2018). L'AA a interagi directement avec la phospholipase A2, conduisant à la formation de médiateurs inflammatoires locaux, à savoir les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes (Wiart, 2006).

### 3.6. Activités immunostimulantes

L'extrait aqueux d'*A. longa* a montré un effet stimulant de la fonction immunitaire à la fois humorale et cellulaire. En fait, les souris traitées par une dose de 1,25 g/kg ont présenté un nombre élevé de lymphocytes observé dans les différents organes,

indiquant qu'il s'agissait d'une activité immunitaire. Il y avait une augmentation statistiquement significative du titre d'anticorps hémagglutinants et une augmentation non significative de la réponse d'hypersensibilité de type retardé (Benzakour et al., 2011).

#### 4. Etudes toxicologiques d'*Aristolochia longa*

Dans la médecine traditionnelle, *A. longa* est à l'origine de nombreux effets secondaires, notamment des problèmes respiratoires, des vomissements et de la diarrhée. Cette plante a été considérée comme néphrotoxique, cancérigène et mutagène (Abdelgadir et al., 2011). Selon les résultats de l'étude de Benarba et al. (2012), l'extrait aqueux d'*A. longa* était inoffensif à 5 g/kg. Cependant, ces résultats étaient contradictoires avec ceux de Benzakour et ses collaborateurs, qui ont noté une toxicité importante pour le foie, l'intestin et les reins à une dose de 2,25 g/kg/jour (Benzakour et al., 2011). Ces altérations peuvent être dues à des dommages causés par l'AA tels que des lésions tubulo-interstitielles, une infiltration massive de macrophages et de lymphocytes T et B (Pozdzik et al., 2010).

D'autres études ont évalué l'effet protecteur d'*A. longa* sur l'hépatotoxicité aiguë induite par le Pb et ont montré que cette plante inhibe les lésions hépatiques induites par ce matériau. Le mécanisme d'action peut être lié à la réduction des radicaux libres induite par le Pb (Samir et al., 2017). Dans une étude clinique de phase I, des patients recevant de l'AA (0,1 mg/kg/jour) ont présenté une néphrotoxicité sévère, ce qui a limité son utilisation dans les applications cliniques (Jackson, 1964). Egalement, l'effet de cet acide peut être moins toxique en combinaison avec d'autres composés d'*A. longa*. C'est pour cela que d'autres études toxicologiques *in vivo* concernant les principaux composés d'*A. longa* doivent être effectuées afin de déterminer une dose clinique anodine.

## IV. Plantes médicinales aux propriétés anti-oxydantes

### 1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un phénomène causé par un déséquilibre entre un niveau excessif d'ERO et la capacité des antioxydants à neutraliser (détoxifier) ces produits réactifs (Pizzino et al., 2017). Il est à noter que la perturbation peut être causée par des changements de part et d'autre de l'équilibre (par exemple, une génération anormalement élevée des ERO ou des carences dans les défenses antioxydantes) (Burton and Jauniaux, 2011). En effet, l'excès d'oxydants entraîne une diminution des antioxydants. Cela se produit lors de la synthèse d'énergie (ATP) dans les mitochondries *via* la phosphorylation oxydative. Evidemment, une phosphorylation oxydative inefficace peut générer des ERO, conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial (Singh et al., 2019).

L'augmentation du stress oxydatif a été incriminée dans des conditions physiologiques, telles que le vieillissement et la faible activité physique, et dans plusieurs conditions pathologiques, notamment le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies inflammatoires et les intoxications (Preiser, 2012).

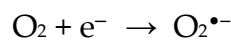
#### 1.1. Espèces réactives de l'oxygène

Le terme «espèces réactives de l'oxygène» s'applique à la fois aux radicaux libres (RL) et à leurs intermédiaires non radicalaires. Les RL sont définis comme des espèces (molécules, ions, ...) ayant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur couche d'électrons la plus externe, et c'est cette couche électronique incomplète qui confère leur haute réactivité (Burton and Jauniaux, 2011). En effet, Les RL sont très instables et très réactifs car ils ont tendance à capturer un électron sur d'autres molécules (oxydation) (SEN, 2001). Leur durée de vie est très courte (de millisecondes à nanosecondes). Les RL sont produits par un transfert d'électrons qui nécessite un apport d'énergie élevé (Cheeseman and Slater, 1993). En effet, les ERO sont produits en continu, qu'elles soient d'origine exogène (exposition aux rayonnements, polluants atmosphériques, la fumée, l'alcool) ou endogène

(métabolisme de l'oxygène) (Thomas, 2000). De toute évidence, les organismes aérobies ont besoin de dioxygène (O<sub>2</sub>) car cette molécule agit comme un accepteur d'électrons lors de l'oxydation des substrats énergétiques (glucides et lipides). Paradoxalement, le dioxygène est une menace permanente (Jenkins, 1988).

#### 1.1.1. Ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

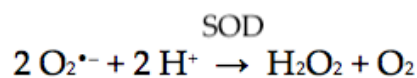
Pendant le métabolisme de l'oxygène, le dioxygène reçoit un électron. Il est ensuite converti en un ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (SEN, 2001). Suite à ce processus, 2 à 5% de la consommation d'oxygène sont convertis en O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.



Ce radical n'est pas très réactif mais représente le précurseur d'autres espèces plus agressives. L'ajout de deux ions hydrogène (2H<sup>+</sup>) produit du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 1.1.2. Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène est en fait produit en grande partie à partir du radical superoxyde et est catalysé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). En fait, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre car il n'a pas d'électrons non appariés, mais il est considéré comme une ERO en raison de sa toxicité et de sa capacité à provoquer la formation des ERO. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires.



#### 1.1.3. Radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

Cette ERO est très réactive et très toxique et il n'y a pas d'antioxydant spécifique contre ce radical libre. C'est le produit de la réaction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec des ions métalliques comme par exemple l'ion Fe<sup>2+</sup>. Ce radical provoque l'oxydation des protéines (Leeuwenburgh et al., 1999). C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme.

#### 1.1.4. Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )

L'oxygène singulet est une ERO capable de réagir efficacement avec les constituants cellulaires. Il peut être produit de manière endogène, *via* des processus biochimiques (réactions enzymatiques), ou exogène par des réactions de photosensibilisation (rayonnement UV).

### 1.2. Effets biologiques des ERO

#### 1.2.1. Effets positifs

Les ERO sont impliquées dans le phénomène d'immunité, notamment en agissant contre les antigènes au cours de la phagocytose (Jenkins, 1988; Rimbach et al., 1999; Fehrenbach and Northoff, 2001). Ce rôle augmente au cours de l'inflammation. Bien que la plupart des études se soient concentrées sur les effets nocifs des RL, les ERO jouent un rôle important dans les signaux cellulaires ou dans la biogenèse des cellules car elles peuvent servir de messagers cellulaires ou modifier le statut d'oxydoréduction (redox) (Sen and Packer, 1996; Rimbach et al., 1999; SEN, 2001; Linnane et al., 2002). Les ERO sont également connues pour être impliquées dans l'activation enzymatique, dans la désintoxication des médicaments ou dans la facilitation de la réplétion du glycogène (Jenkins, 1988). Elles ont également un rôle essentiel dans la contraction musculaire (Coombes et al., 2001; Reid, 2001). Ce rôle a été souligné car l'inhibition de la production des ERO entraîne une perte de la force contractile des fibres musculaires (Andrade et al., 1998; Coombes et al., 2001; Reid, 2001).

#### 1.2.2. Effets négatifs

Malgré certains effets utiles, les ERO peuvent avoir des effets nocifs car elles peuvent modifier la taille et la forme des composés avec lesquels elles interagissent (Jenkins, 1988; Alessio, 1993; Pietta, 2000; Cooper et al., 2002). Par conséquent, elles peuvent induire l'apoptose des cellules saines et provoquer l'inflammation ou l'altération des fonctions cellulaires. Toutes ces atteintes participent à certaines pathologies dégénératives telles que la cataracte, les cancers, les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson ou encore au vieillissement cellulaire (Golden et al., 2002).



### 1.2.2.1. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipoprotéines est un facteur important dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Vasankari et al., 1997; Young and McEneny, 2001). En fait, les ERO initient l'oxydation des lipoprotéines, en particulier l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Morel et al., 1983). Cette oxydation dépend de la capacité antioxydante du sang (Ma et al., 1994; Terentis et al., 2002). Les ERO ont également la capacité d'oxyder les acides gras polyinsaturés (AGPI), qui participent à la constitution de la membrane cellulaire (Alessio, 1993; Cheeseman and Slater, 1993). Cette réaction initie la peroxydation lipidique (oxydation des lipides insaturés), une réaction en chaîne qui produit d'autres RL tels que ROO• ou ROOH• et des substances telles que les diènes conjugués (hydrocarbures) ou le malondaldéhyde (MDA) (Young and McEneny, 2001), ce qui fait de ce dernier un bio-marqueur couramment utilisé dans l'estimation de la peroxydation lipidique. La peroxydation des lipides modifie la fluidité des membranes cellulaires, réduit la capacité à maintenir un gradient de concentration équilibré et augmente également la perméabilité et l'inflammation de la membrane (RADak et al., 1999). Par conséquent, il est possible de détecter une perte de liquides intracellulaires, une diminution du transport du calcium dans le réticulum endoplasmique, des altérations des fonctions mitochondriales et des altérations cellulaires (Jenkins, 1988). Chaque type de cellule peut être endommagé par les ERO, y compris les cellules musculaires et les globules rouges (Tavazzi et al., 2000).

### 1.2.2.2. Oxydation des protéines

Les ERO peuvent également oxyder le sang et les protéines structurales (Szweda et al., 2002). Au cours de l'oxydation, les protéines peuvent perdre des acides aminés ou être fragmentées. Ces réactions entraînent une altération des protéines structurales ou une altération des fonctions enzymatiques (RADak et al., 1999). L'oxydation des protéines et des acides aminés s'accompagne d'une augmentation globale du niveau relatif des groupes carbonyles (Cheeseman and Slater, 1993; Packer, 1997; Levine, 2002), et des acides aminés oxydés (Leeuwenburgh et al., 1999; Stadtman and Levine,

2000), qui sont utilisés comme indices généraux pour l'apparition de dommages oxydatifs (Berlett and Stadtman, 1997; Leeuwenburgh et al., 1999; RADak et al., 1999). L'oxydation des protéines peut être la conséquence d'une inflammation, d'un exercice physique ou d'une ischémie-reperfusion (Stadtman and Levine, 2000; Levine, 2002). Les protéines oxydées sont dégradées afin de reformer les acides aminés mais les sous-produits carbonylés ne peuvent pas entrer dans ce processus. Par conséquent, ils induisent un blocage de la protéolyse et une accumulation de protéines oxydées (Renke et al., 2000; Levine, 2002). Par conséquent, le renouvellement des protéines et la transcription génétique sont réduits sous l'action des ERO. Ces dernières ont également la capacité de modifier le système lysosomal et les protéasomes, deux voies principales par lesquelles les protéines sont dégradées (Szweda et al., 2002).

#### 1.2.2.3. Oxydation de l'ADN

Les ERO sont également connus pour provoquer des cassures de brins d'ADN et des dommages de réparation de base (Jenkins, 1988; Alessio, 1993; Packer, 1997; Wallace, 2002). Chaque partie de l'ADN est susceptible d'être attaquée par les ERO (Dizdaroglu et al., 2002). Le système de réparation de l'ADN est continu, mais sa capacité peut être dépassée ou les processus de réparation peuvent être altérés (Beckman and Ames, 1997; Wallace, 2002). En conséquence, l'oxydation de l'ADN peut provoquer une mutagenèse et est un contributeur majeur au cancer humain et au vieillissement cellulaire (RADak et al., 1999; Fehrenbach and Northoff, 2001; Kasai, 2002; Wallace, 2002). Différentes sources majeures de dommages à l'ADN ont été découvertes à la suite du tabagisme, de l'inflammation chronique et des fuites dans les mitochondries (Alessio, 1993; Beckman and Ames, 1997; Kasai, 2002).

## **2. Antioxydants**

Un antioxydant peut être défini comme une substance qui aide à réduire la gravité du stress oxydatif soit en formant un radical moins actif, soit en désactivant la réaction en chaîne des RL nuisibles sur des substrats tels que les protéines, les lipides, les glucides ou l'ADN (Dekkers et al., 1996). Une gamme d'antioxydants est active dans le corps, y compris des antioxydants enzymatiques (endogènes) et non enzymatiques (principalement apportés par les aliments) (Powers and Lennon, 1999). Tous peuvent être des antioxydants intracellulaires ou extracellulaires. Les enzymes antioxydantes comprennent la SOD, la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX). Les antioxydants non enzymatiques comprennent une variété de désactivants de RL tels que la vitamine A (rétinol), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocophérol) et des micronutriments (fer, cuivre, zinc, sélénium, manganèse), qui agissent comme cofacteurs enzymatiques. L'efficacité du système antioxydant dépend des apports nutritionnels (vitamines et micronutriments) et de la production d'enzymes antioxydantes endogènes, qui peuvent être modifiées par l'exercice physique, la nutrition et le vieillissement (Dekkers et al., 1996).

### **2.1. Antioxydants enzymatiques**

#### **2.1.1. Superoxyde dismutase**

La SOD est la principale défense contre les radicaux superoxydes et la première ligne de défense contre le stress oxydatif. Cependant, comme déjà indiqué, elle provoque l'apparition de  $H_2O_2$  (Fullerton et al., 1998). Dans toutes les cellules, au repos, la majeure partie de l' $O_2^{\bullet-}$  est réduite par la SOD mitochondriale et l'autre partie se diffuse dans le cytosol (Das et al., 1997). Dans les cellules musculaires, 65 à 85% de l'activité de la SOD se fait dans le cytosol (Powers and Lennon, 1999).

#### **2.1.2. Catalase**

La CAT est présente dans chaque cellule et en particulier dans les peroxysomes, structures cellulaires qui utilisent l'oxygène pour détoxifier les substances toxiques et produire du  $H_2O_2$  (Antunes et al., 2002). La catalase convertit  $H_2O_2$  en eau et oxygène. La catalase peut également utiliser  $H_2O_2$  pour détoxifier certaines substances

toxiques *via* une réaction à la peroxydase. Cette réaction nécessite un substrat tel que le phénol, l'alcool ou l'acide formique.

### **2.1.3. Glutathion peroxydase**

Le GPX présent dans le cytosol cellulaire et les mitochondries a la capacité de transformer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau. Cette réaction utilise le glutathion et le transforme en glutathion oxydé. GPX et CAT ont la même action sur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais le GPX est plus efficace avec une concentration élevée des ERO, et la CAT a une action importante avec une concentration plus faible de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jenkins and Goldfarb, 1993; Antunes et al., 2002).

## **2.2. Antioxydants non enzymatiques**

### **2.2.1. Vitamine E (tocophérol)**

La vitamine E est une vitamine liposoluble composée de plusieurs isoformes appelées tocophérols. L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active et la plus abondante (Fuchs et al., 2003). La vitamine E est connue pour être l'antioxydant de rupture de chaîne le plus important, en raison de son abondance dans les cellules et les membranes mitochondriales et de sa capacité à agir directement sur les ERO (Evans, 2000). Cette vitamine interagit avec de nombreux antioxydants tels que la vitamine C, le  $\beta$ -carotène ou l'acide lipoïque. Ces antioxydants ont la capacité de régénérer la vitamine E à partir de sa forme oxydée (Coombes et al., 2001). La vitamine E joue un rôle important dans les membranes cellulaires car elle arrête la peroxydation lipidique. La structure moléculaire de la vitamine E permet l'inactivation des ERO dans un environnement lipidique.

### **2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)**

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble et est probablement l'antioxydant le plus important dans les fluides extracellulaires, mais elle est également efficace dans le cytosol (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). La vitamine C est plus abondante dans les tissus où la production des ERO est plus importante. Ce phénomène est défini comme une adaptation au stress oxydatif (Palmer et al., 2003). Dans les fluides, la vitamine C a la capacité de neutraliser les ERO (Bigard, 2001). À l'intérieur des

cellules, la vitamine C renforce l'action de la vitamine E et du glutathion en régénérant leur forme active après avoir réagi avec les ERO (Ma et al., 1994; Ashton et al., 1999; Evans, 2000). La vitamine C a également la capacité de piéger les ions cuivre, qui ont une puissante action oxydante. Ainsi, la supplémentation en vitamine C a souvent été étudiée.

### **2.2.3. $\beta$ -carotène et vitamine A (rétinol)**

La vitamine A est une vitamine liposoluble présente dans de nombreuses substances lipidiques. Le  $\beta$ -carotène, présent dans les membranes cellulaires, est converti en vitamine A lorsque l'organisme en a besoin. Bien que son mécanisme d'action *in vivo* ne soit pas clair, le  $\beta$ -carotène est suggéré pour désactiver les ERO (en particulier l'oxygène singulet et les radicaux lipidiques) et pour réduire la peroxydation lipidique (Ozhogina and Kasaikina, 1995; Powers and Lennon, 1999). Bien que moins important que la vitamine E dans le système antioxydant, le  $\beta$ -carotène et la vitamine A agissent en combinaison avec la vitamine C et la vitamine E afin de protéger les cellules contre les ERO (Livrea et al., 1995).

### **3. Propriétés antioxydantes des plantes médicinales marocaines**

Les antioxydants synthétiques largement utilisés dans la conservation des aliments sont impliqués dans la carcinogenèse (Ljubuncic et al., 2005). Cette situation nécessite la recherche d'antioxydants naturels. Les plantes médicinales sont une véritable source de criblage de molécules antioxydantes. L'évaluation des propriétés antioxydantes doit se focaliser sur certaines techniques expérimentales pour déterminer l'efficacité d'extraits ou de molécules. Au Maroc, plusieurs études ont porté sur l'évaluation des propriétés antioxydantes de produits extraits de plantes médicinales (Bouyahya et al., 2017). En général, ces effets sont fortement corrélés aux composés phénoliques des plantes testés.

Les produits végétaux sont certainement des mélanges de molécules aux propriétés chimiques extrêmement différentes. Cette diversité chimique peut conduire à une dispersion des résultats selon la méthode utilisée pour estimer l'activité

antioxydante. C'est pourquoi l'utilisation de plusieurs techniques pour cribler les effets antioxydants est fortement recommandée (Takebayashi et al., 2010).

Plusieurs méthodes *in vitro* telles que le piégeage du radical DPPH, la capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), la réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> et la capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC) sont les plus utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant des plantes marocaines.

### 3.1. Extraits de plantes

Plusieurs investigations ont montré des effets antioxydants importants pour certaines plantes telles que *Centaurium erythraea* qui est largement utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies comme le diabète. L'extrait méthanolique de cette plante a montré une capacité antioxydante importante ( $CI_{50} = 58,34 \pm 2,86 \mu\text{g/mL}$ ) en utilisant le test DPPH (Bouyahya et al., 2017e). Ces propriétés antioxydantes expliquent en partie comment les traitements à base de *C. erythraea* agissent contre le diabète. En effet, plusieurs études ont confirmé la relation entre le diabète et le stress oxydatif (Rochette et al., 2014). Ainsi, les agents antioxydants peuvent avoir des applications cruciales dans le domaine du cancer, car cette maladie est fortement liée au stress oxydatif aux premiers stades de sa genèse (Andrisic et al., 2018). L'implication du stress oxydatif dans la cancérisation est principalement liée aux dommages des macromolécules dont l'ADN prédisposant à la transformation tumorale (Mena et al., 2009).

D'autre part, des extraits d'acétate d'éthyle, d'éther de pétrole et d'éthanol de *Pennisetum glaucum* ont été testés pour leurs activités antioxydantes par trois méthodes différentes (TEAC, DPPH et FRAP) (Marmouzi et al., 2018). Les résultats ont montré une variabilité significative entre les extraits de plantes et la méthode expérimentale utilisée. Dans une autre étude, Bouyahya et al. (2016a) ont évalué l'activité antioxydante de quatre extraits de feuilles d'*Arbutus unedo* avec l'enregistrement de la plus grande capacité à réduire le radical DPPH par l'extrait de n-hexane ( $CI_{50} = 73,73 \mu\text{g/mL}$ ). De plus, l'extrait méthanolique d'*O. compactum* a

montré une  $CI_{50}$  de 48,34  $\mu\text{g/mL}$ , déterminée par le test DPPH (Bouyahya et al., 2017). Additionnellement, les extraits obtenus avec de l'acétate d'éthyle et de l'éther diéthylique des parties aériennes de *Ptychotis verticillata* avaient une puissante activité antioxydante contre le radical DPPH avec une valeur  $CI_{50}$  de 0,64 et 0,92  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Tomi et al., 2011). Par ailleurs, El Bouzidi et ses collaborateurs ont déterminé l'activité antioxydante des extraits de racines et de feuilles de *Withania frutescens* (L.) Pauquy, en utilisant les tests DPPH et FRAP. Par conséquent, les fractions de feuilles d'acétate d'éthyle et de n-butanol ont présenté l'activité de piégeage des radicaux DPPH la plus élevée avec une  $CI_{50}$  de  $4,53 \pm 0,12$  et  $8,49 \pm 0,46$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Bouzidi et al., 2011). De plus, les extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-indica* obtenues par différentes méthodes d'extraction ont présenté un potentiel antioxydant élevé en utilisant la méthode ORAC (Benayad et al., 2014). En effet, les méthodes d'extraction adoptées ont une grande influence sur l'activité antioxydante observée. Ramchoun et ses collègues ont examiné l'activité antioxydante de l'extrait aqueux, des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux d'une espèce de *Thymus* (*T. satureioides*), collectée dans la région de Tafilalet (Ramchoun et al., 2015). En conséquence, une bonne activité antioxydante a été enregistrée pour le piégeage des radicaux DPPH avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 0,480; 0,418 et 43,891  $\text{mg/mL}$  pour l'extrait aqueux, les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux, respectivement. Concernant le test FRAP, des valeurs de 50,79; 117,51; 7,03 et 44,33  $\text{mmol trolox/g}$  ont été notées pour l'extrait aqueux, les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et le trolox, respectivement.

Six variétés de dattes marocaines (*Phoenix dactylifera* L.) localement connues sous les noms de *Majhoul*, *Jihl*, *Boufgous*, *Bousthammi*, *Bousrdon* et *Bouskri* ont également été examinées pour leur activité antioxydante à l'aide de tests DPPH et FRAP (Bammou et al., 2016). Parmi les variétés de ces fruits testés, *Jihl* avait l'activité la plus élevée par rapport aux autres. Il avait une valeur de  $CI_{50}$  de 2,05  $\text{g/L}$  pour l'activité de piégeage du DPPH et de 860,89  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de poids sec pour le pouvoir réducteur ferrique.

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques et plus particulièrement aux flavonoïdes. L'activité antioxydante de ces composés est en grande partie due à leurs propriétés redox (Leopoldini et al., 2004; Soobrattee et al., 2005). En ce sens, de nombreuses études ont rapporté la présence d'une corrélation étroite entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits végétaux (Zainol et al., 2003; Tawaha et al., 2007). Cependant, l'activité antioxydante d'une plante ne dépend pas seulement des composés phénoliques, mais également d'autres composés chimiques (Dorman et al., 2003). En effet, les terpènes possèdent également un pouvoir antioxydant important, en particulier dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Grassmann et al., 2002).

### 3.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles des plantes médicinales marocaines ont également été étudiées pour leurs effets antioxydants. Bouhdid et ses collaborateurs ont testé l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* en utilisant les méthodes FRAP et DPPH, et le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène (Bouhdid et al., 2008). Cette huile essentielle a montré un effet plus élevé que certains standards antioxydants tels que l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé (BHT). L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, plante longtemps utilisée par les Marocains dans le traitement de certaines maladies, a été testée par la méthode DPPH. Les auteurs ont constaté que cette huile a une forte activité antioxydante ( $CI_{50} = 23,79 \mu\text{L/mL}$ ) (Gardeli et al., 2008). Cette valeur est significativement comparable à celle trouvée par des extraits de *P. lentiscus* ( $CI_{50} = 11 \mu\text{g/mL}$ ) (Houbairi et al., 2015). Dans une étude menée par Jamali et al. (2012), il a été noté que les huiles obtenues à partir de *Thymus leptobotrys* et de *Thymus maroccanus* (riches en carvacrol) possédaient les activités antioxydantes les plus élevées, parmi d'autres espèces sauvages de *Thymus*, avec des valeurs de  $CI_{50}$  pour le test DPPH de 25,37 et 60,72  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement, tandis que les valeurs de  $CE_{50}$  pour le test FRAP étaient de 19,24 et 139,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. L'huile essentielle de *T. serpyllum* n'était pas active. De plus, les



huiles essentielles de trois populations sauvages marocaines de *T. saturejoides* collectées dans le nord-ouest-sud-est du Maroc ont montré des activités importantes avec des valeurs  $CI_{50}$  de 44,54; 22,90 et 19,17  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Kasrati et al., 2014). Une comparaison des parties aériennes des huiles essentielles de *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* sauvage et cultivée a été effectuée et a démontré que l'huile de sauge marocaine cultivée présentait l'activité antioxydante la plus élevée par rapport à celle sauvage (Khiyari et al., 2014). Dans une autre étude qui a examiné l'impact de la domestication sur les activités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill) cultivées et sauvages, il a été trouvé, pour les deux tests appliqués dans cette étude (DPPH et pouvoir réducteur), que les huiles essentielles obtenues à partir des plantes sauvages présentaient le pouvoir antioxydant le plus important ( $CI_{50}$ :  $10,62 \pm 0,33$  et  $29,49 \pm 0,52$   $\text{mg/mL}$ ) par rapport à celles extraites des plantes cultivées ( $CI_{50}$ :  $13,08 \pm 0,34$  et  $32,30 \pm 0,02$   $\text{mg/mL}$ ) (Abdellaoui et al., 2017). Aussi, l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des parties aériennes d'*O. compactum* en trois stades phénologiques (végétatif, floraison et post-floraison) était très importante avec la plus forte activité obtenue à partir de l'HE extraite au stade post-floraison (Bouyahya et al., 2017c). Les auteurs ont également découvert que l'huile essentielle de *Myrtus communis* a montré une grande efficacité dans le piégeage du radical DPPH ( $CI_{50} = 0,24$   $\text{mg/mL}$ ), suivie de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* ( $CI_{50} = 0,46$   $\text{mg/mL}$ ).

En revanche, Les huiles essentielles présentent généralement une grande variabilité dans la nature de leurs composés chimiques. Cette variabilité explique en partie les effets antioxydants obtenus. Comme déjà mentionné, les terpènes présentent un pouvoir antioxydant remarquable (Wansi et al., 2010). En outre, les huiles essentielles à haute teneur en thymol et carvacrol comme celles d'*O. compactum* ont montré une forte capacité antioxydante. Plusieurs études ont révélé que ces deux molécules ont de puissants pouvoirs antioxydants dans les systèmes alimentaires et biologiques (Foti and Ingold, 2003). La présence d'autres composés majeurs comme le  $\gamma$ -terpinène et le *p*-cymène doit être prise en considération, puisque ces deux molécules

ont également montré une grande capacité à piéger les radicaux libres comme le DPPH (Foti and Ingold, 2003). Des travaux de recherche ont établi une corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des huiles essentielles. D'autres études comme celle de Čavar et al. (2008), ont attribué l'activité de piégeage des radicaux DPPH de l'HE de *Satureja montana* à des niveaux élevés de carvacrol et de thymol.

## V. Plantes médicinales aux propriétés antidiabétiques

### 1. Glucides

Les glucides alimentaires constituent la principale source exogène de glucose, le nutriment le plus utilisé comme source d'énergie pour les cellules. Ils sont hydrophiles et nécessitent une série de réactions pour les dégrader en monosaccharides absorbables dans l'intestin grêle. En effet, les glucides se composent de trois groupes principaux; les glucides simples appelés monosaccharides (le glucose, le fructose et le galactose), les disaccharides qui sont créés par la condensation de deux monosaccharides (lactose, saccharose et maltose) et les glucides complexes appelés polysaccharides (amidon, glycogène et cellulose). En outre, le glucose absorbé dans l'intestin représente environ 80% des produits de digestion des glucides, tandis que le fructose et le galactose ne représentent que 20%. Ces deux derniers sont transformés en glucose par le foie (Tortora and Grabowski, 2001).

#### 1.1. Digestion des glucides

La digestion commence dans la bouche avec de l' $\alpha$ -amylase salivaire, synthétisée dans les cellules séreuses des glandes salivaires à la suite du processus de mastication. Cette enzyme digestive transforme les amidons en sucres simples. Elle est sensible au pH et est donc inhibée par l'acidité gastrique. Seulement 5% de l'amidon est décomposé par l' $\alpha$ -amylase salivaire en raison d'une exposition limitée. Une fois dans le tractus intestinal, l'amidon résiduel est hydrolysé par l' $\alpha$ -amylase pancréatique en composants simples (p.ex. maltose) qui seront à leur tour convertis

en glucose par les  $\alpha$ -glucosidases (maltase) présentes dans les microvillosités (bordure en brosse) des cellules intestinales (Marze, 2017).

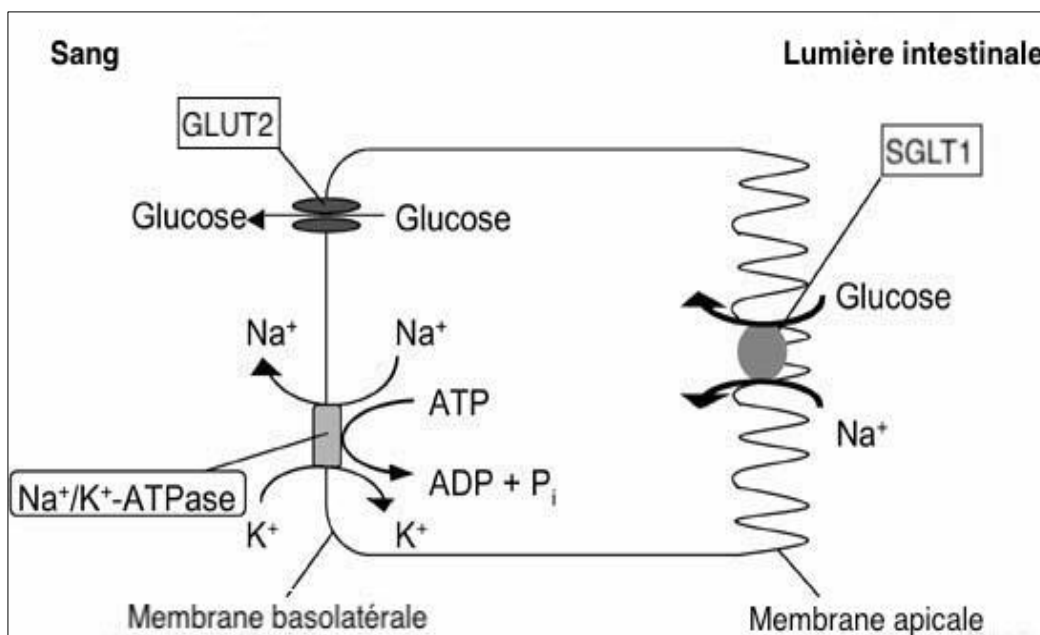
Les autres disaccharides (saccharose, lactose) seront hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes *via* des enzymes spécifiques ( $\alpha$ -glucosidase et  $\beta$ -galactosidase) avec la formation de monosaccharides correspondants. En effet, le maltose est hydrolysé en deux molécules de glucose par l' $\alpha$ -glucosidase (la maltase), alors que l'hydrolyse du saccharose en glucose + fructose se fait par  $\beta$ -fructosidase (la saccharase) ou l' $\alpha$ -glucosidase. Le lactose est hydrolysé en glucose + galactose *via* la  $\beta$ -galactosidase (lactase intestinale du nourrisson). Pour les celluloses, elles sont hydrolysées par la  $\beta$ -glucosidase (la cellulase), absente chez l'homme. Effectivement, les celluloses ne sont pas digérées dans l'intestin grêle humain et atteignent le côlon intact (Holloway et al., 1978).

## 1.2. Absorption des glucides

Une fois les glucides digérés, les produits doivent être absorbés et transportés vers la circulation sanguine en traversant les cellules épithéliales de l'intestin grêle. Du fait que la bicouche lipidique de la membrane plasmique de ces cellules est imperméable aux molécules hydrophiles, le glucose est transporté à travers cette membrane par des protéines associées, les transporteurs de glucose. Il existe 2 types différents de protéines de transport, qui interviennent dans le transfert du glucose et d'autres sucres à travers la bicouche lipidique, à savoir les co-transporteurs sodium-glucose (SGLT) et les transporteurs GLUT (transport facilité) (Bell et al., 1990).

En effet, le SGLT1 situé dans la membrane apicale de l'épithélium intestinal catalyse l'entrée du glucose et du galactose dans les entérocytes. En principe, l'absorption du glucose se fait toujours en couple avec les ions  $\text{Na}^+$  (Lecleire, 2008). Par la suite, un gradient de sodium, généré par une pompe sodium-potassium ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) située à la membrane baso-latérale de l'entérocyte, fournit l'énergie permettant au glucose de quitter la cellule *via* un transporteur de glucose facilité (GLUT2) situé dans cette membrane (baso-latérale).

Concernant la pénétration du fructose dans les entérocytes du côté apical de la membrane, elle est effectuée *via* le GLUT5, alors que le GLUT2 déplace le fructose vers les vaisseaux sanguins du côté baso-latéral (Harmon and McLeod, 2001) (Figure 2). Le glucose final absorbé sera immédiatement utilisé par les cellules, ou stocké sous forme de glycogène. En cas de jeûne ou d'effort physique, ce glycogène se transforme à nouveau en glucose (Tortora and Grabowski, 2001).



**Figure 2:** Transport du glucose dans l'épithélium intestinal (Scheepers et al., 2004)

## 2. Diabète sucré

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie résultant d'anomalies de la sécrétion d'insuline, de l'action de l'insuline ou des deux (Lonappan et al., 2007). Il a été signalé pour la première fois dans un manuscrit égyptien il y a environ 3000 ans (Ahmed, 2002). C'est l'une des maladies endocriniennes les plus courantes dans le monde, et le nombre de personnes atteintes de diabète a été enregistré à 422 millions en 2014 (OMS, 2016).

## 2.1. Complications du diabète sucré

L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme, un dysfonctionnement et une défaillance de divers organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (Krasteva et al., 2011). Plusieurs processus pathogènes sont impliqués dans le développement du diabète. Ceux-ci vont de la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  du pancréas avec une déficience en insuline consécutive à des anomalies qui entraînent une résistance à l'action de l'insuline. La base des anomalies du métabolisme des glucides, des graisses et des protéines dans le diabète est une action déficiente de l'insuline sur les tissus cibles (Jia et al., 2018). Une action insuffisante de l'insuline résulte d'une sécrétion d'insuline inadéquate et/ou d'une diminution des réponses tissulaires à l'insuline en un ou plusieurs points des voies complexes de l'action hormonale (Rorsman and Braun, 2013). De plus, l'altération de la sécrétion d'insuline et les anomalies de son action coexistent fréquemment chez le même patient, et on ne sait souvent pas quelle anomalie est la cause principale de l'hyperglycémie. Les symptômes d'une hyperglycémie marquée comprennent la polyurie, la polydipsie, la perte de poids, parfois accompagnée de polyphagie et une vision trouble (Bhatt et al., 2019). Les conséquences aiguës et potentiellement mortelles d'un diabète incontrôlé sont l'hyperglycémie avec acidocétose ou le syndrome hyperosmolaire non cétosique (Orban and Ichai, 2008). Les complications à long terme du diabète comprennent la rétinopathie avec une perte potentielle de vision, néphropathie conduisant à une insuffisance rénale, neuropathie périphérique avec risque d'ulcère du pied, d'amputations et d'articulations de Charcot, et neuropathie autonome provoquant des symptômes gastro-intestinaux, génito-urinaires et cardiovasculaires et un dysfonctionnement sexuel (Tripathi and Srivastava, 2006). Les patients diabétiques ont une incidence accrue de maladies cardiovasculaires, artérielles périphériques et cérébrovasculaires. L'hypertension et les anomalies du métabolisme des lipoprotéines sont souvent observées chez les personnes atteintes de diabète (Monnier and Thuan, 2007).

## 2.2. Classification du diabète sucré

Il existe trois principaux types de diabète sucré, mais la grande majorité des cas de diabète appartiennent à deux grandes catégories; le diabète de type 1 et de type 2.

### 2.2.1. Diabète sucré de type 1

Cette forme de diabète, qui ne représente que 5 à 10% des personnes atteintes de diabète, appelée précédemment diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile (Bimstein et al., 2019), résulte d'une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  pancréatiques, entraînant une carence en insuline (Awuchi et al., 2020). Cette destruction a de multiples prédispositions génétiques et est également liée à des facteurs environnementaux encore mal définis. Dans cette forme de diabète, le taux de destruction des cellules  $\beta$  est assez variable, étant rapide chez certains individus (principalement les nourrissons et les enfants) et lent chez d'autres (principalement les adultes). Certains patients, en particulier les enfants et les adolescents, peuvent présenter une acidocétose comme première manifestation de la maladie. D'autres présentent une hyperglycémie à jeun modeste qui peut rapidement se transformer en hyperglycémie sévère et/ou acidocétose en présence d'une infection ou d'un autre stress. D'autres encore, en particulier les adultes, peuvent conserver une fonction cellulaire résiduelle suffisante pour prévenir l'acidocétose pendant de nombreuses années; ces personnes finissent par devenir dépendantes de l'insuline pour survivre et sont à risque d'acidocétose. A ce dernier stade de la maladie, il y a peu ou pas de sécrétion d'insuline, comme en témoigne des taux faibles ou indétectables de peptide-C (molécule précurseur de l'insuline). Le diabète immunitaire survient généralement pendant l'enfance et l'adolescence, mais il peut survenir à tout âge, même au cours des 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> décennies de la vie.

Le diagnostic doit être posé rapidement pour démarrer l'insulinothérapie (injection d'insuline exogène) et préserver autant et aussi longtemps que possible les quelques cellules  $\beta$  restantes intactes.

### 2.2.2. Diabète sucré de type 2

Le diabète de type 2 (anciennement connu comme diabète non insulino-dépendant ou diabète de l'adulte) est la forme la plus courante du diabète sucré caractérisée par une hyperglycémie, une résistance à l'insuline et une carence relative en insuline (Morze et al., 2018). Cela entraîne une diminution du transport du glucose dans le foie, les cellules musculaires et les cellules adipeuses. Bien que les étiologies spécifiques ne soient pas connues, la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  ne se produit pas.

Le diabète de type 2 résulte de l'interaction entre des facteurs de risque génétiques, environnementaux et comportementaux (Chen et al., 2012). Les personnes atteintes du diabète de type 2 sont plus vulnérables à diverses formes de complications à court et à long terme, et souvent tout au long de leur vie. Ces personnes n'ont pas besoin de traitement à l'insuline pour survivre.

D'une part, le diabète de type 2 est principalement dû à des facteurs liés au mode de vie et à la génétique (Ripsin et al., 2009). Il s'agit de l'inactivité physique, du mode de vie sédentaire, du tabagisme et de la consommation excessive d'alcool (Hu et al., 2001). On a constaté que l'obésité contribuait à environ 55% des cas de diabète de type 2 (CDC, 2004). Les toxines environnementales peuvent contribuer aux récentes augmentations du taux de diabète de type 2. Une faible corrélation positive a été trouvée entre la concentration du bisphénol A, un constituant de certains plastiques, dans l'urine et l'incidence du diabète de type 2 (Lang et al., 2008).

D'autre part, il existe une forte connexion génétique héréditaire dans le diabète de type 2; le fait d'avoir des parents avec ce type de diabète augmente considérablement les risques de développer un diabète de ce type. La concordance entre les jumeaux monozygotes est proche de 100% et environ 25% des personnes atteintes de la maladie ont des antécédents familiaux de diabète (Rother, 2007). De plus, l'obésité (qui est un facteur de risque indépendant pour le diabète de type 2) est fortement héréditaire (Walley et al., 2006). Les formes monogéniques comme le diabète de début de maturité des jeunes (MODY), constituent jusqu'à 5% des cas (Camastra et

al., 1999). Il existe de nombreuses conditions pathologiques qui peuvent potentiellement provoquer ou aggraver le diabète de type 2. Il s'agit notamment de l'obésité, de l'hypertension, d'un taux de cholestérol élevé et du syndrome métabolique (également connue sous le nom de syndrome X, syndrome de Reaven) (Kg et al., 2005). Le diabète se trouve aussi associé à l'acromégalie, le syndrome de Cushing, la thyrotoxicose, le phéochromocytome, la pancréatite chronique et le cancer (Olokoba et al., 2012). Les autres facteurs qui augmentent le risque de diabète de type 2 comprennent le vieillissement (Jack et al., 2004), les régimes riches en graisses et un mode de vie moins actif (Lovejoy, 2002).

### **2.2.3. Diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel, présent dans 2 à 4% des grossesses, est caractérisé par le développement d'une intolérance au glucose pendant la grossesse (Jangid et al., 2017). Ce diabète est entièrement traitable, mais nécessite une surveillance médicale attentive tout au long de la grossesse, notamment une surveillance de la glycémie, une alimentation adéquate et, dans certains cas, une insulinothérapie. Cependant, cette forme de diabète peut parfois avoir des conséquences néfastes sur le nouveau-né ainsi que sur la mère (OMS, 1999).

### **2.3. Physiopathologie du diabète sucré**

Chaque fois que quelqu'un prend un repas, la glycémie augmente, ce qui stimule la sécrétion d'insuline, entraînant une augmentation du transport, de la biotransformation et du stockage dans les muscles et les tissus adipeux. Dans des conditions de jeûne, le glucose dans le sang est fourni par le foie qui est utilisé par le cerveau, sans aucune dépendance à l'insuline. Outre le stockage du glucose, l'insuline inhibe également la sécrétion de glucagon et abaisse la concentration d'acides gras sériques, entraînant une baisse de la production hépatique du glucose (Kangralkar et al., 2010). Une insuline insuffisante ou une résistance à l'insuline dans le corps entraîne une réduction de l'absorption tissulaire du glucose, ce qui entraîne une hypoglycémie intracellulaire et une hyperglycémie extracellulaire. L'hypoglycémie intracellulaire provoque une glucogénèse et une gluconéogenèse qui



conduisent à une dégradation des graisses (provoquant une acidocétose diabétique) et diminuent la synthèse des protéines et des gamma globulines (provoquant une cachexie, une polyphagie et une altération de la cicatrisation des plaies), tandis que l'hyperglycémie extracellulaire entraîne un coma hyperglycémique et une diurèse osmotique (Ozougwu et al., 2013).

### **3. Effet des plantes sur le diabète**

Le diabète sucré nécessite un diagnostic accompagné d'une prise en charge médicale avec modification du mode de vie, bien qu'à l'heure actuelle aucun traitement efficace n'ait été découvert. Il existe de nombreux médicaments de synthèse pour le traitement symptomatique du diabète, mais aucun d'entre eux n'est en mesure de cibler définitivement l'origine de la maladie. Les traitements symptomatiques courants comprennent l'injection régulière d'insuline ou l'administration orale de médicaments antidiabétiques, tels que les sulfonylurées et les glinides (forcer le pancréas à sécréter de l'insuline), les biguanides (améliorer la sensibilité à l'insuline), les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase, les thiazolidinediones (agonistes de PPAR- $\gamma$ ), les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) (enzyme qui inactive les incrétines), les inhibiteurs du SGLT2 (induire une glycosurie *via* l'inhibition de la réabsorption du glucose dans le tube contourné proximal), et l'administration parentérale d'agonistes du glucagon-like peptide-1 (GLP-1), qui peuvent provoquer des effets secondaires modérés à sévères (Gourgari et al., 2017). En conséquence, des traitements alternatifs sont nécessaires de toute urgence pour une prise en charge plus efficace de la maladie. La médecine complémentaire et alternative est de plus en plus utilisée comme stratégie de gestion du diabète. Dans ce contexte, des investigations récentes ont suggéré l'utilisation de médicaments à base de plantes pour le traitement éventuel du diabète et de ses complications majeures. Il n'y a pas de méthode ultime disponible pour prévenir et traiter le diabète, mais de nouvelles stratégies sont nécessaires pour réduire les complications provoquées par la maladie (Tavafi, 2013). Des recherches ont montré qu'un certain nombre de plantes antidiabétiques, outre leur activité hypoglycémiante, ont d'autres propriétés utiles

telles que des activités anti-hypertensives, néphroprotectrices et rétinoprotectrices qui peuvent être utiles contre les complications les plus courantes du diabète sucré. Ainsi, la consommation de ces plantes pourrait bien être exploitée dans le contrôle du diabète sucré et de ses complications (OMS, 2006; Aghadavoud et al., 2017).

#### **4. Propriétés antidiabétiques des plantes médicinales marocaines**

##### **4.1. Effets antidiabétiques *in vitro***

La dégradation des glucides dans l'intestin joue un rôle déterminant dans l'augmentation de la glycémie. Cette dégradation, comme indiqué précédemment, est sous le contrôle des enzymes impliquées dans la digestion. L'inhibition de ces enzymes est une stratégie thérapeutique importante pour abaisser la glycémie et contribuer à la prise en charge du diabète de type 2. À cette fin, certaines plantes médicinales marocaines ont été testées *in vitro* pour leurs effets antidiabétiques contre l' $\alpha$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et la  $\beta$ -glucosidase par de nombreux chercheurs (Bouyahya et al., 2021).

Un total de 15 plantes médicinales marocaines (*Ajuga iva*, *Mentha viridis*, *Anabasis aretioides*, *Thymelaea hirsuta*, *Cistus salvifolius*, *Cistus monspeliensis*, *Atractylis gummifera*, *Calendula arvensis*, *Scolymus hispanicus*, *Caralluma europaea*, *Avena sativa*, *Aristolochia longa*, *Arbutus unedo*, *Ziziphus Lotus* et *Centaurium erythraea*) appartenant à 11 familles botaniques (Lamiaceae, Chenopodiaceae, Thymelaeaceae, Cistaceae, Asteraceae, Asclepiadaceae, Poaceae, Aristolochiaceae, Ericaceae, Rhamnaceae et Gentillaceae) ont été testées *in vitro* pour leurs activités antidiabétiques. Pour les 15 plantes testées *in vitro*, seule l'activité de cinq espèces a été évaluée *in vivo*.

##### **4.2. Effet antidiabétique *in vivo***

L'activité antidiabétique *in vivo* s'exprime par la capacité des molécules antidiabétiques à diminuer la concentration du glucose sanguin, à augmenter la sécrétion d'insuline, à protéger les cellules  $\beta$ -pancréatiques et à stimuler la biosynthèse du glycogène. L'activité antidiabétique *in vivo* des plantes médicinales au Maroc a été étudiée dans 54 manuscrits. Au total, 32 plantes médicinales marocaines (*Ajuga iva*, *Origanum vulgare*, *Calamintha officinalis*, *Carum carvi*, *Ammoides*

*pusilla*, *Ammi visnaga*, *Coriandrum sativum*, *Thymelaea hirsuta*, *Silybum marianum*, *Chamaemelum nobile*, *Caralluma europaea*, *Avena sativa*, *Triticum repens*, *Rubus fruticosus*, *Crataegus oxyacantha*, *Centaureum erythraea*, *Suaeda fruticosa*, *Lepidium sativum*, *Chamaerops humilis*, *Capparis spinosa*, *Spergularia purpurea*, *Opuntia ficus-indica*, *Arbutus unedo*, *Eucalyptus globulus*, *Zygophyllum gaetulum*, *Retama raetam*, *Crocus sativus*, *Fraxinus excelsior*, *Globularia alypum*, *Nigella sativa*, *Argania spinosa* et *Urtica dioica*) appartenant à 21 familles botaniques (*Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Arecaceae*, *Capparaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cactaceae*, *Ericaceae*, *Myrtaceae*, *Zygophyllaceae*, *Fabaceae*, *Iridaceae*, *Oleaceae*, *Plantaginaceae*, *Ranunculaceae*, *Sapotaceae*) ont été testées pour leur activité antidiabétique *in vivo* (Bouyahya et al., 2021).

## 5. Mécanismes d'action des plantes antidiabétiques

Il existe plusieurs modes d'action fondamentaux des produits naturels dans la prise en charge du diabète (Governata et al., 2018). Les principaux mécanismes comprennent ceux qui agissent par stimulation de la sécrétion d'insuline, augmentation de l'expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs), inhibition de l' $\alpha$ -amylase ou de l' $\alpha$ -glucosidase, inhibition de la sécrétion des incrélines (GLP-1), inhibition de la formation des produits de glycation avancée (AGE), piégeage des radicaux libres plus l'activité antioxydante (contre les ERO et les espèces réactives de l'azote (ERN)), augmentation de la translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4) et prévention du développement de la résistance à l'insuline (Figure 3) (Nazarian-Samani et al., 2018).

### 5.1. Augmentation de la sécrétion d'insuline

Certaines plantes ou leurs constituants stimulent la sécrétion d'insuline. Ils incluent le composé S-méthylcystéine sulfoxyde, isolé de l'oignon (*Allium cepa*) (Kumari and Augusti, 2002), qui a considérablement amélioré le contrôle de la glycémie chez des rats diabétiques.

## **5.2. Augmentation de l'expression des PPARs**

Dans le melon amer (*Momordica charantia* L.), l'acide linoléique conjugué (9-*cis*, 11-*trans*, 13-*trans*) a été trouvé pour activer le PPAR- $\alpha$  dans les tissus des rats (Chuang et al., 2006). Les PPARs sont des protéines de la famille des récepteurs nucléaires agissant comme facteur de transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique, permettant de les considérer comme cible thérapeutique.

## **5.3. Inhibition de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase**

Il a été démontré que la gédunine et l'azadiradione isolées d'*Azadirachta indica*, sont des inhibiteurs à la fois de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase (Perez-Gutierrez and Damian-Guzman, 2012; Ponnusamy et al., 2015). De plus, un extrait d'oignon (*Allium cepa*) contenant la quercétine possède également une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase (Kim et al., 2011).

## **5.4. Augmentation de la sécrétion de glucagon-like peptide-1 (GLP-1)**

Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les ginsénosides présentes dans *Panax ginseng* stimulent la sécrétion de GLP-1, et cette incrétine réduit l'hyperglycémie postprandiale en augmentant la sécrétion d'insuline et en diminuant celle du glucagon (Liu et al., 2013).

## **5.5. Inhibition de la formation des produits de glycation avancée (AGE)**

Les AGE provoquent l'inflammation et jouent un rôle crucial dans la génération de complications diabétiques. Le catalpol isolé de *Rehmannia glutinosa* retient l'inflammation médiée par les AGE en inhibant la production des ERO, ce qui prévient les problèmes médiés par les AGE dans le diabète (Choi et al., 2013).

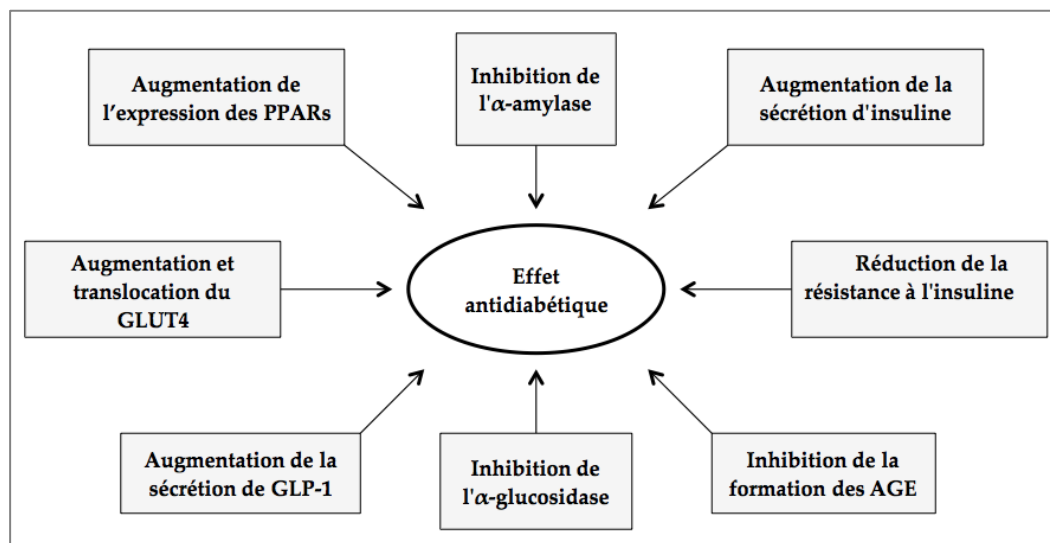
## **5.6. Augmentation et translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4)**

GLUT4 est l'un des plus importants transporteurs de glucose situés à la surface de la membrane des adipocytes, des cellules musculaires squelettiques et cardiaques. En effet, l'insuline provoque la translocation (le déplacement) de petites vésicules intracellulaires contenant de GLUT4 vers la membrane, permettant ainsi au glucose de pénétrer dans la cellule. Par la suite, l'augmentation de l'expression de ces

transporteurs aide à débarrasser le corps de l'excès de glucose en le convertissant en glycogène. En effet, un triterpénoïde (le cucurbitane) du fruit de *Momordica charantia* (Ma et al., 2010), a stimulé la synthèse et la translocation de GLUT4, facilitant par la suite l'absorption du glucose. Par ailleurs, le cinnamaldéhyde isolé de *Cinnamomum zeylanicum* a augmenté l'absorption du glucose par une translocation accrue de GLUT4 (Anand et al., 2010).

### 5.7. Réduction de la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline (RI) est une condition pathologique dans laquelle les cellules ne répondent pas normalement à l'insuline. À cet égard, la méliacinoline isolée des feuilles d'*Azadirachta indica* a inhibé la RI chez les rats, parmi un certain nombre d'autres modes d'action antidiabétiques (Perez-Gutierrez and Damian-Guzman, 2012).



**Figure 3:** Principaux mécanismes de l'activité antidiabétique des produits naturels (adaptée de Nazarian-Samani et al., 2018)

## VI. Plantes médicinales aux propriétés antibactériennes

### 1. Introduction

Les maladies infectieuses, notamment celles causées par des bactéries, ont toujours été une cause majeure de mortalité et de morbidité et un facteur limitant notre espérance de vie. Avec l'émergence du concept des antibiotiques avec Alexander

Flemming en 1928, les choses ont beaucoup changé et l'espérance de vie s'est remarquablement améliorée par la suite.

Les antibiotiques ont joué un rôle historique dans l'amélioration de notre système de santé à l'échelle mondiale. Cependant, quelques années après la découverte de la pénicilline par Fleming, des recherches ont commencé à montrer que les micro-organismes peuvent développer des mécanismes qui pourraient leur permettre de résister à l'action de ces antibiotiques.

En effet, la pression sélective accrue imposée par l'utilisation répandue des agents antimicrobiens depuis les années 1950 a clairement accéléré le développement et la propagation de la résistance bactérienne aux agents antibiotiques. Dans la plupart des cas, il n'a pas fallu plus de trois à cinq ans après l'introduction d'un agent antimicrobien dans l'utilisation clinique pour que la première bactérie cible résistante apparaisse (Schwarz et al., 2001). Cela est particulièrement vrai pour les agents antimicrobiens à large spectre, tels que les tétracyclines, les aminosides, les macrolides et les  $\beta$ -lactamines, qui ont été utilisés à des fins multiples en médecine humaine et vétérinaire, en agriculture et/ou en aquaculture. En effet, une bactérie est définie comme étant cliniquement résistante à un agent antimicrobien lorsque celui-ci, après le dosage recommandé, n'atteint pas une concentration (au site d'infection) capable d'inhiber efficacement la croissance de la bactérie ou de la tuer (Simjee, 2011). En revanche, plusieurs études ont révélé que la résistance aux agents antimicrobiens synthétiques, tels que les sulfamides, le triméthoprime, les fluoroquinolones et les oxazolidinones, peut se développer rapidement (Endtz et al., 1991; Tsiodras et al., 2001; Fiebelkorn et al., 2005). Ces observations soulignent l'énorme flexibilité des bactéries pour faire face à des conditions environnementales moins favorables en développant constamment de nouveaux moyens de survie.

Malgré ce problème de résistance, les industries pharmaceutiques ont continué à synthétiser des antibiotiques chimiques, issus de différentes voies de synthèse organiques, dans l'espoir que ces antibiotiques de synthèse puissent limiter la croissance bactérienne voire l'éradication définitive. En effet, ils ont commencé à

créer des molécules chimiques représentant un groupe très diversifié de substances de faible poids moléculaire qui interfèrent avec la croissance bactérienne, entraînant soit l'inhibition de la multiplication de ces bactéries sans les lyser (effet bactériostatique), soit leur destruction (effet bactéricide).

Avec les différentes voies de synthèse, la résistance à ces antimicrobiens n'était pas considérée comme un problème important, car le nombre de souches résistantes était faible et de nouveaux agents antimicrobiens hautement efficaces de différentes classes ont été détectés. Cependant, avec la pression exercée par certaines souches bactériennes contre lesquelles des utilisations accrues d'antibiotiques ont été enregistrées, la notion de souches multi-résistantes (SMR) a émergé, signifiant qu'une souche bactérienne commence à résister à plusieurs antibiotiques voire plusieurs familles d'antibiotiques.

Des études récentes ont montré que cette résistance est principalement due à la flexibilité et à la plasticité des bactéries vis-à-vis de la synthèse de molécules, principalement des protéines, qui peuvent inhiber, bloquer, séquestrer ou dégrader l'action des antibiotiques. Cette flexibilité est une propriété à la fois génétique (au niveau de l'ADN) mais aussi acquise (adaptation de la bactérie).

Dans ce contexte, et étant donné que la nature a créé une diversité chimique complexe, un axe de recherche remarquable a actuellement montré que les substances naturelles, notamment celles contenues dans les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, pourraient constituer une alternative efficace pour contrebalancer la multi-résistance de souches bactériennes qui continuent de poser de réels problèmes de santé mondiale. En effet, les caractéristiques récalcitrantes de certains médicaments antibactériens naturels ont été rarement rapportées, démontrant ainsi l'efficacité durable de ces molécules comme alternatives antibactériennes.

## **2. Résistance aux agents antimicrobiens**

En général, la résistance aux agents antimicrobiens est divisée en deux types; la résistance intrinsèque (naturelle) et la résistance acquise ([Schwarz and Noble, 1999](#);

Schwarz et al., 2001; Schwarz et al., 2005; Schwarz et al., 2017). La résistance intrinsèque est une caractéristique bactérienne spécifique du genre ou de l'espèce et est souvent due à l'absence ou à l'inaccessibilité des structures cibles pour certains agents antimicrobiens (Schwarz et al., 2005), par exemple, la résistance à la vancomycine chez les bactéries à Gram négatif en raison de l'incapacité de cet antibiotique à pénétrer dans la membrane externe. Cette résistance peut également être due à la présence de systèmes d'exportation ou à la production d'enzymes d'inactivation spécifiques à l'espèce (Van Duijkeren et al., 2018), comme le système d'efflux AcrAB-TolC et la production d'AmpC  $\beta$ -lactamase chez *Escherichia coli*.

D'autre part, la résistance acquise est une propriété spécifique à la souche qui peut être due à des mutations de gènes chromosomiques ou à l'acquisition de gènes chromosomiques ou extra-chromosomiques, communément appelés gènes de résistance.

### **2.1. Résistance par mutation**

Des mécanismes cellulaires existent pour répliquer avec précision l'ADN, corriger les erreurs et réparer les dommages aux chromosomes. Par conséquent, la fréquence de mutation dans un gène donné est faible car elle doit échapper à ces mécanismes de correction et parce que les mutations sont souvent délétères pour la cellule (Shafran, 1990). Malgré la faible probabilité, des mutations de résistance surviennent et entraînent généralement une protéine altérée qui est moins sensible aux antimicrobiens. Dans la plupart des cas, les bactéries devraient subir plusieurs étapes pour acquérir une résistance, chaque mutation ne conférant que de légères altérations de sensibilité. Une mutation qui confère une résistance en une seule étape est relativement rare (McManus, 1997).

Puisqu'il s'agit essentiellement d'un processus évolutif, la résistance par ce mécanisme se produit relativement rarement.



## 2.2. Résistance par transfert d'ADN

De nouveaux gènes de résistance sont transférés entre les bactéries et peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien et hérités de manière stable de génération en génération ou ils peuvent être maintenus dans un état extra-chromosomique sur un plasmide bactérien. En effet, le transfert d'ADN se fait le plus souvent *via* les plasmides. Ces derniers peuvent porter des gènes pour une variété de traits, y compris la résistance aux antimicrobiens, et peuvent être classés comme conjugatifs ou non conjugatifs. Les plasmides conjugatifs peuvent transférer leur ADN à des bactéries adjacentes *via* des pili sexuels (Chambers, 1995). Les plasmides non conjugatifs ne le peuvent pas. Depuis l'apparition de l'antibiothérapie, les plasmides se sont toutefois révélés être les véhicules idéaux pour le recrutement et la dissémination des gènes de résistance. Au sein des plasmides, les gènes de résistance sont souvent portés par des transposons (séquence d'ADN) (Rice and Eliopoulos, 2000).

En général, la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens varie en fonction des agents, des bactéries et du mécanisme de résistance. La résistance au même agent antimicrobien peut être médiée par différents mécanismes. Dans certains cas, le même gène ou mécanisme de résistance se retrouve dans une grande variété de bactéries, alors que dans d'autres cas, les gènes ou mécanismes de résistance semblent être limités à certaines espèces ou genres bactériens (Van Duijkeren et al., 2018).

## 3. Propriétés antibactériennes des plantes médicinales

Les maladies infectieuses représentent une cause importante de morbidité et de mortalité dans la population générale, en particulier dans les pays en développement. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques et la rareté des nouveaux antimicrobiens sont reconnues depuis longtemps. Par conséquent, les sociétés pharmaceutiques ont été motivées pour développer de nouveaux médicaments antimicrobiens ces dernières années, en particulier en raison de l'émergence constante de micro-organismes résistants aux antimicrobiens

conventionnels. Apparemment, les espèces bactériennes présentent la capacité génétique d'acquérir une résistance aux antibactériens actuellement disponibles, car il y a des rapports fréquents de bactéries sensibles aux médicaments couramment utilisés qui sont devenus multirésistants aux autres médicaments disponibles sur le marché (Nascimento et al., 2000; Sakagami and Kajimura, 2002). Le développement d'espèces bactériennes résistantes aux antimicrobiens découle d'un certain nombre de facteurs qui incluent l'utilisation répandue et parfois inappropriée d'antibiotiques, ainsi que l'utilisation intensive de ces agents comme stimulateurs de croissance dans l'alimentation animale (Marshall and Levy, 2011). Par conséquent, les stratégies courantes adoptées par les sociétés pharmaceutiques pour approvisionner le marché en nouveaux médicaments antimicrobiens incluent la modification de la composition moléculaire des médicaments existants pour les rendre plus efficaces ou pour restaurer l'activité perdue en raison des mécanismes de résistance bactérienne (Chartone-Souza, 1998). En revanche, compte tenu de la recherche de nouveaux antimicrobiens, ceux d'origine végétale doivent être mis en avant car le Maroc possède cette biodiversité à travers laquelle de nombreuses plantes ont été utilisées à des fins différentes et testées dans le monde entier depuis des centaines d'années par différentes populations.

#### **4. Activité antibactérienne des plantes médicinales marocaines**

Il est bien connu que les plantes médicinales marocaines présentent un effet antibactérien important. La méthode de diffusion d'agar (disques ou puits) et la méthode de dilution (gélose ou bouillon liquide) étaient les méthodes les plus utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits par solvants des plantes médicinales marocaines (Balouiri et al., 2016). Le criblage quantitatif est évalué à l'aide des méthodes de diffusion sur disques et puits de gélose. Ces méthodes sont simples et peu coûteuses et utilisées pour déterminer les zones d'inhibition qui permettent de trouver les valeurs d'inhibition quantitatives. Cependant, pour les extraits de plantes, ces méthodes ne peuvent pas toujours être fiables, surtout pour les composés moins polaires qui diffusent plus lentement dans

le milieu de culture (Moreno et al., 2006). Il est nécessaire de noter que l'absence de zones d'inhibition ne signifie pas que le composé est inactif. De plus, l'inhibition qualitative est déterminée par la méthode de dilution qui est utilisée pour évaluer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB). Par rapport à la méthode sur gélose, cette méthode est plus précise et reproductible et peut augmenter la sensibilité pour de petites quantités d'extrait et permettre de distinguer les effets bactériostatiques et bactéricides. D'autre part, les cibles moléculaires de ces produits naturels sont déterminées à l'aide de la microscopie électronique à transmission et de la cytométrie en flux.

#### **4.1. Activité antibactérienne des extraits végétaux**

Récemment, de nombreuses études ont été menées dans le but de mettre en évidence la capacité antibactérienne de nombreux extraits de plantes médicinales marocaines. En effet, l'effet antibactérien de *Cistus crispus* a été étudié par Bouyahya et al. (2017). Les données ont montré que les extraits de méthanol, d'éthanol, d'acétate d'éthyle et de n-hexane avaient une activité antibactérienne significative. Les bactéries Gram-positives (*Listeria monocytogenes* et *S. aureus*) étaient plus sensibles que les Gram-négatives. Le diamètre d'inhibition le plus élevé a été trouvé avec l'extrait éthanolique de *C. crispus* contre *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Dans un autre travail, des extraits éthanoliques de cinq plantes médicinales, dont deux *Cistus* sp. (*C. albidus* (L.) et *C. monspeliensis*) et *Daphne gnidium* (L.), *Ajuga iva* (L.,) Schreb et *L. stoechas* (L.), préparés par extraction solide-liquide, ont empêché la croissance des souches bactériennes étudiées en formant des zones inhibitrices importantes et les extraits éthanoliques d'*A. iva* ont montré l'activité la plus élevée (en particulier contre *E. coli* et *S. aureus*) (Bouyahya et al., 2016a). Dans une autre enquête, des extraits aqueux et méthanoliques de *M. vulgare*, *T. pallidus*, *E. ilicifolium* et *L. stoechas* ont été testés contre *Streptococcus pneumoniae* (responsable des pharyngites, rhinites, otites et sinusites). Une activité significative a été observée avec des extraits méthanoliques de trois plantes; *M. vulgare*, *T. pallidus* et *L. stoechas* avec une valeur CMI de 256 µg/mL

pour chacune (Warda et al., 2009). Par ailleurs, d'autres études menées sur les feuilles de *Myrtus communis* (L.) et les feuilles d'*Arbutus unedo* L. (Bouyahya et al., 2016a; Bouyahya et al., 2016b), ont montré que les extraits les moins polaires (hexane) étaient les plus actifs contre *P. aeruginosa* IH, *L. monocytogenes*, *S. aureus* CECT 976 et *E. coli* K12 MBLA avec des valeurs de CMI comprises entre 0,25 – 4 mg/mL et 0,25 – 0,5 mg/mL, respectivement. D'autre part, l'activité antibactérienne des extraits de méthanol, d'éthanol, d'acétate d'éthyle et de n-hexane d'*Origanum compactum* Benth a été évaluée contre les mêmes agents pathogènes en utilisant la méthode de diffusion par puits. Tous les échantillons se sont avérés capables d'inhiber les souches bactériennes testées avec la plus grande zone d'inhibition d'environ  $34 \pm 1,24$  mm. L'extrait de n-hexane a montré la plus forte activité, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré la plus faible activité. Dans cette étude, les bactéries Gram-négatives étaient plus résistantes que les Gram-positives (Bouyahya et al., 2017c). Dans le même contexte, Et-Touys et al. (2016) ont évalué l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits d'hexane, de méthanol et d'éthanol de *Salvia officinalis* contre trois souches de référence (*S. aureus*, *E. coli* et *L. monocytogenes serovar*) en utilisant la méthode de diffusion et le test de microdilution. Les trois extraits ont révélé un pouvoir inhibiteur contre les souches bactériennes étudiées avec une différence significative dans les diamètres d'inhibition. Le plus grand diamètre a été enregistré par les extraits hexaniques et méthanoliques contre *S. aureus* ( $22 \pm 8$  mm), tandis que le plus faible était de  $11 \pm 0,22$  mm exprimé par l'extrait éthanolique contre *E. coli* et l'extrait méthanolique contre *L. monocytogenes*. De plus, la valeur inhibitrice la plus faible a été trouvée par l'extrait méthanolique contre *S. aureus* (CMI = CMB = 2 mg/mL). Abudunia et al. (2017) ont également déterminé les activités antibactériennes des extraits hexaniques, méthanoliques et aqueux de fleurs de *Calendula arvensis*. Tous les extraits de cette plante se sont avérés très efficaces contre *Salmonella aequatoria* et *E. coli* ATCC. De plus, l'extrait méthanolique n'inhibait que *E. coli* ATCC et *Salmonella braenderup*. Cependant, les extraits n'ont eu aucun effet inhibiteur contre *Salmonella blockley*, *E. coli* enteropathogenes et *E. coli*. Les CMIs des

extraits méthanoliques et aqueux se situaient entre 12,5 et 25 µg/mL et étaient bactéricides pour toutes les souches. Alors que les valeurs CMI des extraits hexaniques se situaient entre 6,25 et 12,5 µg/mL et étaient bactériostatiques pour toutes les souches. Dans une autre étude, [Marmouzi et al. \(2018\)](#) ont rapporté que la fraction éthanolique de *Pennisetum glaucum* présentait un effet antibiotique sur toutes les bactéries testées avec un diamètre d'inhibition variant entre 12,33 et 34,00 mm. De plus, une étude a été réalisée par [El Bouzidi et al. \(2011\)](#) sur l'activité antibactérienne des extraits de n-hexane et de méthanol, de fractions de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de n-butanol obtenues à partir des racines et des feuilles de *Withania frutescens* (L.) Pauquy contre les bactéries multirésistantes impliquées dans les infections nosocomiales en utilisant des méthodes de diffusion sur disque et de microdilution. La fraction de dichlorométhane a présenté la plus grande activité avec des diamètres d'inhibition allant de 14 à 19 ± 1,4 mm et des valeurs de CMI comprises entre 50 et 400 µg/mL.

Dans la majorité de ces études évaluant les extraits végétaux marocains, aucune indication des composés responsables de l'activité n'a été rapportée, sauf quelques études où le type des composés majeurs était indiqué. [Brahim et al. \(2015\)](#) qui ont travaillé sur les fractions riches en saponines extraites des parties aériennes de *Paronychia argentea* et des racines de *Spergularia marginata* ont évalué les activités antibactériennes de ces fractions en utilisant les méthodes de diffusion sur disque et de microdilution en bouillon contre des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Le résultat du test CMI a montré que les deux extraits riches en saponines se sont révélés actifs contre la majorité des bactéries Gram-positives avec une CMI allant de 8 à 16 mg/mL pour les deux extraits. Cependant, ces extraits ont eu un faible effet sur les bactéries Gram-négatives. Une autre enquête de [Bammou et al. \(2016\)](#), comparant les effets des extraits de polyphénols des fruits de six variétés marocaines de *Phoenix dactylifera* L. sur des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, a montré que les variétés *Bousrdon* et *Jihl* étaient les extraits les plus actifs inhibant les bactéries testées avec des CMI variant entre 2,5 et 10 mg/mL, alors que les extraits de *Majhoul* et de

*Bouskri* n'ont montré aucune activité contre toutes les souches bactériennes testées.

#### 4.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Plusieurs études ont révélé l'efficacité des huiles essentielles en tant qu'agents antibactériens naturels. Récemment, de nombreuses plantes aromatiques et médicinales marocaines ont été largement étudiées pour leurs activités antibactériennes. Le thym et l'origan sont des plantes médicinales marocaines très connues et fréquemment utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses infections. Plusieurs rapports scientifiques ont évalué l'activité antibactérienne de différentes espèces de *Thymus* sp. Les huiles essentielles des espèces endémiques de thym marocain (*Thymus maroccanus* et *Thymus broussonetii*) ont été testés contre des bactéries résistantes aux antibiotiques impliquées dans des infections nosocomiales. Les deux huiles ont présenté une activité inhibitrice élevée contre les bactéries testées (CMI = 0,086 – 0,342 et 0,171 – 0,685 mg/mL, respectivement) sauf *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 5,52 et 5,48 mg/mL, respectivement) (Fadli et al., 2012). En outre, les huiles essentielles de *T. maroccanus* L. et *T. broussonetii* L. ont été testées pour leur capacité à inhiber les pompes d'efflux de bactéries Gram-négatives résistantes (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium et *P. aeruginosa*). Les résultats indiquent que ces huiles essentielles ont présenté une activité intéressante contre les bactéries testées en modifiant l'activité de la pompe d'efflux (Fadli et al., 2011). Dans une autre enquête, Jamali et al. (2012) ont suggéré que l'activité biologique, des huiles essentielles des parties aériennes de certaines espèces de *Thymus* (*T. broussonetii*, *T. ciliatus*, *T. leptobotrys*, *T. maroccanus*, *T. pallidus*, *T. satureioides* et *T. serpyllum*) prélevées sur différentes régions du Maroc, est en relation directe avec la composition chimique. De la même manière, Kasrati et al. (2014) ont remarqué que les huiles essentielles de trois populations sauvages marocaines de *T. satureioides* prélevées dans le nord-ouest du sud-est du Maroc présentaient une activité inhibitrice élevée contre les bactéries testées, à l'exception de *P. aeruginosa*. L'activité la plus puissante a été observée pour l'huile essentielle obtenue dans la

région Er-Rich (concentration élevée de carvacrol 45,3%), avec des valeurs de CMI et de CBM de 0,14 – 0,55 mg/mL et 0,28 – 0,55 mg/mL, respectivement. De plus, la détermination de l'activité antibactérienne d'une autre espèce de *Thymus* (*T. riatarum*) a montré que l'huile essentielle possédait un potentiel notable d'inhibition de la croissance des souches testées avec des CMI allant de 3,57 à 7,5 mL/L. Cependant, *P. aeruginosa* a montré le moins de sensibilité et n'a été inhibé qu'avec des concentrations élevées (CMI > 7,5 mL/L) (Fadli et al., 2014). En fait, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym est apparemment liée à sa forte teneur en phénol, en particulier le carvacrol et le thymol, qui se sont avérés présenter une activité antibactérienne importante (Kachur and Suntres, 2020). Dans le même contexte, Ouedrhiri et al. (2016) ont démontré que les huiles essentielles d'*O. compactum*, de *T. serpyllum* et d'*O. majorana* présentaient un effet antibactérien contre *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 3366 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 examinés par la méthode de diffusion sur disque et de micro-dilution. Dans un autre travail, les huiles essentielles des parties aériennes d'*O. compactum* marocain sauvage à trois stades phénologiques (végétatif, floraison et post-floraison) ont été testées contre huit bactéries. Les résultats ont montré que les huiles du stade végétatif et de floraison ont une activité antibactérienne remarquable contre *Proteus mirabilis* avec un diamètre d'inhibition de 43 et 47 mm, respectivement. De plus, la meilleure action bactéricide a été révélée par l'huile du stade de floraison contre *S. aureus* MBLA (CMI = CMB = 0,0312% (v/v)) (Bouyahya et al., 2017c). En comparant les activités de différentes huiles d'espèces de *Thymus*, il a été remarqué qu'il y avait une légère différence sur les activités antibactériennes. Cela pourrait s'expliquer par la différence dans la composition chimique, le stade de récolte, les souches testées et les méthodes expérimentales utilisées.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *Melissa officinalis* a été testée contre des bactéries responsables d'infections nosocomiales (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *Citrobacter kuseri*) en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Par conséquent, cette huile essentielle, riche en citronellal (14,40%), oxyde de caryophyllène (11,00%),

acétate de géraniol (10,20%) et caryophyllène (8,10%), a présenté une activité antibactérienne élevée contre les souches testées (Jalal et al., 2015). En outre, une étude a été menée sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Rosmarinus officinalis* contre *E. coli*, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. Les résultats ont montré que ces deux huiles présentaient un effet antibactérien remarquable. Les valeurs les plus faibles de CMI et de CMB ont été obtenues avec l'huile essentielle de la menthe pouliot contre *S. aureus* MBLA (CMI = CMB = 0,25% (v/v)), tandis que l'huile essentielle de *R. officinalis* a présenté un effet bactéricide contre *L. monocytogenes* (CMI = CMB = 0,5% (v/v)), *B. subtilis* (CMI = CMB = 1% (v/v)) et *E. coli* (CMI = CMB = 1% (v/v)) (Bouyahya et al., 2017b). Une comparaison de l'activité des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *M. suaveolens* subsp. *timija* (sauvage et cultivée) a montré que l'huile de la plante cultivée présentait une forte activité antibactérienne par rapport à la plante sauvage. De plus, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *M. pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L. et *Cyperus longus* L. du Maroc a été testée contre sept bactéries d'importance significative pour l'hygiène alimentaire. Les résultats ont révélé que l'huile de *M. pulegium* présentait le meilleur effet bactériostatique et bactéricide, suivi de *J. phoenicea* et *C. longus* (Ait-Ouazzou et al., 2012).

D'autres recherches scientifiques ont rapporté les activités antibactériennes de différentes plantes médicinales marocaines appartenant à différentes familles (Myrtacées, Astéracées, Lamiacées, Lauracées, etc.). Auparavant, Ezoubeiri et al. (2005) ont évalué les activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* L. et de deux composés obtenus après fractionnement de l'huile essentielle; 2-isopropyl-4-méthylphénol et l'acide isobutyrique 2-isopropyl-4-méthylphénylester. L'huile essentielle étudiée et le 2-isopropyl-4-méthylphénol ont présenté des activités antibactériennes très importantes, tandis que l'acide isobutyrique 2-isopropyl-4-méthylphénylester était inactif pour toutes les souches testées. D'autre part, *M. communis* L. est également une autre plante médicinale endémique du Maroc et est



traditionnellement utilisée à des fins médicinales depuis l'Antiquité (Fadil et al., 2017). De nombreux travaux scientifiques ont rapporté l'activité antibactérienne du myrte marocain. Les huiles essentielles de 20 échantillons de *M. communis* L. récoltés dans la forêt de «Ifra» ont été testés contre *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 29213, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 et *E. coli* ATCC 2592. Les résultats ont montré que  $\alpha$ -pinène (0,4% – 50,3%), 1,8-cinéole (8,3% – 64,9%), acétate de myrtényle (0% – 61,1%),  $\alpha$ -terpinolène (0% – 20,8%), méthyleugénol (0% – 33,6%) et l' $\alpha$ -terpinéol (0,2% – 18%) étaient les principaux composés des huiles essentielles de *M. communis* L. Ces huiles ont présenté une activité inhibitrice importante contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Fadil et al., 2017). La différence dans les activités est due à la différence de la composition chimique. Les principaux composés sont les monoterpènes, connus dans la littérature pour posséder une puissante activité antibactérienne (Abdelrasoul et al., 2020). La présence de 1,8-cinéole et d' $\alpha$ -terpinéol justifie également l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *M. communis*.

## **DEUXIÈME PARTIE**

### **Partie expérimentale**

## Introduction

L'étude des substances naturelles passe par plusieurs étapes successives, allant du terrain aux investigations des propriétés pharmacologiques, en passant par la préparation des produits à tester, les dosages phytochimiques et les tests toxicologiques.

Pour mener à bien notre travail de thèse, l'étude expérimentale que nous avons réalisée repose sur plusieurs étapes méthodologiques. Tout d'abord, nous avons commencé par la récolte des racines et la préparation des différents extraits. Par la suite, nous avons mené une étude phytochimique durant laquelle les teneurs en composés phénoliques de ces extraits ont été déterminées par dosage biochimique.

Les extraits ainsi obtenus ont fait l'objet d'une investigation toxicologique. Par la suite, les effets biologiques de ces substances ont été évalués à savoir l'activité antioxydante, antibactérienne et antidiabétique.

Compte tenu des résultats obtenus à partir des tests en amont, des analyses chimiques par HPLC-MS préparative ont été réalisées afin de mettre en exergue les molécules bioactives qui pourraient être responsables des effets pharmacologiques observés.

# Chapitre 1: Matériel végétal et étude phytochimique

## I. Introduction

Les plantes produisent une grande variété de métabolites secondaires pour leur défense et leur survie dans l'écosystème. Les métabolites secondaires sont recherchés pour leurs activités biologiques nombreuses et bénéfiques pour la santé humaine.

De nombreuses utilisations possibles des extraits végétaux et des métabolites secondaires sont à l'origine du développement pharmaceutique, qui est en pleine croissance. En effet, la valeur pharmacologique des métabolites secondaires végétaux augmente en raison de la tendance vers l'utilisation des produits naturels et des découvertes continues sur leurs rôles potentiels.

Pour cette raison, nous avons consacré cette partie de notre travail au matériel végétal et à l'étude phytochimique des racines d'*Aristolochia longa* initié par un criblage phytochimique, suivi d'un dosage spectroscopique, puis d'une analyse chromatographique.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Sélection du matériel végétal

Afin d'augmenter la probabilité d'isoler de nouveaux composés naturels et d'explorer de nouvelles voies d'application, qu'elles soient thérapeutiques, cosmétiques ou industrielles, il était judicieux de choisir une espèce peu ou pas étudiée. En effet, la sélection du matériel végétal constitue une étape critique pour le chercheur. Une plante même largement étudiée, peut être réexaminée sous de nouveaux angles: nouvelle cible biologique, protocole expérimental modifié, partie de plante différente, nouvelle technique d'analyse, méthode d'extraction différente, etc. Dans le présent travail, certains de ces critères ont été pris en compte pour sélectionner les racines d'*Aristolochia longa* connues pour leurs usages traditionnels et accusées dans de nombreux cas d'intoxication. Néanmoins, quels que soient les critères de sélection

retenus, il est de notre responsabilité de préserver et de protéger notre patrimoine végétal qui constitue une source prometteuse de nouvelles substances médicinales.

### **1.2. Récolte et identification du matériel végétal**

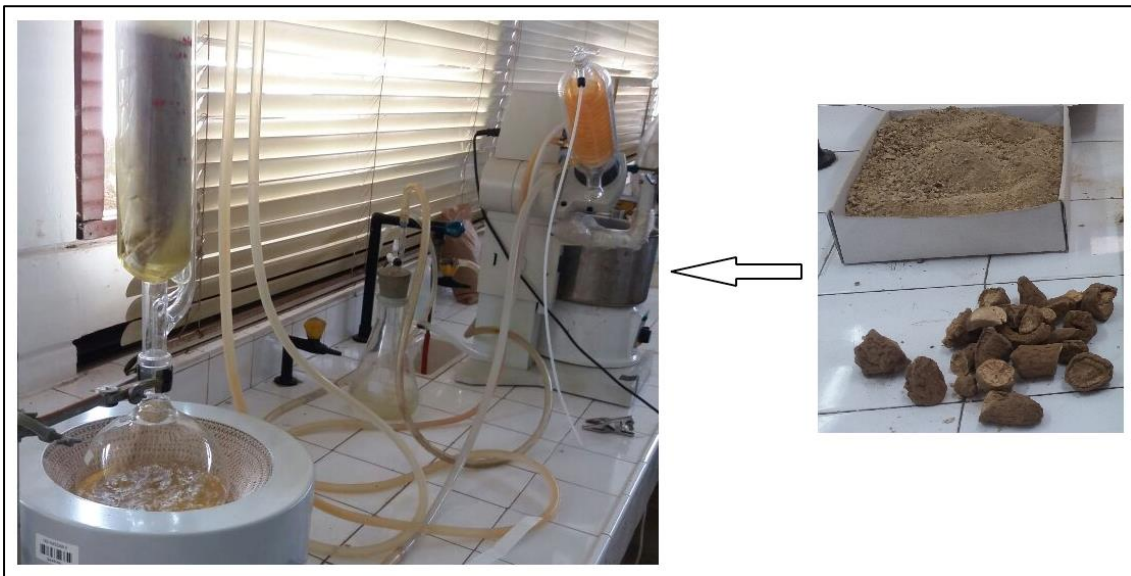
Le matériel végétal est constitué de racines d'*A. longa* qui ont été récoltées en avril 2016 (Figure 1), dans la province d'Al Haouz au Maroc, dans le respect des bonnes pratiques de récolte des plantes médicinales (OMS, 2003). Après la récolte, des fragments représentatifs et complets de la plante ont été délicatement placés entre deux feuilles de papier étiquetées, indiquant des données ethnobotaniques (usages, noms locaux, ...), la date et le site de récolte. Par la suite, les échantillons ont été séchés dans un endroit sec et bien aéré. Ces échantillons ont été identifiés à l'institut scientifique de Rabat, et un spécimen «RAB 110969» a été déposé à l'herbier du département de botanique et d'écologie végétale.

### **1.3. Préparation et rendement des extraits végétaux**

Après la récolte, les racines ont été lavées, séchées à l'ombre et à température ambiante pendant 48 à 92 heures, broyées en poudre fine et homogène, puis stockées dans des bouteilles en verre, à l'abri de la lumière et de l'humidité, afin de procéder à l'extraction. En effet, les différents extraits qui ont fait l'objet de nos études ont été préparés à partir de cette poudre (Figure 4).

Concernant l'extrait aqueux, il a été obtenu selon la méthode décrite par Zirihi et al. (2003). 100 g de poudre ont été macérés dans un litre d'eau distillée sous agitation magnétique avec un agitateur de type IKA-Labor Technik pendant 24 heures à température ambiante. L'homogénat obtenu a été filtré successivement sur coton hydrophile, puis sur papier Wattman (3 mm). Le filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite à 50°C en utilisant un évaporateur rotatif (Buchi Rotavapor II, Buchi Allemagne) pour donner un résidu sec brun foncé, de texture pâteuse, constituant l'extrait aqueux. Par ailleurs, une extraction solide-liquide a été effectuée pour préparer des fractions à base de solvants de polarités différentes, à l'aide d'un extracteur Soxhlet. Brièvement, 100 g de poudre ont été placés dans la cartouche du Soxhlet. Ensuite, un litre de solvant a été versé dans le ballon et chauffé pour

démarrer l'extraction. Cette extraction s'arrête lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair. Le matériel végétal a été extrait successivement avec trois solvants de polarité croissante, à savoir l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau distillée, en gardant la même cartouche. Le contenu du ballon (solvant plus matière solubilisée) a ensuite été traité en utilisant un évaporateur rotatif pour éliminer les solvants.



**Figure 4:** Procédé d'extraction

Les résidus de chaque préparation ont été pesés pour quantifier la masse d'extrait sec, afin de calculer les rendements des extraits en pourcentage selon la formule;  $\text{rendement} = (\text{la masse de l'extrait obtenu} / \text{la masse initiale de la plante}) \times 100$ . A la fin, tous les extraits obtenus ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans l'obscurité jusqu'à une utilisation ultérieure.

## **2. Etude phytochimique**

Des analyses phytochimiques sont nécessaires pour étudier les molécules responsables des propriétés pharmacologiques d'une plante et guider l'isolement de nouveaux principes actifs.

## **2.1. Screening phytochimique**

Des analyses phytochimiques qualitatives de la poudre végétale ont été effectuées selon des méthodes standard (Jigna and Sumitra, 2008). Il s'agit de tests colorimétriques utilisant des réactifs chimiques pour l'identification préliminaire de divers groupes de phytoconstituants tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les terpénoïdes et les anthraquinones. Tout changement de couleur ou formation de précipité a été utilisé comme indicateur d'une réponse positive à ces tests.

### **2.1.1. Recherche des flavonoïdes**

Pour mettre en évidence les flavonoïdes, 1 g de la matière végétale en poudre est mis dans de l'eau distillée (10 mL). Ensuite, la solution résultante est filtrée après agitation, puis mélangé avec 5 mL d'une solution d'ammoniac diluée. Finalement, un volume de 1 mL d'acide sulfurique est ajouté. Par conséquent, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes.

### **2.1.2. Recherche des terpénoïdes**

Pour caractériser les terpénoïdes, 1 g de la matière végétale est mis dans un volume de 10 mL de méthanol. Ensuite, la solution obtenue est filtrée après agitation, puis un volume de 5 mL est mélangé avec 2 mL de chloroforme. Finalement, un volume de 3 mL d'acide sulfurique est ajouté. La présence de terpénoïdes est confirmée par une couleur brune rougeâtre.

### **2.1.3. Recherche des tanins**

Pour identifier les tanins, 1 g du matériel végétal sec est mis dans un volume de 10 mL de méthanol 80%. Après 15 minutes d'agitation, l'extrait est filtré et placé dans un tube. L'ajout de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1% (m/v) renseigne sur la présence ou l'absence des tanins. La couleur vire au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques et au bleu noir en présence de tanins galliques.

#### **2.1.4. Recherche des alcaloïdes**

2 g de poudre sont ajoutés à 10 mL d'acide sulfurique. Une macération du résidu formé est effectuée pendant 4 minutes, suivie d'une filtration. La présence des alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité jaune après addition de quelques gouttes de mercuritétraiodure de potassium (réactif de Mayer). La confirmation de cette présence se fait par un second test en milieu basique par ajout d'ammoniaque (25%) puis de chloroforme, suivi d'une filtration.

A la fin, la pulvérisation du réactif de Dragendorff sur une bande CCM (chromatographie sur couche mince) contenant quelques gouttes du filtrat, donne une couleur rouge brique, confirmant ainsi la présence des alcaloïdes.

#### **2.1.5. Recherche des anthraquinones**

1 g de poudre végétale est mélangé à 10 mL de chlorométhane ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ). Après 15 minutes de chauffage au bain-marie, le mélange est filtré et le volume est complété à 10 mL avec du chloroforme, puis un volume de 1 mL d'hydroxyde de potassium aqueux (10% *v/v*) est ajouté. La présence des anthraquinones entraîne un virage de la phase aqueuse au rouge.

#### **2.1.6. Recherche des saponines**

2 g de poudre sont utilisés avec 100 mL d'eau distillée pour préparer une décoction qui a été portée à ébullition durant 1/2 h. Le volume est réajusté à 100 mL avec de l'eau distillée après refroidissement et filtration.

A partir de cette solution-mère, une série de 10 tubes de 1, 2, 3 ...10 mL est préparée successivement, et le volume final de chacun est réajusté à 10 mL. Les tubes sont secoués horizontalement en position horizontale pendant 15 secondes, puis laissés au repos en position verticale pour 15 minutes. A la fin, la hauteur de la mousse persistante est mesurée en cm.

La présence des saponines est déterminée en calculant l'indice de mousse persistante. Si celle-ci est proche de 1 cm dans le  $X^{\text{ème}}$  tube, l'indice de mousse est calculé par la formule suivante:  $I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } X^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5/0,0X$  ( $X = 1, 2,$



3..., 10). La présence des saponines dans la plante se traduit par un indice supérieur à 100.

## **2.2. Dosage phytochimique**

Les analyses quantitatives des extraits d'*A. longa* ont été effectuées selon plusieurs méthodes utilisant des réactifs chimiques pour quantifier les composés phénoliques à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage.

Le dosage de chaque composé est réalisé en triplicata pour des résultats plus fiables et la densité optique de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

### **2.2.1. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en polyphénols totaux des extraits d'*A. longa* a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Ce dernier est un acide jaunâtre constitué d'un mélange de deux acides (acide phosphomolybdique et acide phosphotungstique). En fait, les composés phénoliques provoquent une oxydation, réduisant ainsi les deux acides en un mélange de molybdène et de tungstène de couleur bleue. L'intensité de cette couleur est directement associée à la teneur en polyphénols totaux du mélange (Boizot and Charpentier, 2006). Dans notre étude, l'échantillon à tester (20 µL) est mélangé simultanément avec de l'eau distillée (1,16 mL), du réactif de Folin-Ciocalteu (100 µL) et de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (300 µL). Après incubation à 45°C pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde 765 nm.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est tracée en parallèle, en utilisant un étalon standard, l'acide gallique (EAG). A partir de l'équation de régression de cette courbe, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait en poids sec (mg d'EAG/g d'extrait sec).

### **2.2.2. Dosage des flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes des extraits d'*A. longa* a été déterminée selon la méthode décrite par Dewanto et al. (2002), basée sur l'oxydation des flavonoïdes par le

trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et l'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) qui, à leur tour, forment un complexe rose qui absorbe à 510 nm. 1 mL d'échantillon dissous est mélangé avec 6,4 mL d'eau distillée, puis 0,3 mL de solution de nitrite de sodium,  $\text{NaNO}_2$ , (5% m/v) a été ajouté. Après 5 minutes, 0,3 mL d' $\text{AlCl}_3$  (10% m/v) a été additionné et le mélange a été laissé au repos pendant 6 minutes. Ensuite, 2 mL de  $\text{NaOH}$  (1M) ont été ajoutés. Au bout de 30 min, les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde égale à 510 nm. Par la suite, la teneur en flavonoïdes est estimée en se référant à l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie par la rutine (un étalon standard) dans les mêmes conditions opératoires du dosage. Les résultats sont exprimé en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait en poids sec (mg ER/g d'extrait sec).

### **2.2.3. Dosage des tanins condensés**

La teneur en tanins condensés des extraits d'*A. longa* est estimée selon la méthode décrite par [Julkunen-Tiitto, \(1985\)](#). Un volume de 50  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon (1 mg/mL) est mélangé avec 1,5 mL de vanilline 4% (préparé avec du méthanol) et 750  $\mu\text{L}$  de l'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) concentré. Le mélange est incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 20 minutes et les absorbances sont mesurées à 500 nm.

La teneur en tanins condensés est ensuite estimée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie par la catéchine à des concentrations différentes. Les résultats sont exprimé en milligramme d'équivalent de la catéchine par gramme d'extrait en poids sec (mg EC/g d'extrait sec).

### **2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse (CLHP/SM)**

La détermination des composés phénoliques de nos extraits a été réalisée en utilisant la chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse ([Marmouzi et al., 2019](#)). Le détecteur UV est celui à barrettes de diode alors que l'analyseur est celui à temps de vol (*High performance liquid chromatography–diode array detector–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC–DAD–QTOF-*

MS)). Ce système (HPLC-DAD-QTOF-MS) est constitué d'une pompe binaire (G1312A; Agilent 1100), d'un spectromètre de masse couplé à une ionisation par électrospray (MS; ESI; Micromass Quattro Micro; Waters, Milford, MA, USA) et d'un échantillonneur automatique (G1330B).

Les conditions opératoires qui ont été utilisées sont: mode négatif; plage  $m/z$  50–1200; l'azote gaz de désolvation et du cône; le débit de gaz conique à 30,0 L/h; débit de gaz de désolvation à 350 L/h; tension de cône, 20 V; tension capillaire, 3,0 kV; extracteur, 2 V; température de désolvation 350°C et température source 100°C. La séparation phénolique a été réalisée sur une colonne Zorbax C18 (2.1 mm x 100 mm x 1.7  $\mu\text{m}$ , Eclipse, XDB/Agilent Zorbax) à une température réglée à 35°C. La phase mobile composée de A (0.1% d'acide acétique dans l'eau pure) et B (0.1% d'acide acétique dans l'acétonitrile) sous un gradient d'élution ( $v/v$ ) comme suit: 0 min, 10% B; 0 à 18 minutes, 10 à 70% B; 18 à 20 min, 70 à 100% B; 20 à 23 min, 100 à 100% B; 20 à 23 min, 100 à 100% B; 23 à 25 min, 100 à 10% B; 25 à 30 minutes, 10 à 10% de B. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  a été injecté avec un débit de 0,5 mL/min pour la séparation des composés phénoliques. Pratiquement, 10  $\mu\text{L}$  de nos extraits ont été injectés avec un débit de 0.5 mL/min sur une colonne Zorbax C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7  $\mu\text{m}$ ) dont la température est maintenue à 35°C. Les analyses ont été réalisées en phase inverse et la détection a été réalisée en mode d'ionisation négative avec les caractéristiques suivantes: voltage du capillaire = 3,0 kV; voltage du cône = 20 V; voltage de l'extracteur = 2 V; température de source = 100°C, température de désolvation = 350°C, débit de gaz du cône = 30 l/h et débit de gaz de désolvation = 350 l/h. Les composants de la phase mobile sont l'acide formique aqueux à 0,1% (A) et l'acétonitrile avec 0,1% d'acide formique (B). Le gradient de phase mobile est à 0 min, 90% de A; à 18 minutes, 30% de A; 18-23 minutes, 30% A; à 25 min, 90% A; 25–30 min, 90% A. L'identification des composés phénoliques a été réalisée en se basant sur le temps de rétention, les spectres de masse et les propriétés/masses des ions moléculaires.

### 3. Analyses statistiques

Les données de tous les chapitres de ce travail ont été exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. Les différences entre les moyennes ont été déterminées par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), suivie du test post-hoc (test de Dunnett). GraphPad Prism version 6.0 pour Windows a été utilisé pour l'analyse statistique. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à  $p < 0,05$ .

## III. Résultats et discussion

### 1. Rendement d'extraction

La caractérisation de nouvelles substances naturelles implique plusieurs étapes, les trois principales étant l'extraction, le fractionnement et l'identification de molécules bioactives, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques ([Hostettmann and Wolfender, 2000](#)).

Dans notre travail, les solvants utilisés dans l'extraction ont abouti à des rendements différents d'un extrait à l'autre. Nous avons constaté que le rendement de la fraction d'acétate d'éthyle était le meilleur avec un pourcentage de 8,4%, suivi par la fraction de méthanol et la fraction aqueuse avec des valeurs de 3,2% et 1,2%, respectivement, tandis que l'extrait aqueux avait un pourcentage de 4,2%. Il a été rapporté que la polarité du solvant influence la vitesse d'extraction ([Metrouh-Amir et al., 2015](#)). De plus, l'efficacité d'extraction dépend de nombreux paramètres, notamment le temps et la température d'extraction, ainsi que le volume et le type de solvants utilisés ([Khaled-Khodja et al., 2014](#)).

### 2. Screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition chimique des racines d'*A. longa* a révélé la présence de certaines familles chimiques. En effet, le criblage phytochimique ([Tableau 1](#)) réalisé sur la matière végétale sèche a mis en évidence la présence d'alcaloïdes et de terpénoïdes à des concentrations élevées. Les flavonoïdes et les tanins existaient en concentration modérée, avec une absence totale de saponines et d'anthraquinones.

**Tableau 1:** Résultats du criblage phytochimique des racines d'*Aristolochia longa*

Composants phytochimiques	Résultats
Alcaloïdes	+++
Terpénoïdes	+++
Flavonoïdes	++
Tanins	++
Anthraquinones	-
Saponines	-

(+++) réaction très positive; (++) réaction positive; (+) réaction moyennement positive; (-) test négatif

### 3. Dosage phytochimique

L'analyse qualitative des différentes familles phytochimiques présentes dans les racines d'*A. longa* a été suivie d'un criblage quantitatif des polyphénols des extraits.

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins catéchiques sont présentées dans le [tableau 2](#). Les protocoles utilisés montrent que la fraction d'acétate d'éthyle (FAE) renferment une teneur en polyphénols totaux de  $32,55 \pm 0,43$  mg EAG/g d'extrait, significativement ( $p < 0,05$ ) supérieure à celles de la fraction méthanolique et de l'extrait aqueux ( $24,48 \pm 1,63$  et  $13,13 \pm 0,48$  mg EAG/g d'extrait, respectivement). Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse (FA) ( $28,90 \pm 1,36$  mg EAG/g d'extrait).

Pour le dosage des flavonoïdes et des tanins catéchiques, la fraction d'acétate d'éthyle a montré des valeurs significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées ( $116,86 \pm 4,12$  mg ER/g d'extrait et  $77,64 \pm 1,93$  mg EC/g d'extrait, respectivement) suivies par FA qui a enregistré des valeurs de  $7,60 \pm 0,11$  mg ER/g d'extrait et de  $10,79 \pm 0,49$  mg EC/g d'extrait, respectivement. D'autre part, [Djeridane et al. \(2006b\)](#) ont également quantifié les composés phénoliques des racines d'*A. longa* et ont estimé la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes à  $1,47 \pm 0,02$  mg EAG/g d'extrait et  $0,81 \pm 0,02$

mg ER/g d'extrait, respectivement. Les teneurs importantes en composés phénoliques de cette plante permettent de prévoir des activités pharmacologiques intéressantes. En effet, ces composés sont des métabolites secondaires végétaux ayant une large gamme d'activités pharmacologiques telles que des activités anticancéreuses, antivirales, anti-inflammatoires, antidiabétiques, anti-oxydantes, etc. (Badami et al., 2005; Abdel-Hameed et al., 2012; Sivaraj et al., 2018). Des études antérieures, qui ont examiné d'autres espèces d'*Aristolochia* telles que *A. bracteolata* et *A. indica*, ont montré que l'extrait de méthanol de chaque plante contient une grande quantité de phénols et de flavonoïdes (Badami et al., 2005; Sivaraj et al., 2018). Les composés phénoliques constituent un groupe important et complexe de constituants chimiques présents dans les plantes et sont des composés de défense classiques pour protéger les plantes contre les herbivores et les agents pathogènes (Walton et al., 2003).

Ces résultats confirment la richesse d'*A. longa* en polyphénols, préalablement détectés par criblage phytochimique. Toutefois, il est impératif d'identifier les principales molécules de chaque extrait. Pour cela, une analyse HPLC-MS des extraits a été réalisée.

**Tableau 2:** Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins catéchiques des extraits d'*Aristolochia longa*

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg ER/g d'extrait)	Tanins catéchiques (mg EC/g d'extrait)
FM	24,48 ± 1,63 <sup>b</sup>	7,00 ± 0,61 <sup>b</sup>	05,78 ± 0,28 <sup>a</sup>
FAE	32,55 ± 0,43 <sup>c</sup>	116,86 ± 4,12 <sup>c</sup>	77,64 ± 1,93 <sup>c</sup>
FA	28,90 ± 1,36 <sup>b,c</sup>	07,60 ± 0,11 <sup>b</sup>	10,79 ± 0,49 <sup>b</sup>
EA	13,13 ± 0,48 <sup>a</sup>	03,80 ± 0,32 <sup>a</sup>	06,87 ± 0,32 <sup>a,b</sup>

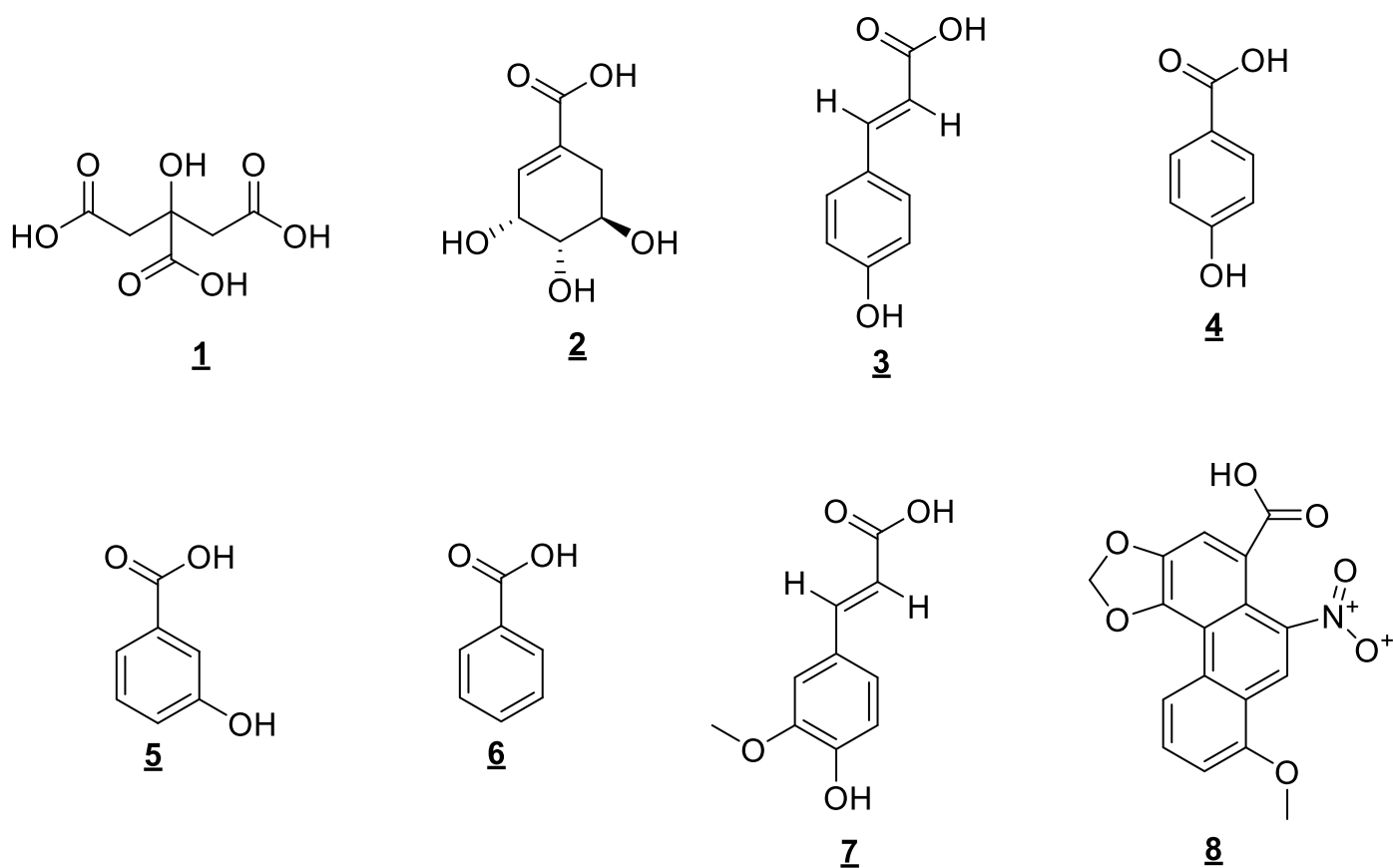
Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations ± écart-type.

Les valeurs de la même colonne ne partageant pas une lettre commune (a à c) diffèrent significativement à  $p < 0,05$ .

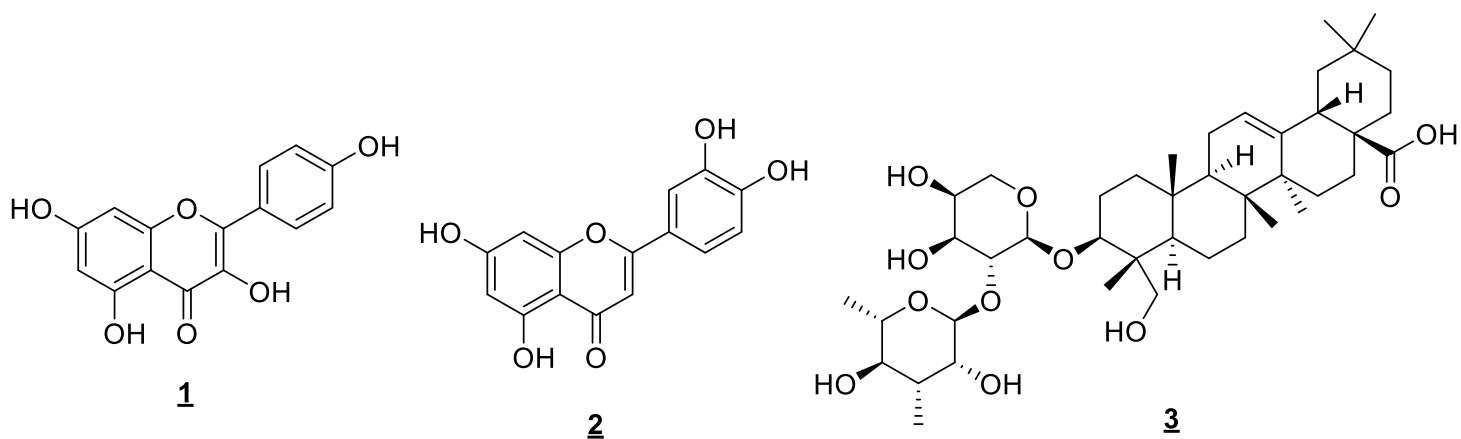
FM: fraction méthanolique; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FA: fraction aqueuse; EA: extrait aqueux.

#### 4. Identification et quantification des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse (CLHP/SM)

Les composés phytochimiques des extraits d'*Aristolochia longa* ont été déterminés par analyse HPLC-DAD/TOF-MS en comparant les temps de rétention et les spectres de masse à ceux des standards authentiques (Figures 10, 11, 12 et 13; voir annexe). Les composés phénoliques des extraits sont résumés dans le tableau 3. Comme indiqué, tous les extraits d'*A. longa* étaient riches en composés phénoliques. En effet, trente-deux molécules ont été identifiées et quantifiées. Cette analyse a révélé des variabilités importantes entre les extraits pour tous les composés mesurés (Figures 5 et 6). L'acide citrique était le principal composé de la fraction aqueuse ( $1623,6 \pm 81,2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait) et de l'extrait aqueux ( $890,5 \pm 44,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait). A propos de la fraction méthanolique, les principaux composés étaient l'acide 4-hydroxycinnamique ( $829,8 \pm 41,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait) et la lutéoline ( $2443,9 \pm 122,2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait). Par ailleurs, les composés phénoliques majeurs de la fraction d'acétate d'éthyle étaient l'acide 4-hydroxybenzoïque ( $3081,0 \pm 154,0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait), l'acide 3-hydroxybenzoïque ( $8141,5 \pm 407,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait), l'acide benzoïque ( $3733,6 \pm 186,7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait), l'acide 4-hydroxycinnamique ( $10676,4 \pm 533,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait), l'acide férulique ( $3828,9 \pm 191,4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait) et le kaempférol ( $8943,0 \pm 447,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait). La variabilité des composés phénoliques dans la fraction d'acétate d'éthyle est certainement liée aux solvants d'extraction. Ce qui était auparavant prouvé par le dosage phytochimique.



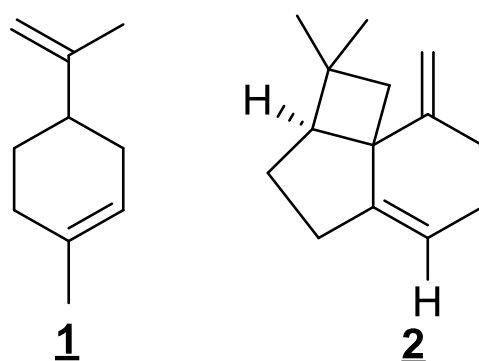
**Figure 5:** Structures chimiques des acides phénoliques (schématisées par Chem-Draw)  
 (1: acide citrique; 2: acide quinique; 3: acide 4-hydroxycinnamique; 4: acide 4-hydroxybenzoïque; 5: acide 3-hydroxybenzoïque; 6: acide benzoïque; 7: acide férulique; 8: acide aristolochique)



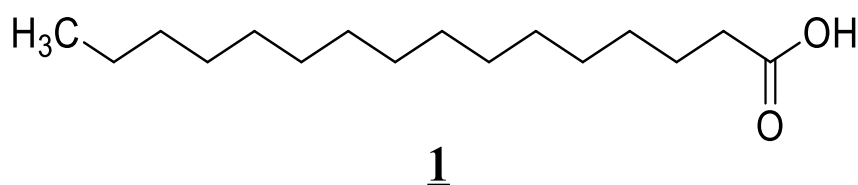
**Figure 6:** Structures chimiques des flavonoïdes (schématisées par Chem-Draw)  
 (1: kaempférol; 2: lutéoline; 3: C-hétéroside)



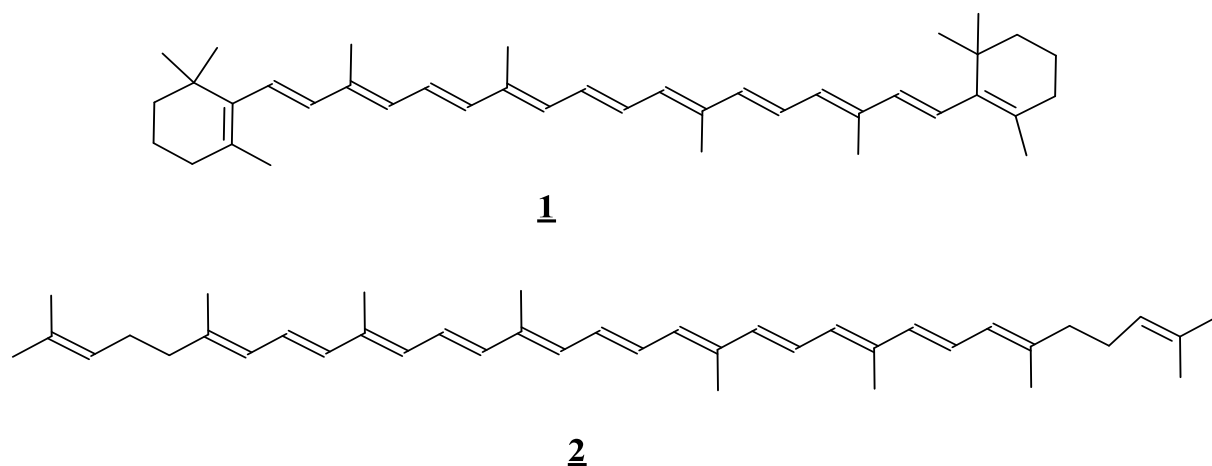
En outre, la synthèse des composés phénoliques dans les plantes médicinales dépend de la régulation spécifique des tissus. Ce contrôle est principalement médié par des facteurs épigénétiques (Avramova, 2015; Vriet et al., 2015). D'autres études ont rapporté qu'*A. longa* est riche en composés bioactifs tels que l'acide aristolochique, le limonène, le  $\beta$ -carotène, le lycopène, le  $\beta$ -caryophyllène et l'acide palmitique (Figures 5, 7, 8 et 9), qui ont prouvé leurs effets pharmacologiques (Cherif et al., 2009; Talbaoui et al., 2016; Merouani et al., 2017). Cette différence peut être due aux origines géographiques de la plante, aux stimuli environnementaux, aux conditions climatiques et aux méthodes d'extraction, qui affectent le rendement des métabolites secondaires (Rodrigues et al., 2013; Alipour and Saharkhiz, 2016). Cependant, au meilleur de nos connaissances, la composition chimique d'*A. longa* n'a jamais été analysée par CLHP/SM.



**Figure 7:** Structures chimiques des terpénoïdes (schématisées par Chem-Draw)  
(1: limonène; 2: bêta-caryophyllène)



**Figure 8:** Structure chimique de l'acide palmitique (schématisée par Chem-Draw)



**Figure 9:** Structures chimiques des caroténoïdes (schématisées par Chem-Draw)  
(1: bêta-carotène; 2: lycopène)

**Tableau 3:** Composés phénoliques quantifiés des extraits d'*Aristolochia longa*

Composés phénoliques	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse	Fraction d'acétate d'éthyle	Extrait aqueux
Acide quinique	10,8 ± 0,5	158,1 ± 7,9	627,5 ± 31,4	424,4 ± 21,2
L'acide malique	80,9 ± 4,0	598,3 ± 29,9	621,1 ± 31,0	64,1 ± 3,2
Pyrogallol	7,6 ± 0,4	10,3 ± 0,5	7,1 ± 0,4	0,7 ± 0,0
Acide citrique	113,0 ± 5,6	1623,6 ± 81,2	4,9 ± 0,2	890,5 ± 44,5
Acide succinique	16,2 ± 0,8	9,2 ± 0,5	391,7 ± 19,6	79,2 ± 4,0
Acide gallique	6,2 ± 0,3	0,9 ± 0,0	160,7 ± 8,0	1,0 ± 0,0
Acide chlorogénique	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	5,4 ± 0,3	0,5 ± 0,0
Acide 3,4- hydroxybenzoïque	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	11,6 ± 0,6	0,5 ± 0,0
Pyrocatechol	11,6 ± 0,6	5,5 ± 0,3	124,5 ± 6,2	3,5 ± 0,2
Acide 4- hydroxybenzoïque	78,5 ± 3,9	13,5 ± 0,7	3081,0 ± 154,0	32,1 ± 1,6
Acide 3- hydroxybenzoïque	194,8 ± 9,7	32,2 ± 1,6	8141,5 ± 407,1	75,1 ± 3,7
Catéchine	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	2,9 ± 0,1	0,2 ± 0,0

Acide caféique	42,7 ± 2,1	31,1 ± 1,6	264,3 ± 13,2	60,8 ± 3,0
Épicatéchine	29,7 ± 1,5	4,8 ± 0,2	5,7 ± 0,3	0,3 ± 0,0
Acide benzoïque	188,7 ± 9,4	24,3 ± 1,2	3733,6 ± 186,7	2,0 ± 0,1
Gallate d'épigallocatechine	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0
Acide syringique	29,3 ± 1,5	11,0 ± 0,5	139,1 ± 7,0	23,1 ± 1,2
Acide vanillique	16,2 ± 0,8	10,4 ± 0,5	328,0 ± 16,4	46,5 ± 2,3
Acide 4- hydroxycinnamique	829,8 ± 41,5	404,1 ± 20,2	10676,4 ± 533,8	196,9 ± 9,8
Rutine	63,0 ± 3,1	14,3 ± 0,7	3,2 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Acide sinapique	4,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	25,1 ± 1,2	6,2 ± 0,3
Acide 3- hydroxycinnamique	1,8 ± 0,1	0,3 ± 0,0	17,7 ± 0,9	0,1 ± 0,0
Acide férulique	185,3 ± 9,3	95,6 ± 4,8	3828,9 ± 191,4	303,4 ± 15,2
Quercétine	1,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	6,5 ± 0,3	0,4 ± 0,0
Acide 2- hydroxycinnamique	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Acide salicylique	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,0	20,4 ± 1,0	0,7 ± 0,0
Naringine	147,7 ± 7,4	57,4 ± 2,8	173,3 ± 8,7	80,4 ± 4,0
Acide rosmarinique	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,0	5,2 ± 0,3	0,2 ± 0,0
Lutéoline	2443,9 ± 122,2	566,8 ± 28,3	32,2 ± 1,6	15,1 ± 0,7
Resvératrol	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	3,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Quercitrin	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Kaempférol	440,7 ± 22,0	133,2 ± 6,6	8943,0 ± 447,1	16,2 ± 0,8
Hespérétine	ND	ND	ND	ND
Hespéridine	ND	ND	ND	ND
Naringénine	ND	ND	ND	ND
4-Hydroxycoumarine	ND	ND	ND	ND

Esculine	ND	ND	ND	ND
Esculétine	ND	ND	ND	ND
Acide tannique	ND	ND	ND	ND

Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart-type ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

ND: non détecté.

#### IV. Conclusion

Dans ce travail, on s'est consacré à l'étude chimique de quatre extraits d'*A. longa* en tant que matière première naturelle particulièrement riche en métabolites secondaires biologiquement actifs. L'analyse chromatographique de ces extraits nous a permis d'identifier un profil complexe. En effet, les molécules détectées sont nombreuses et appartiennent à plusieurs familles chimiques dont les propriétés physico-chimiques sont différentes d'une plante à l'autre. L'analyse du contenu phénolique par HPLC-DAD a révélé la présence de plusieurs composés bioactifs majeurs tels que l'acide férulique, l'acide 4-hydroxycinnamique, l'acide citrique et l'acide quinique.

Dans l'ensemble, Les résultats de l'analyse phytochimique nous permettent de constater que les racines de cette plante peuvent constituer une source prometteuse de biomolécules. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour isoler les constituants chimiques qui peuvent être responsables de chaque effet thérapeutique.

## Chapitre 2: Etude toxicologique de l'extrait aqueux d'*Aristolochia longa*

### I. Introduction

L'utilisation répandue de la médecine traditionnelle vient de la croyance populaire que les plantes médicinales ont une très faible toxicité en raison de leur origine naturelle. Les pratiques de la médecine traditionnelle varient d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. Elles sont influencées par des facteurs tels que la culture, l'histoire et les croyances personnelles. Les habitants des pays sous-développés utilisent des produits naturels, qui sont parfois le seul arsenal thérapeutique disponible pour les guérisseurs traditionnels (Kessy, 1998). Les plantes médicinales peuvent donc constituer des ressources importantes pour de nouvelles substances à potentiel thérapeutique et à faible coût. Cependant, de nombreuses plantes utilisées en phytothérapie sont réputées toxiques. En effet, des formulations inappropriées, des falsifications, une sous-estimation des risques d'interaction entre les plantes et les médicaments, et l'ignorance des doses à utiliser dans la préparation et l'administration des médicaments peuvent conduire à des accidents thérapeutiques et des effets indésirables qui peuvent être tragiques (Adjoungoua et al., 2006).

En pharmacologie, l'efficacité d'une plante ou d'un constituant naturel n'est pas suffisante pour justifier son usage thérapeutique. En effet, chaque substance bioactive est susceptible d'avoir des effets délétères, au moins à fortes doses et pendant de longues périodes, pour la santé humaine (Soetan and Aiyelaagbe, 2009). Outre l'efficacité, la dose active doit être exempte de toute toxicité et démontrer l'innocuité. Dans l'indication thérapeutique de toute substance, il est donc impératif de définir son rapport bénéfice/risque.

La plante choisie dans notre travail est fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine. En effet, l'utilisation d'*Aristolochia longa* est indiquée pour plusieurs maux. Cependant, l'utilisation la plus répandue au Maroc est contre le

cancer. Malgré l'importance de cette plante dans l'amélioration ou la guérison de certains processus pathologiques, elle contient de l'AA (Mengs and Stotzem, 1993; Vanhaelen, 1994), qui est la toxine responsable des syndromes cliniques appelés néphropathie aux herbes chinoises (NHC) et néphropathie endémique des Balkans (Grollman et al., 2009). Généralement, une substance toxique peut perturber immédiatement ou à long terme, de manière aiguë ou chronique, le fonctionnement biologique d'un organisme vivant (Chattopadhyay, 1996).

Pour cela, et compte tenu de la large utilisation de cette plante, il est important de mettre en évidence ses propriétés toxicologiques, afin d'optimiser son utilisation. Pour cette raison, l'effet toxique de l'extrait aqueux des racines d'*A. longa* sur les paramètres biochimiques et histologiques a été évalué au fil du temps.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Animaux**

Les animaux utilisés dans cette étude étaient des rats albinos (de la lignée Wistar) des deux sexes, sélectionnés au hasard, dont le poids varie entre 140 et 174 g, placés dans des cages transparentes contenant de la sciure de bois et acclimatés à des conditions d'élevage standard; un cycle lumière/obscurité de 12/12h et une température variant de 22–24°C dans des pièces bien aérées, à l'animalerie centrale de la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. Ils ont eu libre accès à un régime alimentaire standard et à l'eau pendant l'expérience. Ces rongeurs ont été mis à jeun 16 heures avant chaque traitement. Ils ont été utilisés conformément au « guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire » (Council, 2011).

### **2. Test de toxicité**

Dans l'optique d'étudier la toxicité orale des racines d'*A. longa* dans le temps et à différentes doses, un nouveau protocole expérimental a été adopté permettant de suivre le développement de cette toxicité chez les animaux. Le gavage des animaux a été réalisé à l'aide d'une sonde intra-gastrique. Les rats ont été répartis au hasard en 6

groupes de 8 animaux chacun (mâles et femelles), et ils ont été marqués pour une identification individuelle.

Le groupe témoin a reçu uniquement le véhicule (eau distillée), tandis que les cinq autres lots ont reçu des doses quotidiennes croissantes d'extrait aqueux d'*A. longa* (EAAL), respectivement (0,8; 1,25; 2; 2,5 et 5 g/kg de poids corporel (p. c.)), pendant 3 semaines réparties en 4 périodes; la 1<sup>ère</sup> semaine de traitement, le 11<sup>ème</sup> jour, le 16<sup>ème</sup> jour et le 21<sup>ème</sup> jour du début de l'expérience. Le volume administré quotidiennement en une seule dose était de 1 mL/100 g (p. c.). Le comportement des rats a été observé régulièrement et les poids mesurés quotidiennement, en notant également le nombre de décès.

A la fin de chaque période, les animaux ont été anesthésiés et sacrifiés par décapitation. Le sang de chaque animal a été recueilli dans des tubes à vide contenant de l'héparine de lithium anticoagulante et centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 minutes. Le sérum obtenu a été conservé à -20°C pour une analyse biochimique. Les organes (foie, rein et intestin) ont été prélevés, rincés avec une solution saline (0,9%) et pesés. Le poids relatif du foie et des reins a été calculé suivant la formule:

$$\text{Pr} = \frac{\text{Po}}{\text{Pa}} \times 100$$

- Pr : poids relatif de l'organe (g/100 g);
- Po : poids de l'organe (g);
- Pa : poids corporel du rat (g).

### **3. Changements du comportement**

Au cours des trois semaines d'étude, les symptômes cliniques de morbidité et le comportement général ont été observés quotidiennement et individuellement chez tous les animaux, après l'administration de la solution. Toutes les observations ont été systématiquement enregistrées et axées sur la mobilité, la sensibilité au bruit, la respiration, les convulsions, les vomissements, la diarrhée, la salivation, le sommeil

et le coma. De plus, tous les signes de toxicité ou de décès apparus ont été enregistrés.

#### **4. Poids corporel**

Tout au long de la période d'exposition, nous avons suivi le poids individuel de chaque rat par pesée quotidienne. Les changements sont calculés et présentés dans la [figure 14](#).

#### **5. Paramètres biochimiques**

La fonction rénale était déterminée par la créatinine plasmatique et l'urée, tandis que la fonction hépatique était déterminée par l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT). Ces analyses biochimiques ont été réalisées par des méthodes standard à l'aide d'un analyseur biochimique automatisé de type COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne).

#### **6. Histopathologie**

Après la pesée, les organes ont été sectionnés en petites tranches et conservés dans du formol à 10% pendant 48 heures, puis déshydratés par une solution d'alcool en série à degrés croissants, nettoyés avec du toluène et immergés dans de la paraffine liquide. Des coupes de 4 microns ont été réalisées à l'aide d'un microtome et colorées à l'hématoxyline-éosine. Des lames ont été montées puis observées au microscope optique et des images ont été enregistrées ([Figure 14](#)) ([Munro, 1971](#); [Thomson et al., 1998](#)).





**Figure 14:** Préparation de coupes histologiques pour observation au microscope optique

### III. Résultats et discussion

Environ 85% de la population des pays en développement utilise des plantes médicinales pour leurs soins de santé primaires (Feroze, 1969). Cette utilisation répandue peut être due au bas prix et à la conviction qu'ils n'ont pas d'effets néfastes (Springfield et al., 2005). *A. longa* contient des principes bioactifs qui peuvent être

bénéfiques et/ou nocifs. En fait, les plantes du genre *Aristolochia* sont riches en acides nitrophénanthrène carboxyliques, principalement en acide aristolochique (Gabardi et al., 2007), qui est une combinaison d'acides structuraux (AA I et AA II) (Kumar et al., 2003) avec un effet toxique (Grollman et al., 2009). Une évaluation toxicologique formelle de cette plante est nécessaire afin de définir sa toxicité intrinsèque, ses effets en cas de surdosage (Cáceres, 1996), et de pouvoir sélectionner une dose anodine chez l'homme en évaluant les limites de toxicité de la plante sur les animaux.

### **1. Comportement des animaux**

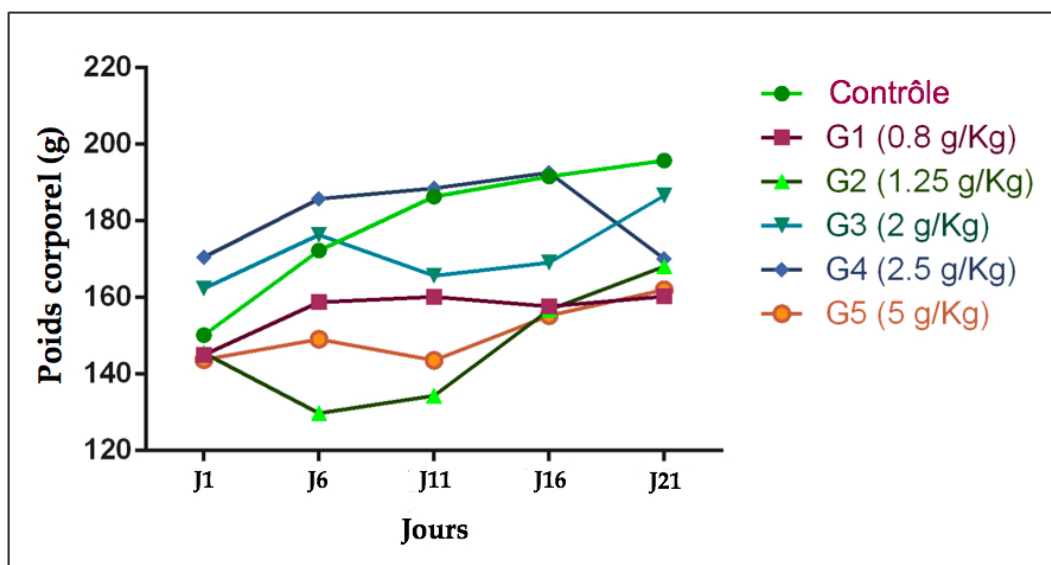
L'évaluation des comportements généraux est utilisée comme un indicateur nécessaire à vérifier ainsi que l'évolution du poids corporel car ce sont parmi les premiers signes de toxicité (Panunto et al., 2010; Almança et al., 2011).

Le comportement des rats a été observé, en comptant la mortalité pendant 21 jours d'administration de l'extrait aqueux ou du solvant (contrôle). Des doses inférieures à 2 g/kg n'ont pas donné de signes graves d'intoxication. Cependant, au 4<sup>ème</sup> jour de traitement, 2g/kg d'extrait ont provoqué chez un animal un œdème du côté droit sous l'épaule, une détresse respiratoire et un ralentissement des mouvements. Concernant la dose de 2,5 g/kg au 15<sup>ème</sup> jour, un rat a vomi une heure après l'administration. Au 3<sup>ème</sup> jour de la dose la plus élevée, des anomalies de coordination et une diminution de la motilité des rats ont été notées. Le jour qui suit, tous les signes ont disparu. En effet, tous les changements observés sont survenus au moins 2 heures après le gavage et ont disparu en fonction de la dose d'extrait. On peut déduire que l'ingestion d'EAAL à des doses élevées peut entraîner des changements de comportement transitoires et de faible intensité, ce qui est cohérent avec les résultats de Guinnin et al. (2017) qui ont enregistré des signes cliniques de courte durée après l'administration de l'extrait éthanolique d'*A. albida* à des animaux.

### **2. Poids corporel des animaux**

Concernant les changements du poids corporel en comparaison avec celui du premier jour de l'expérience, un gain de poids significatif a été noté, après 21 jours, aussi bien chez les rats témoins que chez les rats traités. Cependant, à la fin de

l'expérience, une différence est observée entre les groupes, et le poids des animaux traités est resté inférieur à celui des animaux témoins. Ces changements de poids observés entre les témoins et les rats traités sont statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ). Pendant la période de traitement, tous les groupes ont enregistré des diminutions significatives ( $p < 0,05$  à  $p < 0,001$ ) du gain de poids corporel par rapport à leurs homologues du groupe témoin (Figure 15).

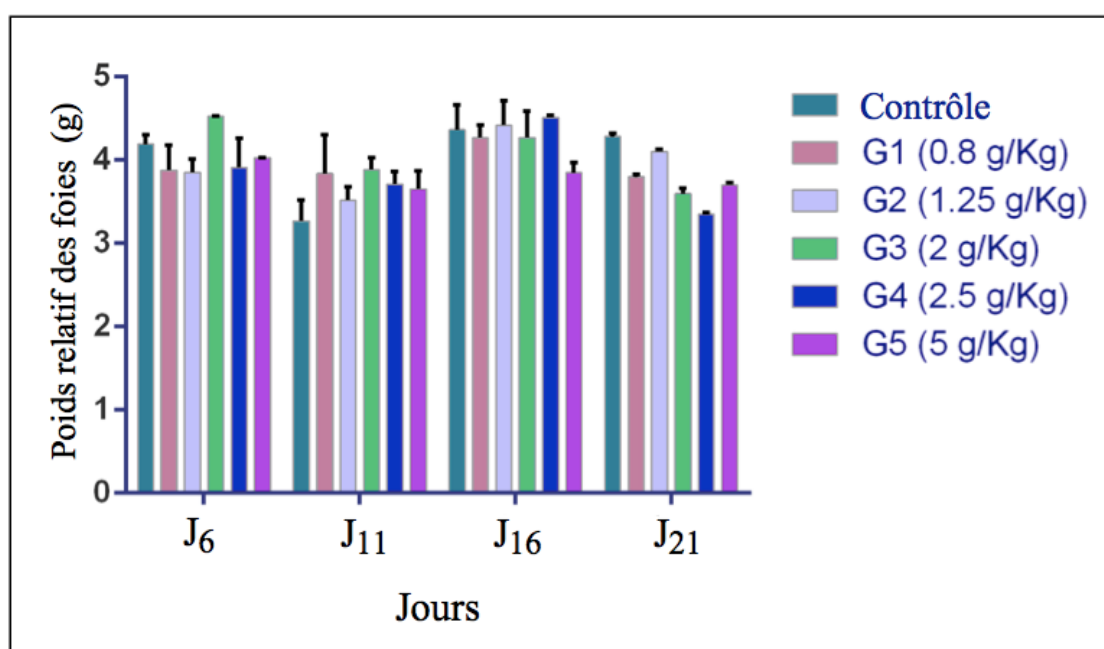


**Figure 15:** Modifications du poids corporel chez les rats traités avec l'extrait aqueux d'*Aristolochia longa*

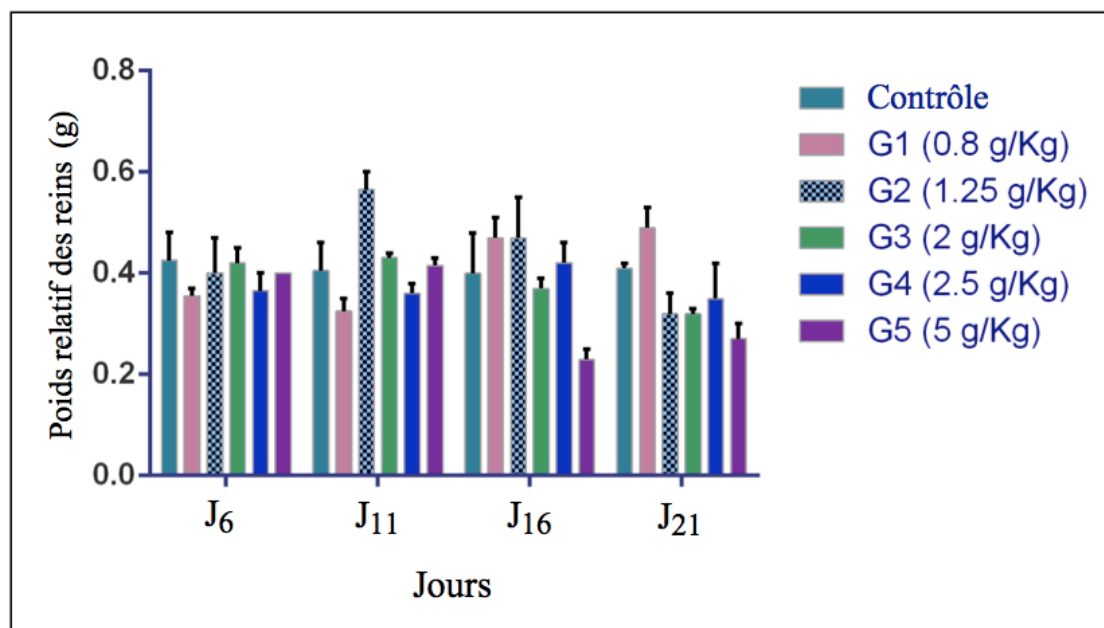
Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'extrait a favorisé la croissance pondérale de tous les rats lors de la dernière pesée (21<sup>ème</sup> jour). Cela pourrait être dû à l'augmentation de la consommation alimentaire des animaux en stimulant leur appétit grâce à l'extrait (Gome et al., 2011). En revanche, la perte de poids observée au cours du traitement pourrait être liée à plusieurs facteurs tels que le stress des animaux, les interactions dose/absorption et la mauvaise assimilation alimentaire par la présence de polyphénols (Guinnin et al., 2017). Une diminution similaire du poids corporel a été notée chez les souris ayant reçu 5 g/kg de l'extrait aqueux des racines d'*A. longa* pendant 4 semaines (Cherif et al., 2014). De ces résultats, on peut supposer que l'EAAL a retardé la croissance biologique des rats au fil du temps.

### 3. Poids relatif des organes

Le foie et les reins sont parmi les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoquée par une substance toxique (Jothy et al., 2011). Concernant notre étude, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée pour le foie, entre le contrôle et les différentes doses de l'extrait, sauf pour le 21<sup>ème</sup> jour où une diminution a été observée pour toutes les doses (Figure 16). Les reins prélevés n'ont montré aucune variation significative de leur poids, à l'exception d'une augmentation enregistrée au 11<sup>ème</sup> jour à la dose de 1,25 g/kg (Figure 17). La diminution significative du poids relatif du foie chez tous les rats traités par EAAL au cours de la dernière période de traitement, serait due à un effet toxique probable de l'extrait (Sellers et al., 2007). Habituellement, les modifications de gain de poids corporel et du poids des organes internes reflètent une toxicité après exposition à une substance toxique (OA et al., 2002; Teo et al., 2002).



**Figure 16:** Effets de l'EAAL sur le poids relatif des foies. Les valeurs sont la moyenne de deux déterminations  $\pm$  écart-type



**Figure 17:** Effets de l'EAAL sur le poids relatif des reins. Les valeurs sont la moyenne de deux déterminations  $\pm$  écart-type

#### 4. Paramètres biochimiques

Dans cette étude, la toxicité hépatorenale a également été étudiée en dosant certains paramètres biochimiques. L'ALT est une enzyme cytosolique sécrétée dans les hépatocytes et libérée dans le sang en cas de nécrose hépatocytaire (Dufour et al., 2000; Kaneko et al., 2008). C'est une enzyme spécifique du foie, ce qui en fait un indicateur important et très sensible de l'hépatotoxicité (Pratt and Kaplan, 2000; Al-Habori et al., 2002). L'AST est également un indicateur de la destruction des hépatocytes, bien qu'en plus du foie, on la trouve dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et les reins (Dufour et al., 2000). Les transaminases (ALT et AST) sont des enzymes ayant une activité métabolique significative dans les cellules, et des taux sériques accrus reflètent des lésions hépatiques causées pour diverses raisons, notamment la nécrose des cellules hépatiques, l'hépatite, la cirrhose et l'hépatotoxicité de certains médicaments (Dufour et al., 2000; Pratt and Kaplan, 2000).

Dans le cas de ce travail, l'évaluation des paramètres biochimiques nous a permis de révéler les effets probables des racines d'*A. longa* sur le foie et les reins. Comme

indiqué dans le [tableau 4](#), l'analyse globale des biomarqueurs hépatiques a montré une augmentation significative entre le contrôle et les différentes doses de l'extrait, de la première à la troisième semaine de traitement. La dose la plus élevée d'extrait a entraîné, en fin de traitement, une augmentation marquée et significative de l'AST ( $189,5 \pm 2$  UI/L) et de l'ALT ( $87,3 \pm 2,1$  UI/L) par rapport aux témoins (AST:  $93,3 \pm 6,6$  UI/L; ALT:  $32,7 \pm 1,1$  UI/L;  $p < 0,05$ ).

**Tableau 4:** Effet de l'EAAL sur la fonction hépatique (AST et ALT) chez les rats

Groupes	AST (UI/L)				ALT (UI/L)			
	Jour 6	Jour 11	Jour 16	Jour 21	Jour 6	Jour 11	Jour 16	Jour 21
<b>Contrôle</b>	100,8±6,4	101,32±5,12	80,0±3	93,3±6,6	22,8±1,5	25,6±3,1	32,2±3,3	32,7±1,1
<b>G1</b>	134,6±5,4**	107,9±2,5	93,2±0,4	227,4±6,2****	36,6±0,5	37,7 ±2,5*	44,6±3,90*	86,3±2,1****
<b>G2</b>	145,6±1,30***	123,3±0,2*	87,7±2,4	130,8±3,5*	25,3±2,60	31,3 ±2,1	29,7±0,9	45,9±1,4**
<b>G3</b>	122,5±4,6*	139,4±2,9***	106,0±5,2	117,1±5,8	28,7±1,1	35,4 ±0,3	33,5±1,7	34,9±1,3
<b>G4</b>	100,8±2,9	144,8±5,3***	94,8±0,9	107,1±4,7	29,6±0,6*	34,2 ±2,4	43,3±2,1	33,4±1,6
<b>G5</b>	124,1±3,4*	172,5±3,8****	92,0±4,4	189,5±2****	32,2±1,9*	44,0±1,6**	23,7±2,0	87,3±2,1****

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type, n = 2.

\*  $p < 0,05$  par rapport au groupe témoin.

\*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport au groupe témoin.

Les augmentations significatives enregistrées suggèrent que l'administration d'EAAL a altéré les cellules hépatiques et par conséquent l'homéostasie du milieu intérieur des animaux. Ces résultats corroborent ceux de [Benzakour et al. \(2011\)](#) lorsque l'extrait aqueux des racines d'*A. longa* à une dose de 2,5 g/kg (p. c.) a causé des lésions hépatocellulaires. Ceci s'explique également par le fait que le foie est le premier organe exposé à tout ce qui est absorbé en métabolisant des substances étrangères pouvant être hépatotoxiques.

De même, les paramètres sériques de l'évaluation de la fonction rénale présentés dans le [tableau 5](#) ont montré qu'à chaque période de l'expérience, les concentrations d'urée augmentent significativement chez les animaux traités ( $p < 0,05$ ) par rapport aux témoins. La quantification de la créatinine a révélé que, quelle que soit la période de traitement, il y avait une augmentation significative des taux en dehors du 16<sup>ème</sup> jour lorsqu'une augmentation a été notée mais restait non significative. À la fin de l'expérience, il y avait une nette proportionnalité entre la dose et la concentration en créatinine avec des niveaux élevés de  $5,31 \pm 0,13$  et  $5,40 \pm 0,03$  mg/L pour les doses de 2,5 et 5 g/kg, respectivement, par rapport au témoin ( $3,07 \pm 0,12$  mg/L) ([Tableau 5](#)).

**Tableau 5:** Effet de l'EAAL sur la fonction rénale (urée et créatinine) chez les rats

Groupes	Urée (g/L)				Créatinine (mg/L)			
	Jour 6	Jour 11	Jour 16	Jour 21	Jour 6	Jour 11	Jour 16	Jour 21
<b>Contrôle</b>	0,19±0,01	0,26±0,02	0,23±0,02	0,23±0,03	2,48±0,04	2,51±0,04	3,16±0,09	3,07±0,12
<b>G1</b>	0,20±0,01	0,40±0*	0,20±0,02	0,34±0,04	3,94±0,16***	3,36±0,27*	3,26±0,12	3,82±0,08**
<b>G2</b>	0,34±0,02***	0,32±0,03	0,26±0,01	0,40±0,03*	3,57±0,05	4,97±0,17****	3,13±0,16	3,13±0,09
<b>G3</b>	0,29±0,02**	0,29±0,02	0,41±0,02*	0,32±0,03	3,76±0,38***	4,51±0,03***	3,49±0,12	3,51±1
<b>G4</b>	0,25±0,01*	0,25±0,03	0,27±0,03	0,29±0,02	3,33±0,21**	3,21±0,09*	2,72±0,08	5,31±0,13****
<b>G5</b>	0,37±0,03***	0,29±0,02	0,26±0,06	0,33±0,03	3,67±0,09***	3,90±0,08**	3,33±0,17	5,40±0,03****

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type, n = 2.

\*  $p < 0.05$  par rapport au groupe témoin.

\*\*  $p < 0.01$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*  $p < 0.001$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*\*  $p < 0.0001$  par rapport au groupe témoin.

En effet, ces deux paramètres (urée et créatinine) sont considérés comme les marqueurs majeurs de la néphrotoxicité, bien que l'urée soit souvent considérée comme un prédicteur plus fiable de la fonction rénale que la créatinine ([Palani et al., 2009](#)), qui est également un bon indicateur de la fonction rénale ([El Hilaly et al., 2004](#)). L'élévation des taux de créatinine dans le sang est un signe de lésions

fonctionnelles des néphrons (Lameire et al., 2005). Dans ce travail, l'augmentation des paramètres de la fonction rénale était évidente et très significative dès la première semaine, ce qui pourrait suggérer que le rein était très sensible à la toxicité de l'EAAL, mais par la suite il y avait une tolérance à cette substance puisque les taux de ces paramètres ont tendance à se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérience lorsqu'on observe à nouveau une nette augmentation (Tableau 5). Le même résultat, représenté dans le développement d'une insuffisance rénale aiguë, a été obtenu par Yuan et al. (2014) sur des rats traités pendant 28 jours avec *A. fructus* et *A. fructus* frit au miel, ainsi que par Liu et al. (2003), sur le même modèle animal, en administrant 4 g d'*A. manshuriensis* et 4 mg d'acide aristolochique par jour. Cependant, un autre travail qui a également étudié la toxicité de l'extrait éthanolique d'*A. manshuriensis* pendant 8 semaines a révélé que la fonction rénale chez les souris testées n'était pas affectée (Hu et al., 2004).

Les changements observés dans notre test, interféreront avec la capacité du rein à remplir ses rôles excréteurs normaux. Cela peut contribuer à l'élévation des taux d'urée sanguine chez les rats traités par EAAL. Le rein est très sensible aux substances toxiques car un grand volume de sang y circule et filtre de grandes quantités de toxines qui peuvent se concentrer dans les tubules rénaux (Emily, 2007). Cet organe est le principal site de toxicité de l'AA (Qiu et al., 2000).

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons en déduire que notre produit était toxique pour tous les paramètres testés, notamment aux doses élevées. En conséquence, il a perturbé la fonction rénale et hépatique.

## 5. Histopathologie

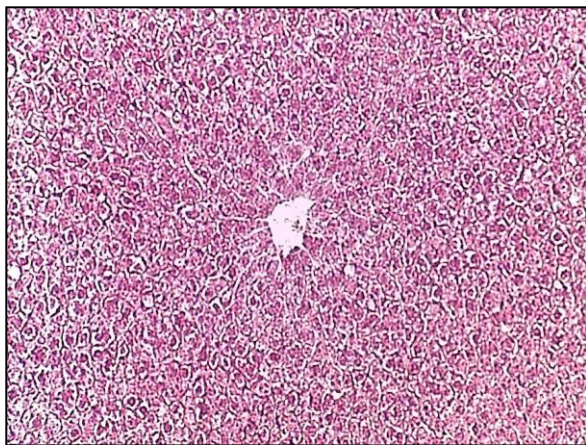
La toxicité hépatorénale a été confirmée par les résultats de l'examen histologique. La majorité des études évaluant la toxicité tissulaire des extraits végétaux donnent des résultats à la fin du processus (Mukinda and Syce, 2007; Rhiouani et al., 2008; Mukinda and Eagles, 2010). L'originalité de notre étude est de pouvoir donner des résultats dans un ordre chronologique au fur et à mesure de l'administration des



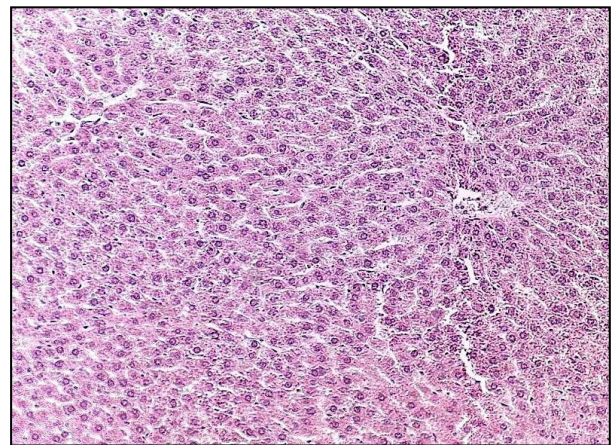
doses quotidiennes d'EAAL. Il n'y avait qu'un seul travail qui a publié des résultats dans un ordre chronologique comparable au nôtre (Cherif et al., 2014).

### 5.1. Foie

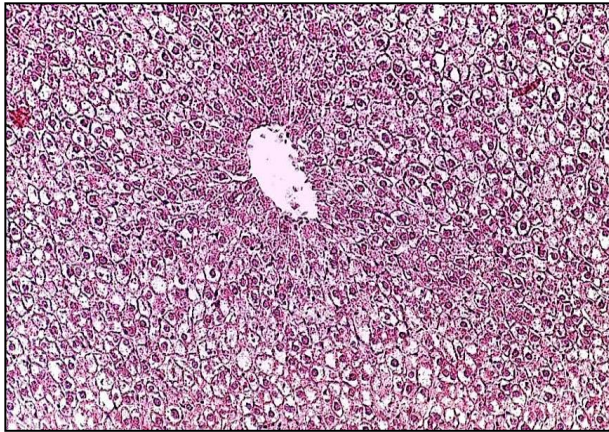
L'observation des coupes histologiques a montré que, pendant les six premiers jours, l'architecture reste préservée avec des hépatocytes d'aspect tout à fait normal. Cependant, à la dose de 5 g/kg, il y avait une légère dilatation sinusoidale focalisée centrolobulaire (Figure 18). Au 11<sup>ème</sup> jour, la stabilité de l'aspect déjà décrit a été observée, avec cependant une accentuation de la dilatation sinusoidale (Figure 19), avec quelques images suggérant une souffrance hépatocytaire focalisée à type de clarification, ballonnisation du cytoplasme, présence de rares macro- et microvésicules (Figure 20) et rétraction nucléaire discrète (Figure 21).



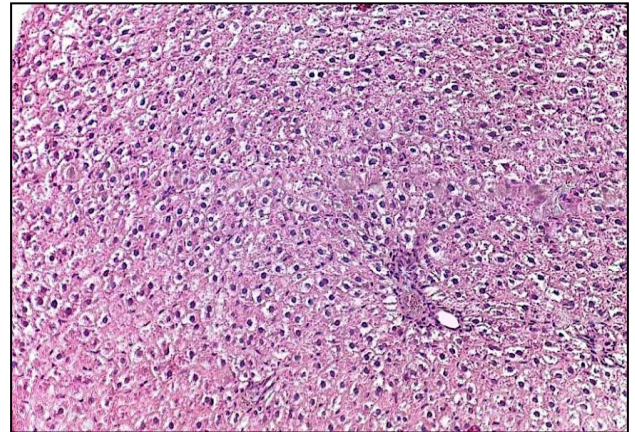
**Figure 18:** Le 6<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Légère dilatation sinusoidale centrolobulaire avec macro- et microvésicules (grossissement × 20)



**Figure 19:** 11<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Accentuation de la dilatation sinusoidale (grossissement × 20)



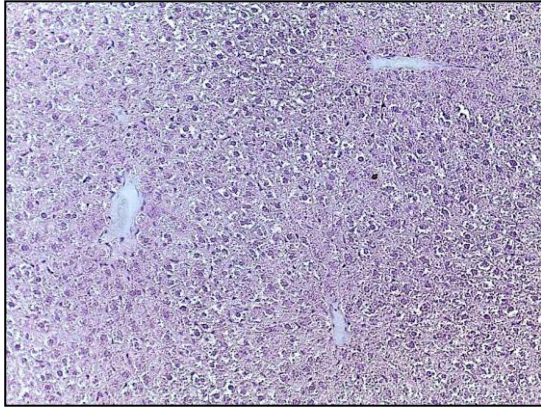
**Figure 20:** Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2 g/kg. Macro- et microvésicules avec clarification et ballonnisation du cytoplasme (grossissement  $\times 20$ )



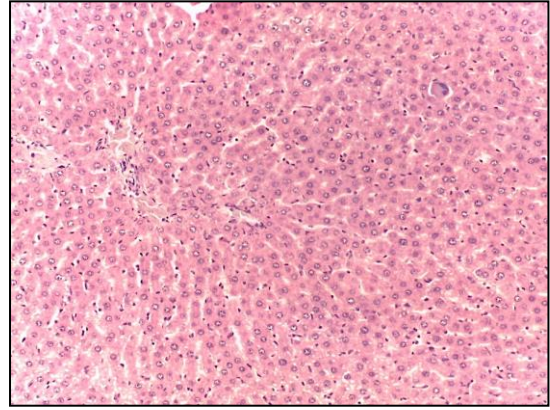
**Figure 21:** Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2 g/kg. Nécrose générale et rétraction nucléaire discrète (grossissement  $\times 20$ )

Au-delà du 16<sup>ème</sup> jour, il y avait une tendance à l'aggravation des lésions. En effet, nous avons noté la présence d'une dissociation cordonale et les signes de souffrance hépatocytaire semblaient encore plus évidents avec quelques foyers de nécrose de liquéfaction (Figure 22).

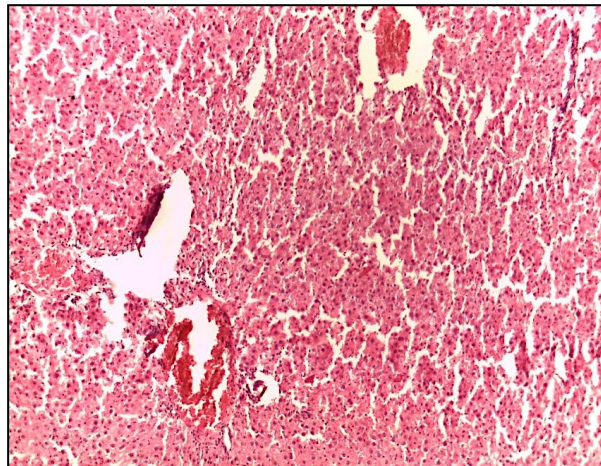
A la dose la plus élevée, nous avons remarqué la présence de certaines cellules macrophagiques de siège périvasculaire correspondant à des cellules de Kupffer hypertrophiées (Figure 23). Par ailleurs, nous avons enregistré la présence de foyers hémorragiques parfois étendus, des images d'œdème et de congestion du parenchyme, des noyaux pycnotiques par endroits et, paradoxalement, l'absence d'infiltrats inflammatoires étendus (Figure 24).



**Figure 22:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Nécrose de liquéfaction (signe de souffrance hépatique) avec congestion et dissociation cordonale (grossissement × 20)



**Figure 23:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Cellule géante (Kupffer) (grossissement × 20)



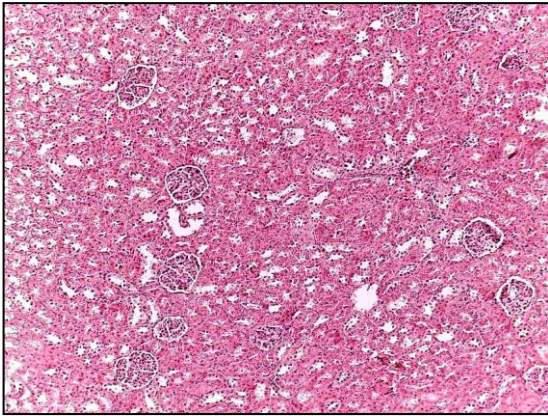
**Figure 24:** Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Présence de foyers hémorragiques, œdème, congestion parenchymateuse, dissociation cordonale et nécrose étendue (grossissement × 10)

Selon [Cherif et al. \(2014\)](#), des anomalies observées telles que la dilatation sinusoidale, la nécrose hépatocytaire et la présence d'un infiltrat inflammatoire dont l'étendue n'était pas précisée sont apparues à la fin des dix premiers jours pour toutes les doses administrées (1,5; 2,5 et 5 g/kg). Ces résultats sont pratiquement identiques aux nôtres, mais ils sont apparus plus tôt (à la fin du 6<sup>ème</sup> jour) et uniquement pour la dose de 5 g/kg. A partir de la 3<sup>ème</sup> semaine (16<sup>ème</sup> jour), dans notre étude, les anomalies ont tendance à s'accroître avec une dissociation cordonale, des images de

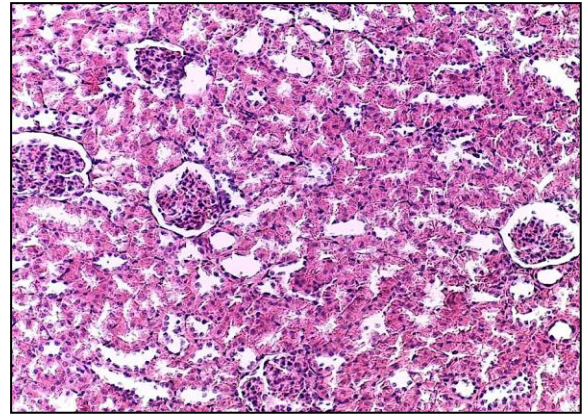
souffrance hépatocytaire d'abord au niveau centrolobulaire pour s'étendre au reste du parenchyme. Tous les auteurs sont unanimes pour attester de cette évolution. Cependant, pour [Cherif et al. \(2014\)](#), la présence d'un infiltrat inflammatoire de nature indéterminée apparaissant précocement s'estompe au 28<sup>ème</sup> jour, ce qui paraît paradoxal puisque d'abord les lésions tissulaires hépatiques et la dilatation sinusoidale étaient toujours présentes; puis d'un autre côté, l'infiltrat inflammatoire que nous avons observé est resté étendu pendant toute la durée de l'expérience. La sévérité des lésions décrites par [Benzakour et al. \(2011\)](#) était impressionnante et n'a été décrite nulle part ailleurs par les auteurs qui ont mené des études similaires sur *A. longa*. Dans ce travail, *A. longa* a montré effectivement une toxicité manifeste au-delà du 16<sup>ème</sup> jour pour les doses élevées et ce de façon progressive, tandis que le foie avait un aspect pratiquement normal pour les faibles doses.

## 5.2. Reins

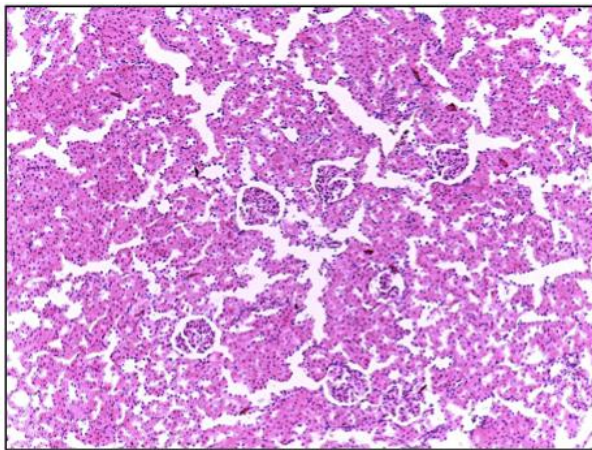
L'aspect histologique des reins des rats sacrifiés a montré une progression lésionnelle similaire à celle du foie précédemment décrite. En effet, pendant les six premiers jours, aucune lésion n'a été notée ([Figure 25](#)). Le 11<sup>ème</sup> jour, les corpuscules de Malpighi aux doses les plus élevées ont montré un élargissement des chambres de filtration, et les tubules urinaires paraissaient d'aspect normal, avec par endroits un épithélium à cellules ballonnées ([Figure 26](#)). À partir du 16<sup>ème</sup> jour, les lésions s'aggravent avec une distorsion de la structure cortico-médullaire, et des signes d'hémorragie, de congestion et d'œdème ([Figures 27 \(a\) et 27 \(b\)](#)). Au niveau des corpuscules de Malpighi, la rétraction des glomérules est encore plus flagrante et correspond à une atrophie glomérulaire ([Figure 28](#)). Les tubules urinaires ont montré une tendance au collapsus luminal avec des cellules qui paraissaient ballonnées rappelant une néphrose osmotique ([Figure 29](#)). En outre, il y avait un infiltrat inflammatoire qui semblait non spécifique et les signes étaient dose-dépendants ([Figure 30](#)). Aux doses les plus élevées, des lacunes hémocortico-médullaires étendues ont été enregistrées.



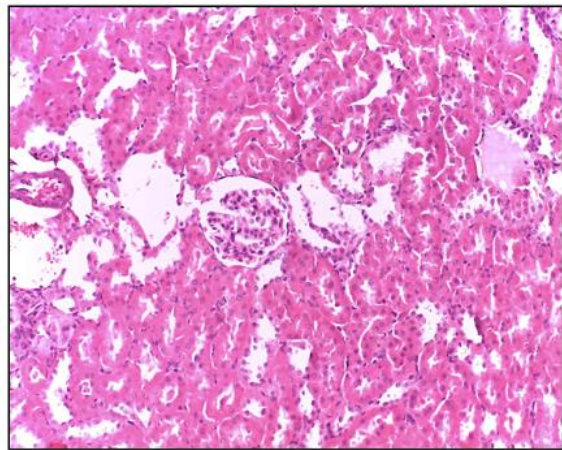
**Figure 25:** Le 6<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Structures normales (grossissement × 10)



**Figure 26:** Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à la dose élevée. Rétraction des glomérules et élargissement des chambres de filtration (× 20)

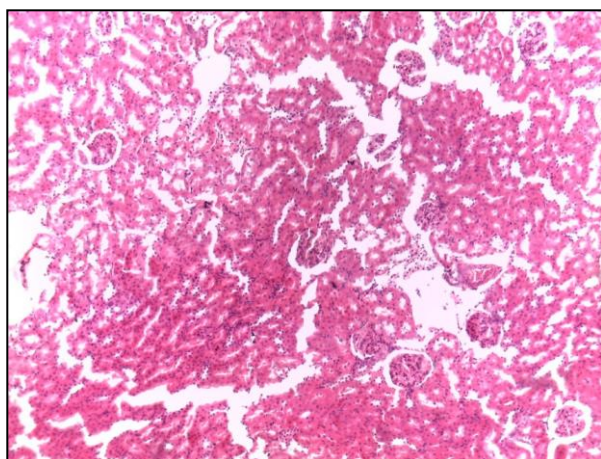


(a)

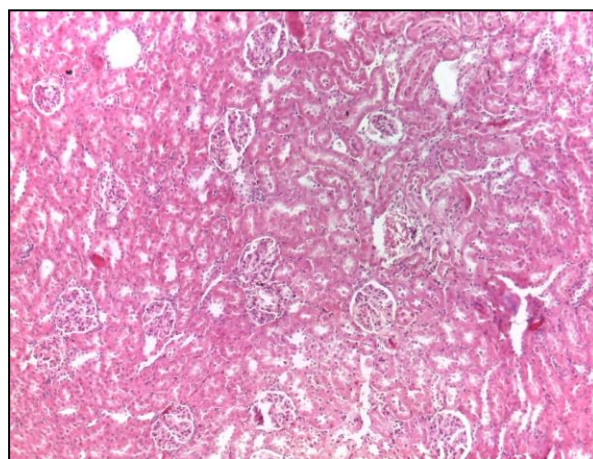


(b)

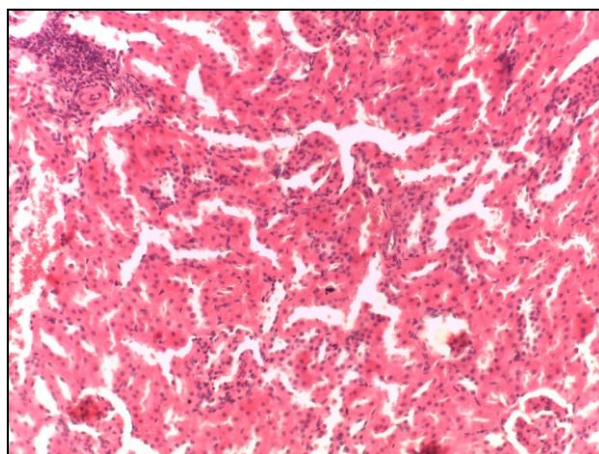
**Figure 27:** (a) Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Distorsion de l'architecture cortico-médullaire avec congestion et œdème (grossissement × 10). (b) Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 1,25 g/kg. Hémorragie et collapsus luminale (grossissement × 20)



**Figure 28:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 2 g/kg. Distorsion et rétraction des glomérules (grossissement × 10)



**Figure 29:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 2,5 g/kg. Hémorragie et ballonnisation des cellules des tubules urinaires (grossissement × 10)



**Figure 30:** Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une dose de 0,8 g/kg. Infiltrat inflammatoire non spécifique avec rétraction des glomérules (grossissement × 20)

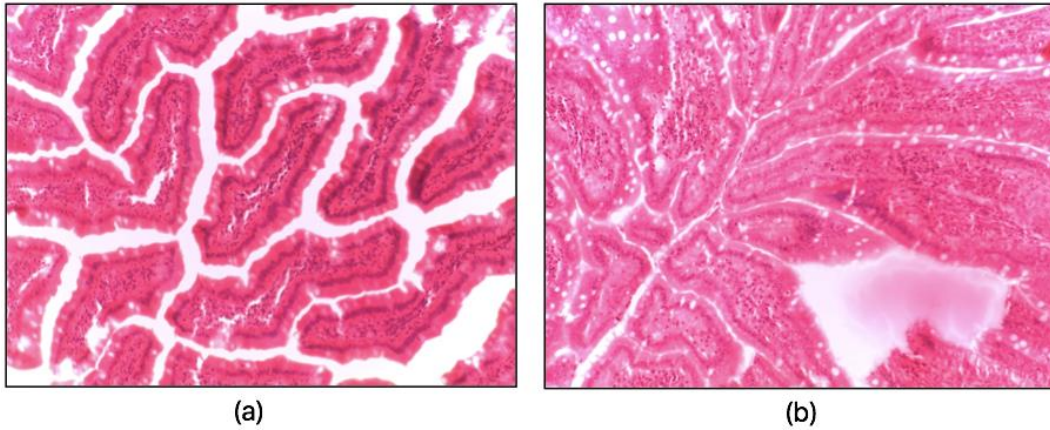
A ce niveau, nous avons observé une progression lésionnelle comme déjà marquée pour le foie; ainsi, vers le 11<sup>ème</sup> jour, nous avons enregistré les premiers signes discrets, à savoir une congestion vasculaire et un élargissement notable de la chambre de filtration aux fortes doses. Ces résultats peuvent être étayés par le travail de [Liu et al. \(2003\)](#) qui a attribué la néphrotoxicité d'*A. manshuriensis* à son acide aristolochique. Cependant, il n'y avait aucune preuve d'atteinte tubulaire telle que rapportée par la plupart des auteurs, même à de faibles doses ([Mengs, 1987](#); [Liu et al., 2003](#); [Grollman et al., 2009](#)). En ce qui concerne les lésions observées, nous

partageons les mêmes aspects histopathologiques avec [Mengs and Stotzem \(1993\)](#) et [Benzakour et al. \(2011\)](#), concernant l'atteinte tubulaire et l'atrophie cellulaire, mais seulement à fortes doses et au-delà du 16<sup>ème</sup> jour. Plusieurs auteurs ont noté la présence d'infiltrat inflammatoire et de fibrose interstitielle provoqués par l'administration de certaines espèces d'*Aristolochia* ([Liu et al., 2003](#); [Hu et al., 2004](#); [Benzakour et al., 2011](#)). La consommation de plantes du genre *Aristolochia* peut aussi entraîner une fibrose interstitielle rénale ([Vanherweghem et al., 1993](#); [Tang and Eisenbrand, 2013](#)). Pour notre série, nous avons effectivement observé un infiltrat inflammatoire qui restait discret, non spécifique et dose-dépendant. Quant à la fibrose, nous avons noté principalement des lacunes hémorragiques parfois étendues, comme le rapportent [Cherif et al. \(2014\)](#). La néphropathie observée peut s'expliquer par la présence d'AA responsable des effets néphrotoxiques ([Mengs, 1987](#); [Mengs and Stotzem, 1993](#); [Arlt et al., 2001](#)) et génotoxiques ([Robisch et al., 1982](#); [Zhang et al., 2004](#)), ainsi que par la présence de phénols ([Berman et al., 1995](#); [Berroukche et al., 2014](#)).

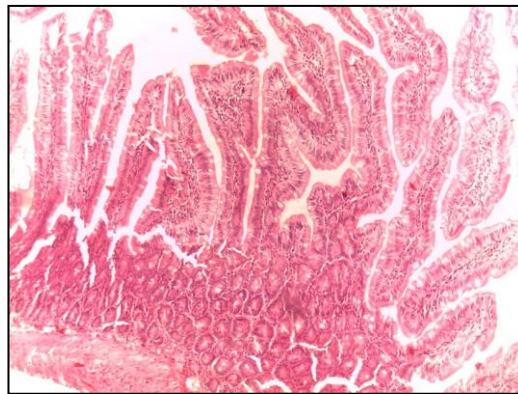
L'originalité de notre travail est l'observation d'une atteinte glomérulaire à type d'élargissement de la chambre de filtration et par conséquent d'une rétraction glomérulaire, et ces atteintes ne sont décrites nulle part ailleurs.

### 5.3. Intestins

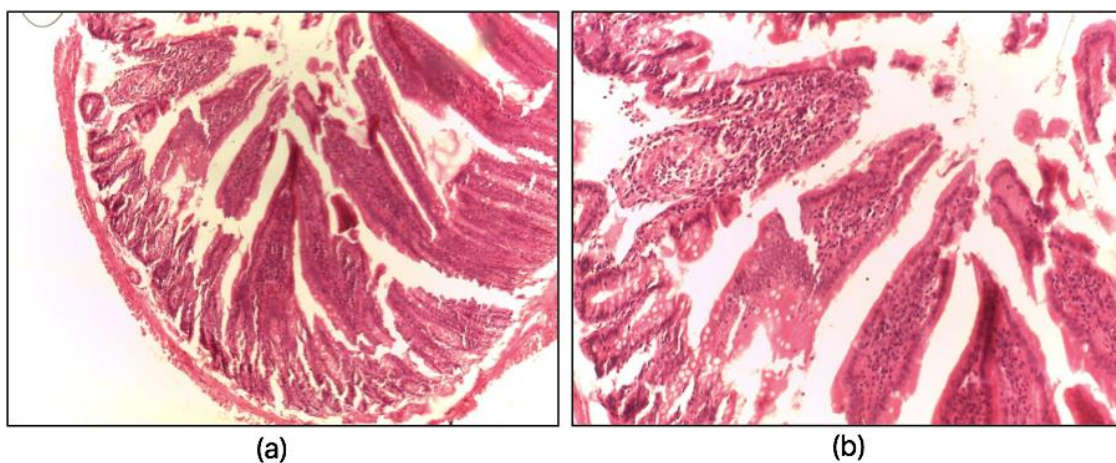
Au niveau de l'intestin, quel que soit la dose administrée au 6<sup>ème</sup> et au 11<sup>ème</sup> jour, aucune anomalie n'a été remarquée ([Figures 31 \(a\) et 31 \(b\)](#)). Au 16<sup>ème</sup> jour, le nombre et la hauteur des villosités ainsi que les glandes de Lieberkühn semblaient normaux ([Figure 32](#)). L'infiltrat inflammatoire intravillositaire semble être sensiblement normal et la proportion entérocyte/cellule à mucus semble respectée. Le 21<sup>ème</sup> jour, les villosités étaient plus fragiles et de taille relativement réduite ([Figure 33 \(a\)](#)). Cependant, l'infiltrat inflammatoire était plus abondant et des signes d'hémorragie étaient évidents ([Figure 33 \(b\)](#)). Il y a également eu une discrète rupture de la proportion entérocyte/cellule à mucus en faveur d'une augmentation relative du nombre des cellules à mucus.



**Figure 31:** (a) Le 6<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Structures normales (grossissement  $\times 20$ ). (b) Le 11<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 1,25 g/kg. Structures normales (glandes et villosités) (grossissement  $\times 20$ )



**Figure 32:** Le 16<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 2,5 g/kg. Structures normales (grossissement  $\times 10$ )



**Figure 33:** (a) Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Fragilité des villosités (grossissement  $\times 10$ ). (b) Le 21<sup>ème</sup> jour du traitement à une concentration de 0,8 g/kg. Fragilité et signes d'hémorragie avec infiltrat inflammatoire abondant (grossissement  $\times 20$ )



Concernant l'intestin, les données bibliographiques en notre possession, ne rapportent qu'une seule observation dans laquelle une atteinte lésionnelle a été constatée dans l'intestin grêle (Benzakour et al., 2011). La toxicité de l'intestin peut se manifester par une atrophie intestinale avec rarification et aplatissement des villosités (Patey-Mariaud et al., 2000), et un contingent inflammatoire généralement exagéré (Liebman et al., 1980). Dans notre cas, nous ne pouvons pas affirmer que nous avons observé ces mêmes lésions, mais néanmoins, nous pouvons noter aux doses élevées quelques signes discrets qui peuvent suggérer une atrophie villositaire. En général, si on prend en considération la présence de l'AA dans les racines de notre plante même à des concentrations très faibles, le mécanisme moléculaire de toxicité des organes étudiés pourrait s'expliquer par la capacité de cet acide à former des adduits à l'ADN lors de l'activation métabolique dans les différents organes *via* un ion nitrenium cyclique (Pfau et al., 1990; Pfau et al., 1991), entraînant par la suite des dommages à l'ADN et un arrêt du cycle cellulaire (Li et al., 2006).

#### **IV. Conclusion**

Compte tenu des données en notre possession, on peut en déduire que *A. longa* semble être toxique, car elle a provoqué une toxicité rénale, hépatique et intestinale. Cependant, au début de l'expérience, la plante n'a pas provoqué d'effets toxiques significatifs même à fortes doses; ceci est probablement dû aux faibles concentrations en acide aristolochique, ou à la diminution de sa toxicité par la présence d'autres molécules bioactives qui pourraient exercer des activités immunomodulatrices capables de provoquer des réponses immunitaires sur les lésions induites.

En conclusion, cette étude a démontré que l'administration orale d'EAAL pendant trois semaines à des doses élevées a un effet dose-réponse. En effet, toutes les espèces d'*Aristolochiaceae* contiennent des niveaux très variés d'AA et si elles sont utilisées correctement, la population peut en bénéficier sans effets toxiques. Des études complémentaires devraient être menées pour déterminer les effets de cette plante sur des animaux gravides, leurs fœtus et leurs descendants, durant des périodes d'étude plus longues, afin de compléter le profil toxicologique de cette plante.

## Chapitre 3: Etude de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits d'*Aristolochia longa*

### I. Introduction

L'oxygène moléculaire est un élément essentiel à la vie des organismes aérobies. Toutefois, il peut former des espèces partiellement réduites et hautement toxiques appelées radicaux libres ou ERO. À faibles doses, ces derniers sont très utiles pour l'organisme et jouent un rôle important dans divers mécanismes physiologiques (Swain et al., 2002). À doses excessives, elles deviennent nocives et toxiques pour l'organisme. La surproduction des ERO au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu à un stress oxydatif qui est impliqué dans de nombreuses maladies (Pincemail et al., 2002).

Afin d'éviter les dommages du stress oxydatif, il est nécessaire d'établir un équilibre oxydant/antioxydant et par conséquent préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études, car en plus de leur intérêt certain pour la conservation des aliments, ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement des maladies dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été remis en question ces dernières années (Tawaha et al., 2007). La substitution d'antioxydants synthétiques par des antioxydants naturels dérivés de plantes médicinales revêt actuellement une grande importance. En effet, les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances aux activités biologiques très variées (Khalaf et al., 2008). Ces substances peuvent agir de différentes manières dans les processus de régulation du stress oxydatif; soit par capture directe des ERO, soit par chélation de métaux de transition ou encore par inactivation de certaines enzymes responsables de la production d'ERO (Cotelle, 2001).

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer le pouvoir antioxydant des extraits de racines d'*A. longa*. Cela s'est effectué au moyen de trois méthodes complémentaires, à savoir le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical cationique ABTS et le pouvoir réducteur du fer, FRAP. En effet, l'étude de l'activité antioxydante d'une plante nécessite la réalisation de plusieurs méthodes ([Aruoma, 2003](#)).

## II. Matériel et méthodes

### 1. Test d'inhibition du radical DPPH

#### 1.1. Principe

La capacité des extraits d'*A. longa* à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) a été déterminée selon la méthode décrite par [Sayah et al. \(2017\)](#) avec quelques modifications. Effectivement, si un antioxydant est présent, ce radical de couleur violette est réduit en un composé (DPPH-H) de couleur jaune par transfert d'hydrogène. L'intensité de la couleur de ce second composé est inversement proportionnelle au pouvoir anti-radicalaire des antioxydants du milieu.

#### 1.2. Mode opératoire

Dans ce test, 2,5 mL de différentes gammes de concentrations de chaque extrait ont été mélangés avec un volume de 0,5 mL d'une solution fraîchement préparée de DPPH (0,2 mM) dans du méthanol.

Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes. Ensuite, l'absorbance (Abs) des mélanges a été mesurée à 517 nm par spectrophotomètre. L'expérience est réalisée en triplicata.

L'activité anti-radicalaire de nos extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon})}{(\text{Abs contrôle négatif})} \times 100$$

Où le contrôle négatif est représenté par une solution du radical DPPH dans le méthanol seul.

Pour comparer les résultats obtenus, la concentration de l'extrait qui inhibe 50% de l'activité des radicaux DPPH ( $CI_{50}$ ) a été calculée à partir du graphique représentant le PI du radical en fonction des concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) de chaque extrait testé (Brand-Williams et al., 1995). Par ailleurs, les valeurs de  $CI_{50}$  ont été calculées à l'aide d'un outil d'analyse statistique et de visualisation graphique «GraphPad Prism v6». L'antioxydant Trolox a été utilisé comme référence standard (contrôle positif).

## **2. Test d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup>**

### **2.1. Principe**

Le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ou test de décoloration de l'ABTS<sup>•+</sup> a été effectué selon la méthode décrite par Sayah et al. (2017). Effectivement, si un antioxydant est présent, ce radical (ABTS<sup>•+</sup>) de couleur bleue-verte est réduit en un produit incolore (ABTS<sup>+</sup>) par transfert d'hydrogène.

### **2.2. Mode opératoire**

Brièvement, le radical cationique (ABTS<sup>•+</sup>) a été produit par réaction entre 10 mL de la solution ABTS (2 mM) fraîchement préparée dans de l'eau distillée et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de persulfate de potassium (70 mM) et ce en arrachant un électron  $e^-$  d'un atome d'azote de l'ABTS. Le mélange réactionnel a été conservé dans l'obscurité et à température ambiante pendant 16 heures. Ensuite, la solution ABTS<sup>•+</sup> a été diluée avec du méthanol (80%) jusqu'à ce qu'une absorbance de 0,70 soit obtenue à la longueur d'onde 734 nm. Puis, 200  $\mu\text{L}$  de chaque extrait, à différentes concentrations, ont été mélangés avec 2 mL de la solution ABTS<sup>•+</sup> préalablement préparée et laissés à réagir pendant 1 minute.

Enfin, les absorbances ont été mesurées à 734 nm. La décoloration du radical ABTS<sup>•+</sup> est proportionnelle à la concentration en antioxydants. L'expérience est réalisée en triplicata et les moyennes des PI et des  $CI_{50}$  ont été déterminées de la même manière

que dans le test DPPH.

### **3. Pouvoir réducteur du fer, FRAP**

#### **3.1. Principe**

Le test de la réduction du fer est utilisé pour évaluer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Ce test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est réalisé selon la méthode décrite par [Sayah et al. \(2017\)](#). Effectivement, si un antioxydant est présent, le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), de couleur jaune, présent dans le complexe ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de couleur bleu-verte. L'intensité de cette couleur est proportionnelle au pouvoir réducteur des antioxydants du milieu.

#### **3.2. Mode opératoire**

Un volume de 1 mL de chaque extrait (1 mg/mL) a été mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M; pH = 6,6) et 2,5 mL d'une solution de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Après une incubation de 20 minutes à 50°C, 2,5 mL de l'acide trichloracétique (10%) ont été additionnés au mélange pour arrêter la réaction. L'ensemble est centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tours/min, puis un volume de 2,5 mL du surnageant est ajouté à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 0,1%. A la fin, les absorbances ont été mesurées à la longueur d'onde 700 nm. Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est tracée en parallèle, en utilisant l'acide ascorbique. A partir de l'équation de régression de cette courbe, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait en poids sec (mg d'EAA/g d'extrait sec).

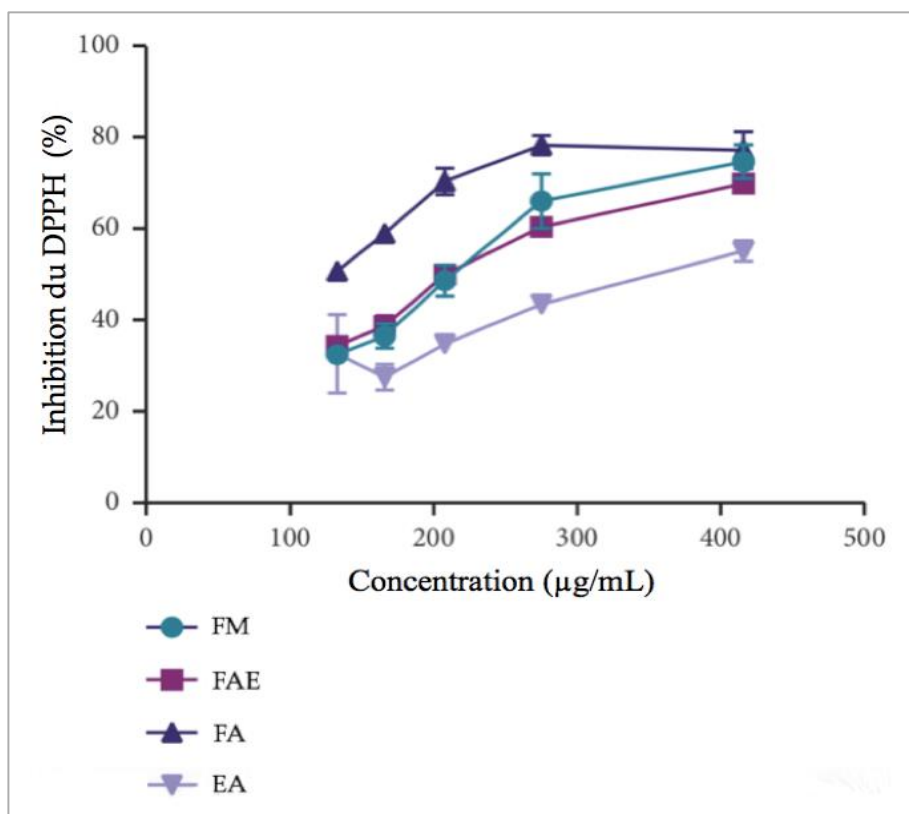
### III. Résultats et discussion

Récemment, de nombreuses études scientifiques ont montré que les radicaux libres jouent un rôle majeur dans le développement de différents types de cancer, de maladies cardiovasculaires, de cataractes, de troubles du système immunitaire et de vieillissement (Asimi et al., 2013). Ces radicaux libres instables peuvent être éliminés par des antioxydants qui inhibent le taux d'oxydation et protègent les cellules contre les dommages (Asimi et al., 2013). Les médicaments antioxydants sont utilisés pour la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, les accidents vasculaires cérébraux et le cancer (Devasagayam et al., 2004; Khalipha et al., 2012). Cependant, leurs effets secondaires et leurs coûts élevés obligent de nombreuses personnes à se traiter avec des médicaments à base de plantes ayant moins d'effets secondaires (Kala, 2005). Effectivement, les plantes produisent divers composés antioxydants tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins qui ont une capacité importante à prévenir le stress oxydatif causé par les ERO. Ces composés ont peu ou pas d'effets indésirables pour une utilisation en médecine préventive par rapport aux agents antioxydants synthétiques.

Compte tenu de la complexité du processus d'oxydation, il est nécessaire de combiner les réponses à des tests complémentaires et différents pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons. Selon Frankel and Meyer (2000), toutes les méthodes ont certaines limites et ne peuvent pas refléter pleinement l'activité antioxydante du produit analysé. Dans ce contexte, de nombreuses méthodes d'analyse de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* ont été développées, mais il n'existe que quelques méthodes rapides et fiables pour un grand nombre d'échantillons d'extraits végétaux (Miller et al., 1993; Brand-Williams et al., 1995; Aruoma and Cuppett, 1997). Dans ce chapitre, pour étudier l'activité antioxydante de nos extraits végétaux, nous avons évalué la capacité à piéger le radical stable DPPH et le cation ABTS et leur pouvoir antioxydant réducteur du fer, FRAP.

Le DPPH est l'un des radicaux libres stables, disponibles dans le commerce et

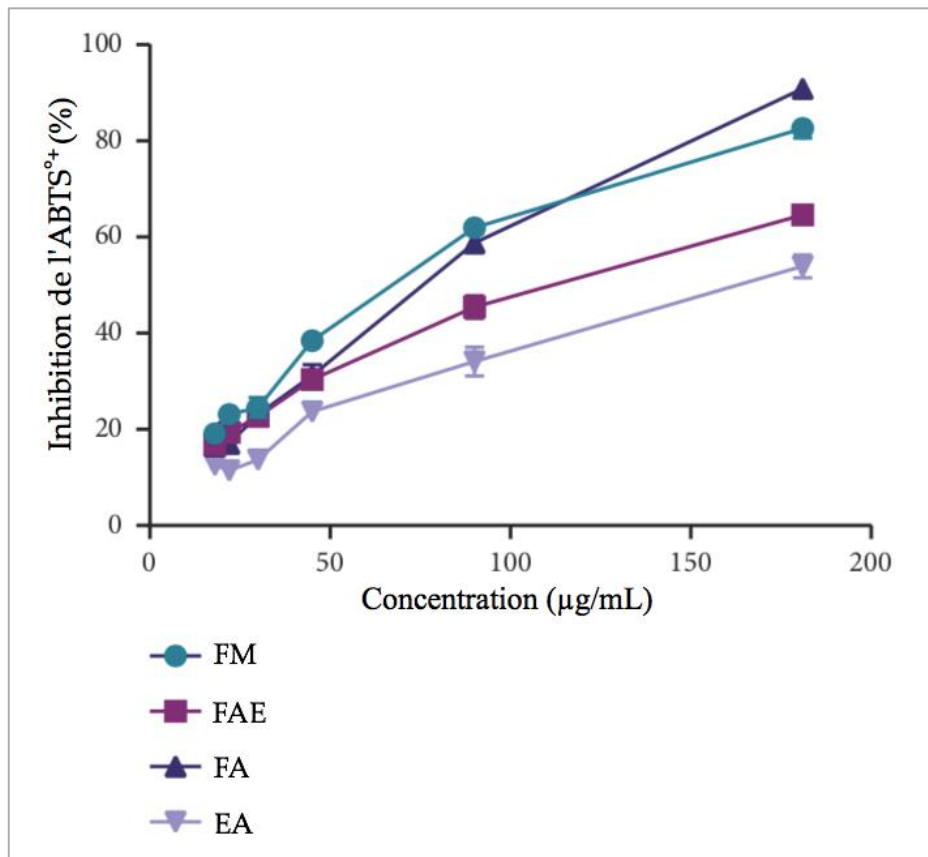
largement utilisé dans l'évaluation de l'activité de piégeage des standards antioxydants et des extraits de plantes avec une absorbance caractéristique à 517 nm (Helfand and Rogina, 2003), qui diminue en présence de piègeurs de radicaux libres. En acceptant l'hydrogène d'un donneur correspondant, la solution de DPPH perd sa couleur violette caractéristique et vire au jaune (diphénylpicryl hydrazine) (Huang et al., 2005; Conforti et al., 2008; Tirzitis and Bartosz, 2010; Kekuda et al., 2013). Cette activité a été largement utilisée comme paramètre rapide et fiable pour évaluer l'activité antioxydante générale *in vitro* des extraits végétaux (Soare et al., 1997; BONINA et al., 2000). Récemment, de nombreuses études ont rapporté les propriétés antioxydantes des produits à base de plantes en utilisant le test DPPH (Amezouar et al., 2013; Ghedadba et al., 2014; Sarr et al., 2015). A partir de ces tests, plusieurs molécules de plantes médicinales ont été développées comme agents antioxydants. La figure 34 illustre l'activité de piégeage des radicaux DPPH des différents extraits d'*A. longa* à diverses concentrations. Tous les extraits testés ont montré un effet de piégeage, qui augmente avec la concentration des échantillons. À une concentration de 416 µg/mL, les fractions aqueuses et méthanoliques ont présenté une activité accrue de 77,17% et 74,66%, respectivement. Alors que l'extrait aqueux présentait moins d'activité à toutes les concentrations. Ces résultats ont montré que les racines d'*A. longa* contenaient une grande quantité de composés piégeant les radicaux avec une capacité de don de protons. Un résultat similaire a été observé avec les racines d'*A. clematitis* dans une étude précédente de Benmehdi et al. (2017), qui a montré un piégeage des radicaux DPPH dose-dépendant.



**Figure 34:** Activité de piégeage des radicaux DPPH. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart-type

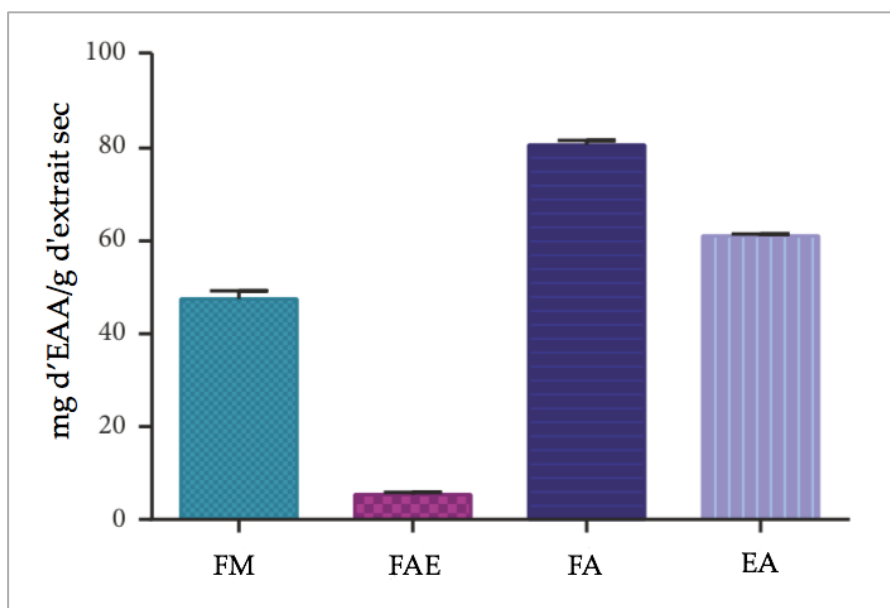
Le radical cationique ABTS est stable sous sa forme libre. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à 734 nm. Alors que l'ajout d'un antioxydant à une solution de ce radical conduit à sa réduction et à une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante du composé testé, mais aussi de sa concentration et du temps de réactions (Cano et al., 2000). La capacité des extraits à piéger le cation ABTS a été exprimée sur la figure 35. La fraction aqueuse a présenté une puissante activité de piégeage des radicaux ABTS de manière dépendante de la concentration. À une concentration de 181  $\mu\text{g/mL}$ , les fractions aqueuses et méthanoliques d'*A. longa* avaient une activité de piégeage de 90,89% et 82,58% vis-à-vis de l'ABTS, respectivement. Aux concentrations étudiées, cet effet peut confirmer la capacité de notre plante à minimiser les dommages oxydatifs de certains tissus vitaux du corps (Atawodi, 2005). Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Jegadeeswari et al. (2014) utilisant le même test ABTS avec une autre espèce d'*Aristolochia*.





**Figure 35:** Activité de piégeage des radicaux ABTS. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart-type

Avec la méthode FRAP, les antioxydants présents dans nos échantillons ont réduit le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanure à la forme ferreuse de couleur bleue (Gülçın et al., 2003), qui peut servir comme mesure de la capacité antioxydante exprimée en pouvoir réducteur (Samaradivakara et al., 2016). Les résultats de ce test sont présentés dans la figure 36. Une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur important. À une concentration de 2000  $\mu\text{g/mL}$  et parmi les solvants testés, la fraction aqueuse a présenté une activité réductrice supérieure de 80,73%. Les résultats obtenus sont cohérents avec les études menées sur *A. longa* (parties aériennes) (Merouani et al., 2017) et *A. indica* [(parties aériennes) (Subramaniyan et al., 2015) et (racines) (Nile et al., 2017)], qui indiquent qu'ils ont un pouvoir réducteur aussi élevé.



**Figure 36:** Pouvoir antioxydant réducteur du fer. Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart-type

Pour comparer les résultats, les  $CI_{50}$  sont calculées comme indiqué dans le [tableau 6](#). Une faible valeur de  $CI_{50}$  indique une activité antioxydante importante. En effet, la fraction aqueuse a montré la valeur d'inhibition des radicaux DPPH la plus élevée ( $CI_{50} = 125,40 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$ ), tandis que la fraction méthanolique était la plus active contre le cation ABTS ( $CI_{50} = 61,58 \pm 2,15 \mu\text{g/mL}$ ). Les valeurs du Trolox pour les deux tests étaient de  $1,79 \pm 0,35$  et  $0,70 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Nos résultats sont analogues à ceux de [Subramaniyan et al. \(2015\)](#) en testant, par la méthode DPPH, l'extrait aqueux d'*A. indica* qui a montré une valeur  $CI_{50}$  de  $182,31 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ , tandis que le standard a montré une valeur de  $30,12 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ . Dans une autre étude utilisant également le test DPPH, les racines d'*A. longa* avaient l'activité la plus faible par rapport au Trolox, parmi toutes les plantes testées ([Djeridane et al., 2006a](#)). En effet, notre étude a montré des résultats similaires avec ce travail. Concernant la méthode ABTS, nous partageons les mêmes résultats d'une étude de cinq extraits d'*A. bracteolate* qui a trouvé que l'extrait méthanolique avait la puissante activité antioxydante ([Badami et al., 2005](#)).

**Tableau 6:** Valeurs  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits et du Trolox pour l'activité d'inhibition du DPPH et de l'ABTS

Produits	DPPH ( $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS ( $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )
FM	199,35 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>	61,58 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>
FAE	220,80 $\pm$ 2,40 <sup>b</sup>	103,62 $\pm$ 8,62 <sup>b,c</sup>
FA	125,40 $\pm$ 2,40 <sup>b</sup>	65,23 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>
EA	354,60 $\pm$ 5,20 <sup>c</sup>	144,40 $\pm$ 2,07 <sup>c</sup>
Trolox	1,79 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,70 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>

Les valeurs sont la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart-type. Les valeurs de la même colonne ne partageant pas une lettre commune (a à c) diffèrent significativement à  $p < 0,05$ .

À partir de ces résultats, il a été constaté qu'il existe une variabilité dans les activités enregistrées avec les différents extraits; ceci est certainement lié à la différence de la composition chimique de ces extraits, en particulier à la présence de polyphénols et de flavonoïdes qui ont été détectés par analyse phytochimique dans le premier chapitre. Ces constituants ont différents degrés d'activité antioxydante contre différents radicaux libres (Sun et al., 2002). L'efficacité des antioxydants peut être attribuée à la quantité élevée des constituants principaux et également à la présence d'autres constituants en petites quantités ou à la synergie entre eux. En effet, des études antérieures ont signalé la présence de composés chimiques tels que aristolactam la (ALIIa), limonen-6-ol et maaliol (Hinou et al., 1990; Dhouioui et al., 2016; Talbaoui et al., 2016). Les composés phénoliques sont des antioxydants aux propriétés redox; le groupe hydroxyle les aide à agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et extincteurs d'oxygène singulet (Chua et al., 2008; Mudoï et al., 2012). Les extraits de plantes qui contiennent des quantités élevées de ces composés ne se traduisent pas toujours par une capacité antioxydante élevée; cela peut être dû à la présence de divers composés actifs, aux effets synergiques de ces composés, ainsi qu'à la position et à l'étendue de l'hydroxylation et de la conjugaison

(Pietta, 2000). De plus, notre activité était significativement faible par rapport au Trolox ( $p < 0,05$ ); ce résultat peut être interprété par le fait que les extraits contiennent plusieurs composés, alors que les concentrations de ceux qui pourraient exercer cette activité seront vraiment faibles. Il a également été noté que les effets antioxydants changent en fonction du test utilisé. En effet, l'activité antioxydante dépend des interactions dans les milieux réactionnels entre le ou les substrats (radicaux) et la ou les molécules actives qui les piègent. D'autres travaux ont également montré que les racines d'*A. longa* possèdent une activité antioxydante (Djeridane et al., 2006a). Il y a une autre étude qui s'est intéressée à la partie aérienne de cette plante (Merouani et al., 2017), et nous avons trouvé presque les mêmes résultats pour la méthode DPPH; les valeurs  $CI_{50}$  des extraits aqueux et méthanoliques des fruits se sont avérées être de  $145,15 \pm 0,78$  et  $186,21 \pm 6,24$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. La différence entre les résultats est due, comme déjà mentionné, à la différence des phytoconstituants, à la méthode utilisée, à la période de récolte et également à la partie étudiée (racines, feuilles, tige...).

#### **IV. Conclusion**

À partir des résultats obtenus expérimentalement dans ce chapitre, nous pouvons prédire que l'action antioxydante des extraits d'*A. longa* est dose-dépendante. En effet, cette activité augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. De façon intéressante, la fraction aqueuse des racines d'*A. longa* avait les meilleurs effets antioxydants contre les radicaux DPPH et ABTS et le fort pouvoir réducteur du fer ferrique. Ces résultats indiquent que le choix du solvant est très important et influence directement la nature des produits dans un extrait naturel. Cela suggère que les extraits de cette espèce végétale sont riches en composés actifs capables de piéger les radicaux libres. Ainsi, ils correspondent à un bon indicateur de composés antioxydants naturels utilisables dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire ou la pharmacologie. Il serait donc intéressant d'isoler les principaux composés de nos extraits bruts afin d'évaluer leurs activités antioxydantes.

## Chapitre 4: Etude de l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits d'*Aristolochia longa*

### I. Introduction

Le diabète sucré est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie résultant de déficiences de la sécrétion d'insuline (type 1) et/ou de son action (type 2) (Huang and Shen, 2012). Cette hyperglycémie chronique peut entraîner de graves problèmes cardiaques, rénaux, cérébraux, vasculaires et visuels (rétinopathie) (Zimmet et al., 2001; Nguyen et al., 2012). L'une des approches thérapeutiques pour améliorer le diabète consiste à abaisser la glycémie postprandiale en inhibant les enzymes hydrolysant les glucides (Nair et al., 2013; Chu et al., 2014). En effet, la principale source de glucose dans le sang est due à l'hydrolyse de l'amidon alimentaire, qui est générée par l'action de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase impliquées respectivement dans la dégradation de l'amidon et l'absorption intestinale (Lordan et al., 2013). L'inhibition de ces enzymes clés peut atténuer considérablement l'augmentation postprandiale de la glycémie et entraîner une prise en charge efficace de l'hyperglycémie liée au diabète de type 2 (Kwon et al., 2008). De plus, la  $\beta$ -galactosidase est également un membre de ces enzymes. Elle active la dernière étape du processus de digestion des glucides, ce qui entraîne la décomposition des disaccharides et des oligosaccharides en glucose absorbable. Par conséquent, son inhibition peut améliorer l'hyperglycémie postprandiale en limitant le flux de glucose du tractus intestinal vers les vaisseaux sanguins.

En revanche, des composés de synthèses, tels que l'acarbose, le miglitol et le voglibose, ont été largement prescrits comme traitement pour les personnes diabétiques, agissant en inhibant l'activité de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase, et entraînant par la suite une diminution de la glycémie (Lordan et al., 2013; Chu et al., 2014). Ces médicaments oraux peuvent provoquer des effets indésirables tels que la

toxicité hépatique, la diarrhée et les flatulences (Christhudas et al., 2013; Lordan et al., 2013; Nair et al., 2013).

Ainsi, le développement d'inhibiteurs naturels d'origine végétale peut être une alternative aux inhibiteurs synthétiques. Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet des extraits d'*A. longa* sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et de la  $\beta$ -galactosidase.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Test d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase des différents extraits a été évaluée selon la méthode décrite par Marmouzi et al. (2017) et Berrani et al. (2018). Brièvement, 150  $\mu$ L de chaque échantillon ont été mélangés avec un volume de 100  $\mu$ L de la solution d'enzyme  $\alpha$ -glucosidase (0,1 U/mL) préparée dans un tampon de phosphate (0,1 M; pH = 6,7) et le mélange a été incubé à 37°C, pendant 10 minutes. Ensuite, 200  $\mu$ L du substrat *p*-Nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside qui est hydrolysée par la  $\alpha$ -glucosidase pour libérer du *p*-Nitrophényle (un agent coloré qui peut être surveillé à 405 nm) (1 mM) ont été additionnés. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Afin d'arrêter la réaction, 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M) a été ajouté puis les absorbances ont été mesurées à 405 nm.

L'activité inhibitrice de l'enzyme a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{(\text{Ac} - \text{Abc}) - (\text{Ae} - \text{Abe})}{(\text{Ac} - \text{Abc})} \times 100,$$

Où Ac: l'absorbance du contrôle (enzyme et tampon);

Abc: l'absorbance du blanc de contrôle (tampon sans enzyme);

Ae: l'absorbance de l'échantillon (enzyme et inhibiteur);

Abe: l'absorbance de l'échantillon blanc (inhibiteur sans enzyme).

Par la suite, les valeurs des CI<sub>50</sub> ont été déterminées par le logiciel «GraphPad Prism v6». L'acarbose a été utilisé comme référence standard.

## 2. Test d'inhibition de la $\beta$ -galactosidase

L'activité inhibitrice de la  $\beta$ -galactosidase des différents extraits a été évaluée selon la méthode de [Bouabid et al. \(2018\)](#). Brièvement, 150  $\mu$ L de chaque échantillon à différentes concentrations (0,5–5 mg/mL) ont été mélangés avec un volume de 100  $\mu$ L de la solution d'enzyme  $\beta$ -galactosidase (0,1 U/mL) préparée dans un tampon de phosphate de sodium (0,1 M; pH = 7,6) et le mélange a été incubé à 37°C, pendant 10 minutes. Ensuite, 200  $\mu$ L du substrat 2-Nitrophényl  $\beta$ -D-galactopyranoside, qui est hydrolysé par la  $\beta$ -galactosidase pour libérer du 2-Nitrophényl (un agent coloré qui peut être surveillé à 405 nm) (1 mM) ont été additionnés. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Afin d'arrêter la réaction, 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,1 M) a été ajouté puis les absorbances ont été mesurées à 405 nm par spectrophotomètre.

L'activité inhibitrice de l'enzyme a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée selon la même formule que celle du test  $\alpha$ -glucosidase, ainsi les valeurs des  $\text{CI}_{50}$  ont été déterminées. La quercétine a été utilisée comme référence standard.

## III. Résultats et discussion

Le diabète est caractérisé par une glycémie élevée, qui peut entraîner de graves complications, de sorte que l'objectif du traitement des patients diabétiques est de maintenir une glycémie proche de la normale. En médecine moderne, il n'existe aucun médicament pour traiter le diabète sans effets secondaires associés à l'utilisation d'insuline et d'agents hypoglycémisants oraux ([Marles, 1994](#)). Les plantes médicinales aux propriétés antidiabétiques peuvent être une source utile pour trouver des médicaments antidiabétiques plus inoffensifs et rentables. Dans la présente recherche, différents extraits d'*A. longa* ont été évalués pour leur activité antidiabétique. Deux tests *in vitro* différents ont été utilisés pour évaluer cette activité; la méthode de l' $\alpha$ -glucosidase et de la  $\beta$ -galactosidase.

Comme déjà indiqué dans la partie bibliographique, l' $\alpha$ -glucosidase catalyse la dernière étape de la digestion des glucides et se situe dans les cellules épithéliales intestinales (les cellules à bordure en brosse) ([Caspary, 1978](#)). Les inhibiteurs de cette



enzyme peuvent retarder l'absorption des glucides alimentaires dans l'intestin grêle et réduire l'hyperglycémie postprandiale, ce qui peut être un mécanisme utile dans la préparation de médicaments antidiabétiques (Toeller, 1994). Ceci est largement utilisé comme stratégie pharmacologique efficace pour gérer l'hyperglycémie associée aux stades précoces du diabète de type 2 (Hanhineva et al., 2010). D'autre part, la  $\beta$ -galactosidase catalyse l'hydrolyse des  $\beta$ -galactosides soustraits aux glucides simples dans l'intestin. Par la suite, l'inhibition de cette enzyme peut conduire à la réduction des hydrocarbures intestinaux et éventuellement diminuer le taux de glucose.

Les extraits d'*A. longa* ont montré des effets inhibiteurs sur les deux enzymes testées comme présenté dans le [tableau 7](#). Les résultats ont révélé que ces extraits inhibent l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase et de la  $\beta$ -galactosidase d'une manière dépendante de la concentration (0,5 à 5 mg/mL). En effet, à la concentration de 1,5 mg/mL, la fraction d'acétate d'éthyle a présenté l'activité inhibitrice la plus élevée contre l' $\alpha$ -glucosidase ( $76,56 \pm 2,54\%$ ) et la  $\beta$ -galactosidase ( $12,70 \pm 1,27\%$ ). La fraction méthanolique a montré une inhibition modérée de l' $\alpha$ -glucosidase ( $21,94 \pm 1,34\%$ ) et de la  $\beta$ -galactosidase ( $2,05 \pm 1,22\%$ ). Cependant, l'extrait aqueux n'inhibait que l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase ( $2,20\%$ ). Ces résultats sont cohérents avec ceux de [Janani and Revathi \(2018\)](#) qui ont travaillé sur une autre espèce d'*Aristolochiaceae* (*A. indica*). Leur étude a révélé que l'extrait méthanolique de la plante entière présentait une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase, qui augmentait avec l'augmentation de la concentration.

Pour mesurer le pouvoir inhibiteur de chaque extrait, nous avons utilisé la  $CI_{50}$  qui représente la concentration d'un inhibiteur nécessaire pour une inhibition de 50% de l'enzyme cible. Les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol ont montré une forte capacité inhibitrice contre l' $\alpha$ -glucosidase avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $1,112 \pm 0,026$  et  $2,378 \pm 0,037$  mg/mL, respectivement. Ces valeurs d'inhibition sont supérieures à celles obtenues par l'acarbose ( $0,199 \pm 0,014$  mg/mL), utilisé comme antidiabétique standard. Des effets similaires ont été observés avec *A. indica* ([Nile et al., 2018](#)). De

même, les valeurs d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'extrait aqueux et la fraction aqueuse étaient supérieures à 5 mg/mL. Pour le pouvoir inhibiteur de la  $\beta$ -galactosidase, tous les extraits ont montré une valeur  $CI_{50}$  supérieure à 5 mg/mL. Le fait que l' $\alpha$ -glucosidase et la  $\beta$ -galactosidase aient montré cette différence est dû à des différences structurelles liées à l'origine des enzymes (Chiba, 1997).

**Tableau 7:** Résultats des tests d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et de la  $\beta$ -galactosidase

Extrait / Standard	Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase		Inhibition de la $\beta$ -galactosidase	
	% d'inhibition à 1,5 mg/mL	$CI_{50}$ (mg/mL)	% d'inhibition à 1,5 mg/mL	$CI_{50}$ (mg/mL)
FAE	76,56 $\pm$ 2,54 <sup>b</sup>	1,112 $\pm$ 0,026 <sup>b</sup>	12,70 $\pm$ 1,27 <sup>b</sup>	> 5
FM	21,94 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	2,378 $\pm$ 0,037 <sup>b</sup>	2,05 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	> 5
FA	Na	> 5	Na	> 5
EA	Na	> 5	2,20 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	> 5
Acarbose	96,78 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,199 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>	----	----
Quercétine	----	----	92,62 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	0,247 $\pm$ 0,006

Na: non actif; moyenne  $\pm$  écart-type (n = 3).

Les valeurs de la même colonne ne partageant pas une lettre commune (a à c) diffèrent significativement à  $p < 0,05$ .

Ces résultats ont révélé les capacités potentielles des racines d'*A. longa* à diminuer l'augmentation postprandiale de la glycémie chez les patients diabétiques et à prévenir le diabète de type 2. Il a été suggéré que le mécanisme antihyperglycémique de cette plante pourrait être dû à son pouvoir antioxydant (Chapitre 3). Nos constats sont conformes à des rapports antérieurs qui ont montré que, chez des modèles animaux, deux plantes de la même espèce, *A. indica* (parties aériennes) (Karan et al., 2012) et *A. ringens* (racines) (Sulyman et al., 2016), présentaient une réduction de la glycémie élevée. De plus, nos résultats sont en ligne avec une étude réalisée sur 71 plantes herbacées pour tester leurs effets antidiabétiques qui a montré, par conséquent, que 36 espèces médicinales avaient une inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase,

comprenant une espèce d'*Aristolochiaceae* (*Asarum heterotropoides*) (Shin et al., 2012). Les différences observées pour l'activité inhibitrice vis-à-vis des deux enzymes pourraient s'expliquer par les changements du pourcentage d'inhibition par rapport à la composition phytochimique de l'espèce végétale et également par la sensibilité des enzymes. En effet, comme le prouve le premier chapitre, *A. longa* est capable de produire une grande quantité d'alcaloïdes (Dhouioui et al., 2016) et de composés phénoliques, dont des flavonoïdes, des saponines et des tanins (Benarba and Meddah, 2014). Les composés phénoliques peuvent inhiber les activités des enzymes hydrolysant les glucides en raison de leur capacité à se lier aux protéines (Shobana et al., 2009). De plus, la présence de flavonoïdes, notamment dans la fraction d'acétate d'éthyle, peut expliquer l'activité inhibitrice observée. En effet, ces métabolites secondaires sont connus pour avoir un potentiel d'inhibition élevé contre l' $\alpha$ -glucosidase, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Adefegha and Oboh, 2012), et peuvent prévenir le dysfonctionnement des cellules bêta pancréatiques dû au stress oxydatif et peuvent ainsi réduire le risque de développer un diabète de type 2 (Song et al., 2005). Par ailleurs, certains chercheurs ont indiqué qu'il existe une relation positive entre la teneur en polyphénols et la capacité d'inhiber l' $\alpha$ -glucosidase (Ramkumar et al., 2010). L'effet inhibiteur observé avec la fraction méthanolique d'*A. longa* peut être attribué à la présence d'autres phytoconstituants comme les alcaloïdes, les tanins et les saponines (Ramkumar et al., 2010; Shabrova et al., 2011). Ces derniers étaient responsables de la suppression de l'absorption du glucose et des liquides dans les microvillosités de l'épithélium intestinal (Mahomoodally et al., 2012). Ces composés, qui peuvent également inhiber l' $\alpha$ -glucosidase, ont moins d'effets secondaires et sont moins chers que les médicaments synthétiques comme l'acarbose (Mohamed et al., 2012), et ils exercent plusieurs autres activités biologiques (antibactériennes, antioxydantes et anticancéreuses) (He et al., 2007). Généralement, la phytothérapie repose sur l'action thérapeutique d'un mélange de différents composés agissant souvent en synergie pour exercer tous leurs effets bénéfiques. Ceci suggère que les composés biologiquement actifs présents dans les extraits étudiés peuvent agir en

synergie pour exercer leurs activités inhibitrices des enzymes hydrolysant les glucides et leurs effets antioxydants. Les variations observées dans la composition chimique d'*Aristolochia* sp., réparties dans le monde entier, ne sont pas seulement dues aux types d'espèces mais aussi aux différentes conditions agro-climatiques, à la méthode d'extraction, à la période de récolte et aux techniques de caractérisation (Usman et al., 2010; Akolade et al., 2014), ainsi qu'à la partie sélectionnée de la plante et à la polarité des solvants d'extraction. Concernant les extraits végétaux, d'autres études ont montré que certains d'entre eux peuvent augmenter la sécrétion et la signalisation de l'insuline dans les muscles squelettiques (Ahmed et al., 2014).

Dans le présent chapitre, nous avons étudié le potentiel antidiabétique d'*A. longa*, utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies. Cette plante n'a pas été étudiée auparavant pour son activité antidiabétique *in vitro*. Les résultats de ce travail devraient être pertinents pour le corps humain.

#### **IV. Conclusion**

L'activité antidiabétique étudiée dans ce chapitre s'est focalisée sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et de la  $\beta$ -galactosidase. Notre étude est en effet la première à rapporter un potentiel antidiabétique d'*A. longa* via l'inhibition de ces deux enzymes digestives, suggérant que les racines de cette plante pourraient être une alternative dans la prise en charge du diabète sucré et la gestion du stress oxydatif qui l'accompagne. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action d'*A. longa* et de déterminer la ou les molécules bioactives responsables de cet effet, d'autres études doivent être menées pour isoler et identifier ces principes actifs.

## Chapitre 5: Etude de l'activité antibactérienne des extraits

### *d'Aristolochia longa*

#### I. Introduction

De nombreuses maladies contractées par l'homme sont liées à des infections bactériennes. Pour y remédier, on utilise les antibiotiques prescrits par la médecine conventionnelle. Actuellement, le contrôle des infections bactériennes devient complexe en raison de l'utilisation anarchique, inadéquate et abusive des antibiotiques en santé humaine et animale. L'émergence de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques conventionnels est un problème majeur de santé publique (Lozniewski and Rabaud, 2010). La question de la résistance aux antibiotiques interpelle la communauté scientifique car il est important de trouver de nouveaux agents antimicrobiens naturels. Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles pour traiter les maladies humaines. Les extraits de plantes étaient déjà connus et utilisés par différentes civilisations en médecine traditionnelle. Il convient également de mentionner que les produits végétaux sont une source importante de nouveaux médicaments. En effet, on estime qu'entre 1981 et 2002, 65% à 75% des antibiotiques répertoriés par la « Food and Drug Administration (FDA) » étaient d'origine naturelle (Newman et al., 2003). Toutefois, moins de 10% des espèces végétales ont été étudiées pour leur activité biologique (Harvey, 2000) et les plantes médicinales marocaines ne font pas exception. Les extraits de plantes sont caractérisés par un très large spectre d'inhibition, incluant les bactéries Gram positives et Gram négatives, les champignons et les virus. De plus, l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales dépend principalement de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés majeurs. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable. Plusieurs molécules, comme le carvacrol, exercent une activité bactéricide en provoquant des altérations de la membrane bactérienne et la perte de métabolites

intracellulaires (Ultee et al., 1999). L'objectif de ce chapitre est de sélectionner parmi les extraits de racines d'*A. longa*, ceux qui sont actifs contre les souches bactériennes étudiées.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Souches bactériennes

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des extraits d'*A. longa* a été testée sur six espèces bactériennes. En effet, trois souches de référence de la collection internationale ATCC (American type culture collection), à savoir *Escherichia coli* ATCC 29522, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été fournies par l'institut national d'hygiène du Maroc. Tandis que trois souches cliniques purifiées et identifiées; *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* ont été collectées du laboratoire de bactériologie du centre hospitalier universitaire de Rabat, Maroc.

### 2. Détermination des diamètres d'inhibition

#### 2.1. Test de diffusion sur disque

Pour cette méthode, les diamètres d'inhibition ont été déterminés à l'aide de disques placés sur milieu gélosé comme indiqué sur la [figure 37](#) (Talbaoui et al., 2012). En bref, la gélose Mueller-Hinton (M.H) stérile, un milieu de croissance microbiologique, a été versée dans des boîtes de Pétri à raison de 15 mL par boîte et laissée refroidir. Les souches bactériennes ont été sous-cultivées par la méthode des stries sur gélose, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. A partir de jeunes cultures, des colonies pures ont été isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie a été mise en suspension dans 2,5 mL de solution saline (NaCl). La turbidité de cette suspension a été mesurée par un densitomètre et ajustée à 0,5 McFarland. Ensuite, des disques de papier stériles (6 mm de diamètre) ont été imprégnés avec 20 µL d'extraits de différentes concentrations (de 200 à 6,25 mg/mL) préparés par double dilution. Les disques "témoins négatifs" ont été imprégnés de la solution de solubilisation de chaque extrait (le méthanol pour la fraction

méthanolique, le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour la fraction d'acétate d'éthyle et l'eau distillée stérile pour les deux extraits aqueux). Tous les disques, une fois séchés, ont été déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur le milieu gélosé ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Les boîtes ont ensuite été fermées et laissées à diffuser à température ambiante pendant 30 minutes, puis placées dans une étuve à une température de 37°C pendant 24 heures. Des disques imprégnés de gentamicine (10 µg) ont été utilisés comme témoins positifs pour les espèces bactériennes à Gram négatif et des disques standards de vancomycine (30 µg) pour les espèces bactériennes à Gram positif. Les tests ont été réalisés en duplicata pour chaque extrait.

## **2.2. Test de diffusion en puits**

La sensibilité des souches aux différents extraits a été confirmée par la méthode de diffusion par puits d'agar ([Figure 37](#)). Après ensemencement de l'inoculum préalablement réalisé à la surface du milieu (M.H), des puits d'environ 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose. Le fond de ces puits est scellé avec une goutte de gélose (M.H) pour limiter la diffusion des extraits sous la gélose. Ensuite, 50 µL de l'extrait dilué (ou de l'antibiotique) ont été versés dans chaque puits. Après incubation à 37°C pendant 18 à 20 heures, des zones d'inhibition de la croissance bactérienne ont été obtenues et mesurées ([Dorman and Deans, 2000](#)).

## **2.3. Expression des résultats**

Pour les deux techniques choisies, la sensibilité des bactéries testées peut être évaluée en fonction des diamètres d'inhibition obtenus (en mm) à l'aide d'un pied à coulisse. En effet, la sensibilité d'un microorganisme est nulle pour un diamètre inférieur à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Alors pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm, elle est considérée comme très sensible ([Duraffourd et al., 1983](#); [Ponce et al., 2003](#)).

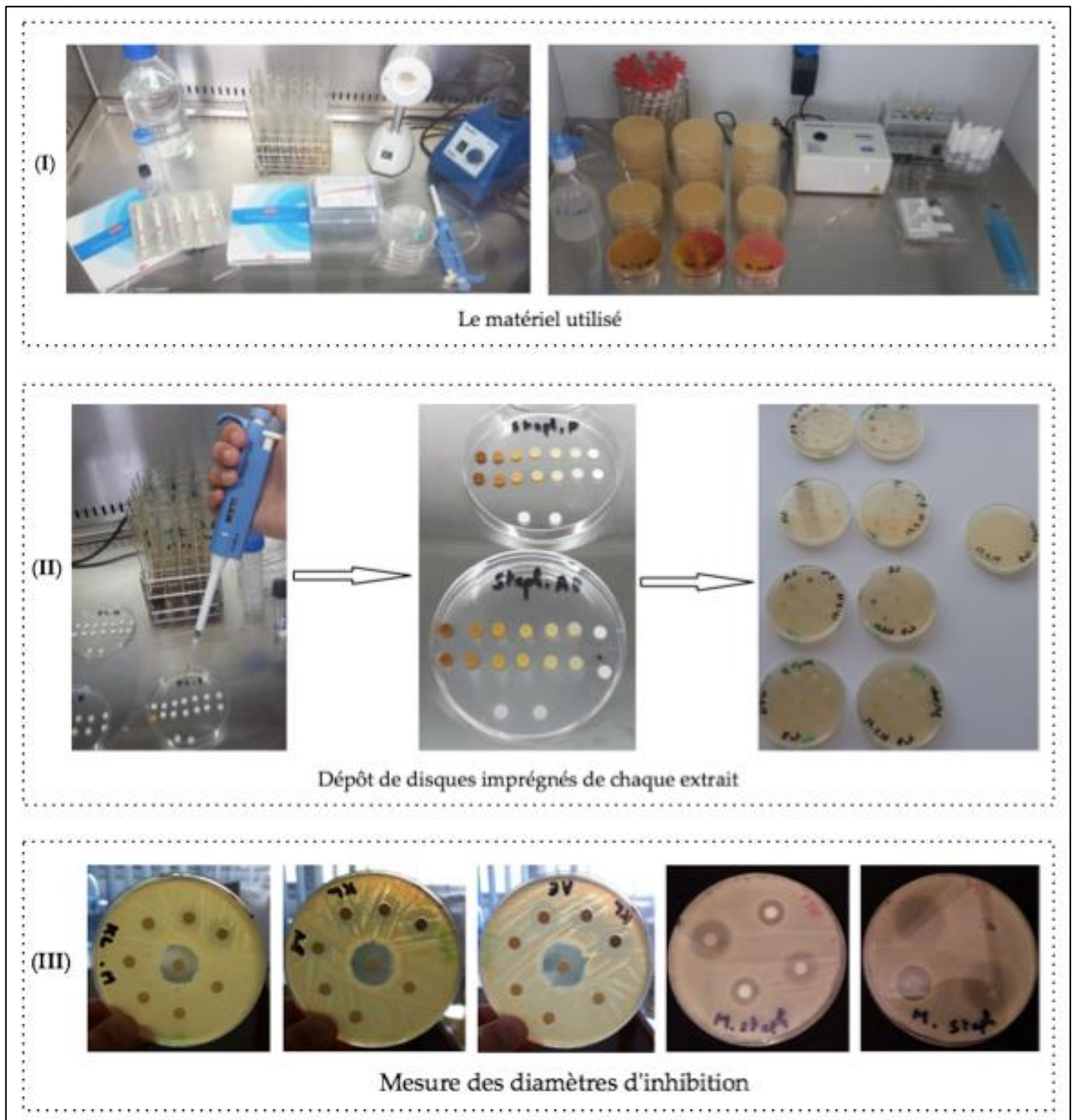


Figure 37: Protocole expérimental d'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu solide

### 3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode de macrodilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI (Wikler, 2006). Pour chaque extrait, une gamme de concentrations, allant de 100 à 0,40 mg/mL a été préparée par la méthode de double dilution avec du bouillon (M.H). On a également préparé pour chaque souche bactérienne un inoculum dont la



turbidité est ajustée à 0,5 McFarland ( $10^6$  ufc/mL). Le dernier tube contenant uniquement du BMH et de l'inoculum a servi comme témoin de croissance. Ensuite, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. La CMI a été définie comme la concentration la plus faible de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance (turbidité) visible à l'œil nu.

#### **4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

Pour déterminer la CMB, 2  $\mu$ L du contenu des tubes, dans lesquels aucun trouble n'a été observé, ont été prélevés et ensemencés sur une nouvelle gélose en commençant par le tube de la CMI. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la CMB sera la concentration la plus faible qui laisse survivre au plus 0,01% des germes de la suspension de départ ([Smith-Palmer et al., 1998](#)).

### **III. Résultats et discussion**

La sensibilité des bactéries aux extraits d'*A. longa* a été déterminée en utilisant la méthode des disques et la méthode des puits. Concernant la première méthode, les diamètres d'inhibition des différents extraits étudiés contre les souches bactériennes sont présentés dans le [tableau 8](#). Il a été noté que ces diamètres diffèrent d'une bactérie à l'autre et d'un extrait à l'autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits s'explique par les variations de leurs compositions chimiques. Comme rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une activité antibactérienne si sa zone d'inhibition est supérieure à 10 mm ([Ponce et al., 2003](#)).

#### **1. Méthode de diffusion sur disque**

Pour la méthode des disques, toutes les bactéries à l'exception de *Proteus vulgaris* étaient sensibles à la fraction d'acétate d'éthyle à différentes concentrations. Les résultats consignés dans le [tableau 8](#) ont montré que la fraction d'acétate d'éthyle, à différentes concentrations testées, avait une bonne activité inhibitrice sur les souches bactériennes avec des diamètres d'inhibition de  $25 \pm 1,4$  mm et  $20 \pm 0$  mm pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, respectivement, à la concentration de 200 mg/mL. Cependant, à la même concentration, une faible sensibilité a été observée

pour les souches de *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* avec des diamètres d'inhibition de 0 mm,  $10,5 \pm 0,7$  mm et  $11,5 \pm 0,7$  mm, respectivement (Tableau 8). Ces résultats corroborent ceux de [Dhouioui et al. \(2016a\)](#) qui ont constaté que les racines d'*A. longa* inhibent la croissance de différentes souches bactériennes et que le même effet est noté avec son HE ([Dhouioui et al., 2016](#)). Ceci est cohérent avec des études précédentes indiquant que les bactéries Gram-négatives sont moins sensibles aux extraits de plantes que les bactéries Gram-positives, et cela peut être dû à la présence d'une membrane externe contenant des lipopolysaccharides hautement restrictifs ([Jang et al., 2010](#)). D'après les résultats trouvés, *E. coli* a montré une sensibilité élevée à toutes les concentrations testées de FAE avec des diamètres allant de  $12,5 \pm 0$  à  $20 \pm 0$  mm. De plus, *S. aureus* était très sensible avec des anneaux d'inhibition de  $23,5 \pm 0$  et  $20,7 \pm 1,0$  mm autour des 100 et 50 mg par disques, respectivement. L'activité antibactérienne de cette fraction peut être attribuée principalement aux constituants majeurs de la plante. L'absence d'activité antibactérienne à de faibles concentrations peut être liée à la présence de plus petites quantités en composés antimicrobiens ([Nisa et al., 2013](#)). Concernant le pouvoir antibactérien de la fraction méthanolique, il n'a été observé qu'avec *S. aureus* et *Klebsiella pneumoniae* dont les diamètres de la zone d'inhibition sont respectivement de  $20,5 \pm 0,7$  mm et  $13 \pm 1,4$  mm. Cela était similaire aux résultats de [Hossen et al. \(2014\)](#) qui ont rapporté que les souches de *S. aureus* et d'*E. coli* étaient résistantes à l'extrait méthanolique d'*Aristolochia indica*. De plus, selon [Merouani et al. \(2017\)](#), l'extrait méthanolique des fruits d'*A. longa* a montré des effets inhibiteurs significatifs contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. En revanche, [Kumar and Rajeswari \(2011\)](#) ont rapporté que l'extrait éthanolique d'*A. indica* avait de faibles activités antibactériennes sur les bactéries étudiées. Nos résultats sont toujours en accord avec ceux trouvés par [Negi et al. \(2003\)](#), qui ont enregistré une bonne activité antibactérienne avec la fraction d'acétate d'éthyle des racines d'*Aristolochia bracteata* suivie de la fraction méthanolique d'une activité intermédiaire alors que l'extrait aqueux était le moins efficace.

**Tableau 8:** Diamètres d'inhibition (mm) des différents extraits d'*Aristolochia longa* dans la méthode des disques

		Souches bactériennes					
		<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i> ATCC
Acétate d'éthyle (mg/mL)	200	11,5 ± 0,7*	10,5 ± 0,7*	20,0 ± 0,0**	17,5 ± 0,7***	0	25,0 ± 1,41*
	100	9,5 ± 0,7*	11,0 ± 0,0*	19,0 ± 0,7	16,0 ± 1,41*	0	23,5 ± 0,0**
	50	8,0 ± 0,0*	7,5 ± 0,7*	18,5 ± 0,35	13,5 ± 0,7*	0	20,75 ± 1,06
	25	7,0 ± 0,0*	7,25 ± 0,35*	17 ± 0,0****	10,5 ± 0,7*	0	13,25 ± 0,3*
	12,5	0	7,25 ± 0,35*	15,5 ± 0,7*	7,5 ± 0,7*	0	0
	6,25	0	0	12,5 ± 0,0*	0	0	0
Méthanol (mg/mL)	200	0	0	0	13,0 ± 1,41*	0	20,5 ± 0,7
	100	0	0	0	9,5 ± 0,7*	0	15,5 ± 0,7***
	50	0	0	0	0	0	11,0 ± 1,41*
	25	0	0	0	0	0	0
	12,5	0	0	0	0	0	0
	6,25	0	0	0	0	0	0
Gentamicine (10 µg)			19,18 ± 0,5	18,75 ± 0,7	21,0 ± 0,7	22,0 ± 0,7	
Vancomycine (30 µg)		22,06 ± 2,23					20,37 ± 0,7

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type, n = 2.

\*  $p < 0.05$  par rapport au groupe témoin.

\*\*  $p < 0.01$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*  $p < 0.001$  par rapport au groupe témoin.

\*\*\*\*  $p < 0.0001$  par rapport au groupe témoin.

## 2. Méthode de diffusion en puits

Cette méthode nous a également permis d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des mêmes extraits sur la croissance des bactéries. Les résultats de ce test ont montré que la fraction d'acétate d'éthyle n'est active que sur les souches de *S. aureus* et *E. coli* dont les surfaces d'inhibition sont respectivement de 30 mm et 18 mm, à la concentration maximale. Alors que pour la fraction méthanolique, *S. aureus* était la

seule bactérie inhibée. Notre étude partage les mêmes résultats avec celle de [Abhishiktha et al. \(2015\)](#) qui ont investigué l'activité antibactérienne des extraits de feuilles et de fleurs d'*A. indica* contre des bactéries gram (+) et gram (-) en utilisant également la méthode de diffusion en puits. Cette activité pourrait s'expliquer par la rupture de la barrière de perméabilité de la membrane bactérienne ([Hayek and Ibrahim, 2012](#)). Par ailleurs, *A. longa* peut contenir de l'acide aristolochique, connu pour ses effets mutagènes et cancérigènes ([Schmeiser et al., 1989](#)). Cette mutagénicité peut expliquer son action antibactérienne. En effet, l'aristolactame et l'acide aristolochique, deux composés isolés d'*A. longa* ([Hinou et al., 1990](#)), ont inhibé *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, ce qui confirme nos résultats. D'autre part, [Lee and Han \(1992\)](#) ont également enregistré que ces composés ont une activité antibactérienne marquante contre les bactéries à Gram positif. Ainsi l'activité observée avec nos extraits pourrait être due à la présence de ces composés bioactifs. Cependant, la comparaison quantitative et qualitative entre les résultats des extraits et des antibiotiques est difficile, car la nature et la composition chimique des deux ne sont pas comparables. Par conséquent, une comparaison globale de l'activité antibactérienne des antibiotiques avec celle des extraits de plantes peut être effectuée. Les moyennes des diamètres d'inhibition des antibiotiques utilisés contre les souches cibles sont présentées dans le [tableau 8](#). On a observé que différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés et que l'activité la plus élevée a été démontrée contre *S. aureus*. Ces résultats sont très intéressants car ce microorganisme est largement impliqué dans les infections cutanées ([Camporese et al., 2003](#)). Aux fortes concentrations, les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol ont montré une activité antibactérienne supérieure à celle de la vancomycine vis-à-vis de la souche *S. aureus*, quelle que soit la technique utilisée (disques/puits). Comme observé dans la méthode précédente, la fraction d'acétate d'éthyle avait une activité majeure sur *E. coli* par rapport à la gentamicine. Il est évident que l'activité antibactérienne des extraits dépend

largement de leur concentration, des souches bactériennes, du solvant utilisé et du type d'extrait végétal.

### 3. Détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB)

La CMI représente la concentration la plus faible capable d'empêcher la croissance d'un microorganisme, tandis que la CMB représente la concentration la plus faible capable de tuer le microorganisme. Dans ce chapitre, la CMI et la CMB ont été déterminées successivement en utilisant la méthode de macrodilution et la culture de bactéries sur milieu non sélectif. L'analyse des données expérimentales montre que par rapport au témoin de croissance, il y avait une diminution de la turbidité causée par la croissance des bactéries dans les tubes expérimentaux lorsque la concentration des extraits augmentait. Nos résultats ont montré que les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol ont une activité antibactérienne en inhibant les croissances bactériennes dans une relation dose-réponse. Cela nous a permis de déterminer deux paramètres antibactériens, à savoir la CMI et la CMB. La détermination de la CMI des extraits d'*A. longa* a été réalisée par la méthode des dilutions en milieu liquide. C'est une technique quantitative qui détermine la gamme de concentrations qui inhibent efficacement la croissance bactérienne. Une très forte activité antibactérienne est présentée par une très faible CMI (Coulidiati et al., 2009). Les résultats obtenus sont présentés dans le [tableau 9](#). L'analyse de ces résultats a montré que les deux fractions présentent une activité antibactérienne acceptable. En effet, la gamme de CMI de nos extraits varie de 12,5 à 100 mg/mL pour trois souches bactériennes parmi les six étudiées (*S. aureus*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*). Les tubes expérimentaux contiennent à la fois les différentes bactéries et l'extrait à tester. Dans ces tubes, les concentrations élevées des extraits ont provoqué une diminution progressive et dose-dépendante de la turbidité induite par la croissance des souches bactériennes. À partir du [tableau 9](#), nous avons révélé que la fraction d'acétate d'éthyle est la plus active, avec des CMI d'environ 12,5 mg/mL pour *P. aeruginosa* ATCC, 50 mg/mL pour *S. aureus* ATCC et 100 mg/mL pour *E. faecalis*. De même, la fraction

méthanolique a montré une CMI de 50 mg/mL pour *S. aureus*. Nos résultats sont en ligne avec ceux trouvés par [Camporese et al. \(2003\)](#) qui ont étudié les feuilles et l'écorce d'une autre espèce d'*Aristolochiaceae* (*Aristolochia trilobata*) et ont constaté que *S. aureus* et *P. aeruginosa* présentent les CMI les plus faibles. Les mêmes résultats ont été observés pour l'extrait méthanolique de fruits d'*A. longa* ([Merouani et al., 2017](#)). En effet, les principes actifs, seuls ou en combinaison, inhibent les processus vitaux des microbes en se liant à leurs molécules protéiques, en agissant comme des agents chélateurs, en modifiant leurs systèmes biochimiques, et en empêchant ainsi l'utilisation des nutriments ([Finch et al., 2010](#)). L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs ([Thangaraj et al., 2000](#)). Evidemment, comme indiqué dans le premier chapitre, *A. longa* se caractérise par une composition chimique ayant des propriétés antibactériennes connues, ce qui explique également les propriétés antibactériennes observées ([Scalbert, 1991](#)). En outre, la polarité des solvants organiques et les conditions d'extraction pourraient donner une sélectivité élevée et des composants antimicrobiens ([Koruthu et al., 2011](#)).

**Tableau 9:** Valeurs des CMI et des CMBs des extraits d'*Aristolochia longa*

Extraits d' <i>A. longa</i>	<i>S. aureus</i> ATCC		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i> ATCC	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
Acétate d'éthyle (mg/mL)	50	≥ 100	100	≥ 100	12,5	≥ 100
Méthanol (mg/mL)	50	≥ 100	ND	ND	ND	ND

ND, non déterminé.

CMB, concentration minimale bactéricide; CMI, concentration minimale inhibitrice.

En revanche, les essais biologiques peuvent révéler la présence de nouveaux composés plus puissants dans cette plante. Il résulte de notre analyse que la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. longa* avait un effet bactériostatique sur les souches de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. faecalis*, et la fraction méthanolique avait le même pouvoir sur la souche de *S. aureus*. Cependant, les extraits aqueux n'ont montré aucune inhibition vis-à-vis des souches étudiées à toutes les concentrations testées; ceci est en accord avec les résultats d'une étude rapportant que l'eau est moins efficace que les solvants organiques pour extraire les composés actifs des plantes (Sukumaran et al., 2011). La différence de résultats entre les deux méthodes (zones d'inhibition et CMI/CMB) est probablement due à la différence du milieu de culture. En effet, pour les zones d'inhibition, nous avons travaillé avec un milieu solide, alors que pour déterminer les CMIs, un milieu de culture liquide a été utilisé. Cela explique également pourquoi la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la véritable efficacité antibactérienne de l'extrait (Cimanga et al., 2002). La sensibilité des différentes souches aux extraits d'*A. longa* est d'une grande importance dans le traitement des pathologies qui leur sont associées car ces souches présentent une résistance élevée aux antibiotiques utilisés dans la pratique courante.

#### **IV. Conclusion**

Ce chapitre, qui visait à évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits de racines d'*A. longa* sur des bactéries multi-résistantes, nous a permis de mettre en évidence une différence d'activité antibactérienne entre les différents extraits testés et de conclure que seules les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol qui ont montré une activité contre les souches choisies et que la détermination de la sensibilité de ces souches aux différents extraits dépend de la concentration de ces derniers. Il ressort également de ce travail que la fraction d'acétate d'éthyle était la plus active avec une bonne action bactériostatique sur *P. aeruginosa* ATCC, lui permettant d'être une source prometteuse d'agents antibactériens et par conséquent d'être utilisée comme supplément antibactérien dans les pays en développement pour développer de

nouveaux agents thérapeutiques mais aussi comme additifs naturels dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Des études *in vivo* et des essais cliniques supplémentaires sont cependant exigés pour justifier et évaluer davantage le potentiel de cette fraction en tant qu'agent antibactérien dans des applications topiques ou orales et pour isoler les composés bioactifs de cette fraction.



## Conclusion générale et perspectives

Dans de nombreuses régions du monde, les connaissances traditionnelles et la biodiversité jouent encore un rôle important dans les soins de santé, la culture, la religion, la sécurité alimentaire et le développement durable. Plusieurs médicaments à base de plantes largement utilisés sont dérivés de ces connaissances. En outre, les métabolites secondaires produits par les plantes sont généralement responsables des caractéristiques biologiques des espèces végétales utilisées dans le monde. Ainsi, la préservation, la protection et la promotion (si elles sont scientifiquement étayées) de ces connaissances traditionnelles sont d'une importance capitale. C'est dans ce sens que nous avons essayé d'apporter notre modeste contribution.

En fait, nous nous sommes fixés trois objectifs majeurs à atteindre pour ce travail; établir une étude phytochimique en utilisant des analyses qualitatives et quantitatives afin d'identifier les composés chimiques d'*A. longa*, vérifier (*in vivo*) sa toxicité dans le temps, et justifier expérimentalement certaines de ses indications thérapeutiques traditionnelles.

Après la préparation des extraits végétaux à l'aide de solvants de polarité différente (acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée), une étude phytochimique de ces extraits a été réalisée par un criblage phytochimique, suivi d'un dosage spectroscopique, puis d'une analyse chromatographique. En effet, dans la première partie du travail, le criblage phytochimique réalisé sur la matière végétale sèche a mis en évidence la présence d'alcaloïdes et de terpénoïdes à fortes concentrations. Alors que les flavonoïdes et les tanins existaient en concentration modérée. Pour le dosage phytochimique, la fraction d'acétate d'éthyle contenait les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux ( $32,55 \pm 0,43$  mg EAG/g d'extrait), en flavonoïdes ( $116,86 \pm 4,12$  mg ER/g d'extrait) et en tanins catéchiques ( $77,64 \pm 1,93$  mg EC/g d'extrait). En effet, l'analyse par HPLC-DAD a également confirmé ces teneurs *via* l'identification de plusieurs composés phénoliques majeurs dans cette fraction comme l'acide 4-hydroxycinnamique ( $10676,4 \pm 533,8$  µg/mg d'extrait), le kaempférol ( $8943,0 \pm 447,1$  µg/mg d'extrait), l'acide 3-hydroxybenzoïque ( $8141,5 \pm 407,1$  µg/mg d'extrait), l'acide

férulique ( $3828,9 \pm 191,4 \mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait) et l'acide benzoïque ( $3733,6 \pm 186,7 \mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait). Les racines de cette plante peuvent alors constituer une source prometteuse de biomolécules pouvant agir indépendamment ou en synergie, laissant prévoir des activités pharmacologiques intéressantes.

L'évaluation de la toxicité est une étape fondamentale avant l'utilisation de toute substance destinée à des fins thérapeutiques. Dans ce contexte, grâce à un protocole optimisé, nous avons déduit que *A. longa* n'a pas causé d'effets toxiques significatifs au début de l'expérience, même à des doses réputées toxiques, tandis qu'elle apparaissait toxique à travers des signes de toxicité rénale, hépatique et intestinale dans la dernière semaine de l'expérience.

Comme expliqué précédemment, la présence de plusieurs composés majoritaires dans les racines d'*A. longa* peut influencer l'intensité toxicologique de l'AA, susceptible d'être présent en faible quantité dans notre cas. Par conséquent, si cette plante est utilisée correctement, sa toxicité peut être maîtrisée et les gens peuvent en bénéficier sans aucun risque.

L'étude des capacités antioxydantes des extraits de racines d'*A. longa* réalisée selon trois méthodes complémentaires a montré que la fraction aqueuse présentait la valeur d'inhibition des radicaux DPPH la plus élevée ( $\text{CI}_{50} = 125,40 \pm 2,40 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), alors que la fraction méthanolique était la plus active contre le cation ABTS ( $\text{CI}_{50} = 61,58 \pm 2,15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). En outre, à une concentration de  $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ , la fraction aqueuse a présenté une activité réductrice du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) supérieure de 80,73%.

L'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de cette plante a été démontrée par l'inhibition de deux enzymes hydrolysant les glucides, l' $\alpha$ -glucosidase et la  $\beta$ -galactosidase. En conséquence, les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol ont présenté un pouvoir inhibiteur élevé contre l' $\alpha$ -glucosidase avec des valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de  $1,112 \pm 0,026$  et  $2,378 \pm 0,037 \text{ mg}/\text{mL}$ , respectivement, par rapport à l'antidiabétique standard (l'acarbose:  $0,199 \pm 0,014 \text{ mg}/\text{mL}$ ). Cependant, pour l'inhibition de la  $\beta$ -galactosidase, tous les extraits ont montré une valeur de  $\text{CI}_{50}$

supérieure à 5 mg/mL. Cette différence de résultats est due à des différences structurelles liées à l'origine des enzymes. Cette étude est la première à rapporter un potentiel antidiabétique d'*A. longa* via l'inhibition de ces enzymes digestives.

D'autre part, l'objectif de l'étude de l'activité antibactérienne d'*A. longa* était de sélectionner le(s) extrait(s) actif(s) contre des souches bactériennes multi-résistantes à l'aide de deux méthodes (zones d'inhibition et CMI/CMB). Pour la méthode des disques, les fractions d'acétate d'éthyle et du méthanol, à une concentration de 200 mg/mL, avaient les meilleures activités inhibitrices et ce contre la souche *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition de  $25,0 \pm 1,4$  mm et  $20,5 \pm 0,7$  mm, respectivement. Les résultats de la méthode des puits ont également confirmé cet ordre vis-à-vis de *S. aureus* qui était pourtant la seule bactérie inhibée concernant la fraction méthanolique. De façon intéressante, ces deux fractions ont montré une activité antibactérienne supérieure à celle de l'antibiotique de référence (vancomycine) contre la même souche, quelle que soit la technique utilisée (disques/puits). Par ailleurs, l'analyse des valeurs des CMIs a montré que la fraction d'acétate d'éthyle était la plus active avec une bonne action bactériostatique sur *P. aeruginosa* ATCC (CMI = 12,5 mg/mL) suivie de *S. aureus* ATCC (CMI = 50 mg/mL). Ceci indique que les extraits étudiés avaient un effet antibactérien relativement modéré contre les bactéries sélectionnées.

Le présent travail a donc permis de caractériser certains composés majeurs des quatre extraits de racines d'*A. longa*, et d'évaluer leurs propriétés antioxydantes, antidiabétiques et antibactériennes qui ont montré des résultats pertinents, constituant une justification scientifique des usages thérapeutiques traditionnels des racines d'*A. longa*, ainsi que de montrer l'innocuité de l'extrait aqueux dans les prises de courtes durées.

En perspective, il serait intéressant d'isoler les principaux composés des extraits étudiés afin d'évaluer leurs propriétés biologiques et comprendre le ou les mécanismes d'action mis en jeu. En effet, vu la richesse en composés phénoliques et les activités prometteuses de la fraction d'acétate d'éthyle, nous envisageons de

fractionner cette dernière, en se guidant par d'autres tests biologiques, pour caractériser et purifier les principes actifs susceptibles d'être responsables de ces effets en utilisant des techniques chromatographiques.

Les résultats de ce travail pourraient servir de base à des études *in vivo* et à des essais cliniques ultérieurs pour confirmer l'efficacité et justifier davantage le potentiel de cette plante et de ses fractions actives dans le traitement de divers troubles pathologiques. Par ailleurs, afin de compléter le profil toxicologique de cette plante, des études complémentaires devraient être menées pour déterminer ses effets sur des animaux gravides, leurs fœtus et leurs descendants, en traitements de longue durée. Enfin, il serait judicieux d'exploiter ces données dans d'autres domaines, tels que la conservation des aliments, la cosmétique, l'agroalimentaire, etc.

A travers ce travail de thèse, nous souhaitons avoir apporté une humble contribution à la valorisation de la phytothérapie au Maroc, ainsi qu'un apport phytochimique, toxicologique et pharmacologique important d'*Aristolochia longa*.

## Références bibliographiques

Aazza, S., Lyoussi, B., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J., Figueiredo, A. C., & Miguel, M. G. (2014). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. *Natural Product Communications*, 9(4), 1934578X1400900442.

Abdelgadir, A. A., Ahmed, E. M., & Eltohami, M. S. (2011). Isolation, characterization and quantity determination of aristolochic acids, toxic compounds in *Aristolochia bracteolata* L. *Environmental health insights*, 5, EHI-S6292.

Abdel-Hameed, E.-S. S., Bazaid, S. A., Shohayeb, M. M., El-Sayed, M. M., & El-Wakil, E. A. (2012). Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, 93–112.

Abdellaoui, M., Kasrati, A., & El Rhaffari, L. (2017). The effect of domestication on seed yield, essential oil yield and antioxidant activities of fennel seed (*Foeniculum vulgare* Mill) grown in Moroccan oasis. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 24, 107–114.

Abdelrasoul, M. A., Eid, A. R., & Badawy, M. E. (2020). Preparation, characterizations and antibacterial activity of different nanoemulsions incorporating monoterpenes: *in vitro* and *in vivo* studies. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(7–8), 310–334.

Abhishiktha, S. N., Saba, S., Shruniga, M. N., Sunitha, K. L., Prashith, K. T. R., & Raghavendra, H. L. (2015). Antimicrobial and Radical Scavenging Efficacy of Leaf and Flower of *Aristolochia indica* Linn. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 4(1), 103–108.

Abudunia, A.-M., Marmouzi, I., Faouzi, M. E. A., Ramli, Y., Taoufik, J., El Madani, N., et al. (2017). Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal de mycologie medicale*, 27(1), 90–97.

Adamski, Z., Blythe, L. L., Milella, L., & Bufo, S. A. (2020). *Biological Activities of Alkaloids: From Toxicology to Pharmacology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Adefegha, S. A., & Oboh, G. (2012). *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(10), 774–781.

Adjoungou, A., Diafouka, F., Koffi, P., Lokrou, A., & Attaï, H. (2006). Valorisation de la pharmacopée traditionnelle: action de l'extrait alcoolique de *Bidens pilosa* (Asteraceae) sur l'exploration statique et dynamique de la glycémie. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines*, 19, 1–12.

Aghadavoud, E., Nasri, H., & Amiri, M. (2017). Molecular signaling pathways of diabetic kidney disease; new concepts. *Journal of Preventive Epidemiology*, 2(2), e09–e09.

Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi medical journal*, 23(4), 373–378.

Ahmed, D., Kumar, V., Sharma, M., & Verma, A. (2014). Target guided isolation, *in-vitro* antidiabetic, antioxidant activity and molecular docking studies of some flavonoids from *Albizzia Lebbeck* Benth. bark. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1–13.

Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., et al. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), 313–319.

Akolade, J. O., Usman, L. A., Okereke, O. E., & Muhammad, N. O. (2014). Antidiabetic potentials of essential oil extracted from the leaves of *Hoslundia opposita* Vahl. *Journal of medicinal food*, 17(10), 1122–1128.

Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(2), 218–224.

Al-Habori, M., Al-Aghbari, A., Al-Mamary, M., & Baker, M. (2002). Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Journal of ethnopharmacology*, 83(3), 209–217.

Alipour, M., & Saharkhiz, M. J. (2016). Phytotoxic activity and variation in essential oil content and composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) during different phenological growth stages. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 271–278.

Almança, C. C., Saldanha, S. V., Sousa, D. R., Trivilin, L. O., Nunes, L. C., Porfírio, L. C., & Marinho, B. G. (2011). Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 508–512.

Alves, R. R., & Rosa, I. M. (2007). Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 3(1), 1–9.

Alves-Silva, J. M., Romane, A., Efferth, T., & Salgueiro, L. (2017). North African medicinal plants traditionally used in cancer therapy. *Frontiers in pharmacology*, 8, 383.

Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., & Fougrach, H. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathologie-biologie*, 61(6), 254–258.

Amine, D., Lamiae, B., Mohamed, B., Jamal, I., & Laila, N. (2015). Etude ethnobotanique au moyen atlas central. *European Scientific Journal*, 11(24)

Anand, P., Murali, K. Y., Tandon, V., Murthy, P. S., & Chandra, R. (2010). Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chemico-biological interactions*, 186(1), 72–81.

Andrade, F. H., Reid, M. B., Allen, D. G., & Westerblad, H. (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of physiology*, 509(2), 565–575.

Andrisic, L., Dudzik, D., Barbas, C., Milkovic, L., Grune, T., & Zarkovic, N. (2018). Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox biology*, 14, 47–58.

Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12), 4364–4370.

Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in *in vivo* conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9), 1260–1267.

Anulika, N. P., Ignatius, E. O., Raymond, E. S., Osasere, O.-I., & Abiola, A. H. (2016). The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res*, 4(8), 1–9.

Aoki, T., Akashi, T., & Ayabe, S. (2000). Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 113(4), 475.

Arlt, V. M., Schmeiser, H. H., & Pfeifer, G. P. (2001). Sequence-specific detection of aristolochic acid–DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis*, 22(1), 133–140.

Arlt, V. M., Stiborová, M., vom Brocke, J., Simoes, M. L., Lord, G. M., Nortier, J. L., et al. (2007). Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis*, 28(11), 2253–2261.

Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 9–20.

Aruoma, O. I., & Cuppett, S. L. (1997). Antioxidant methodology: *in vivo* and *in vitro* concepts. *The American Oil Chemists Society*.

Ashton, T., Young, I. S., Peters, J. R., Jones, E., Jackson, S. K., Davies, B., & Rowlands, C. C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *Journal of Applied Physiology*, 87(6), 2032–2036.

Asimi, O. A., Sahu, N. P., & Pal, A. K. (2013). Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(3), 1–8.

Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128–133.

- Avramova, Z. (2015). Transcriptional 'memory' of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*, 83(1), 149–159.
- Awuchi, C. G., Echeta, C. K., & Igwe, V. S. (2020). Diabetes and the Nutrition and Diets for Its Prevention and Treatment: A Systematic Review and Dietetic Perspective. *Health Sciences Research*, 6(1), 5–19.
- Badami, S., Jose, C. K., Dongre, S. K. H., & PC, J. (2005). *In vitro* antioxidant activity of various extracts of *Aristolochia bracteolata* leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 5(4), 316–321.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446–475.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79.
- Bammi, J., & Douira, A. (2002). Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc).
- Bammou, M., Sellam, K., Benlyas, M., Alem, C., & Filali-Zegzouti, Y. (2016). Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *Journal of King Saud University-Science*, 28(2), 136–142.
- Barbehenn, R. V., & Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565.
- Barbosa-Filho, J. M., Piuvezam, M. R., Moura, M. D., Silva, M. S., Lima, K. V. B., da-Cunha, E. V. L., et al. (2006). Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 109–139.
- Basha, R. H., & Sankaranarayanan, C. (2014).  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta histochemica*, 116(8), 1469–1479.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19633–19636.
- Belakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*, France.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., et al. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care*, 13(3), 198–208.
- Belosludtsev, K., Saris, N.-E. L., Andersson, L. C., Belosludtseva, N., Agafonov, A., Sharma, A., et al. (2006). On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 38(2), 113–120.



Benabid, A. (2000). Flore et ecosystèmes du Maroc: évaluation et préservation de la biodiversité. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015030117>. Accessed 25 September 2020

Benarba, B., Ambroise, G., Aoues, A., Meddah, B., & Vazquez, A. (2012). *Aristolochia longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 6(1).

Benarba, B., & Meddah, B. (2014). Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 3(4), 150.

Benarba, B., Pandiella, A., & Elmallah, A. (2016). Anticancer activity, phytochemical screening and acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Aristolochia longa* L. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 6(1), 20–26.

Benayad, Z., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C., & Es-Safi, N. E. (2014). Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial crops and products*, 62, 412–420.

Benkhniq, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A., & Douira, A. (2010). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 191–216.

Benmehdi, H., Behilil, A., Memmou, F., & Amrouche, A. (2017). Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1402–S1408.

Benzakour, G., Amrani, M., & Oudghiri, M. (2012). A Histopathological analyses of *in vivo* anti-tumor effect of an aqueous extract of *Aristolochia longa* used in cancer treatment in traditional medicine in Morocco. *International journal of plant research*, 2(2), 31–35.

Benzakour, G., Benkirane, N., Amrani, M., & Oudghiri, M. (2011). Immunostimulatory potential of *Aristolochia longa* L. induced toxicity on liver, intestine and kidney in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(8), 214–222.

Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316.

Berman, E., Schlicht, M., Moser, V. C., & MacPhail, R. C. (1995). A multidisciplinary approach to toxicological screening: I. Systemic toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 45(2), 127–143.

Berrani, A., Marmouzi, I., Kharbach, M., Bouyahya, A., El Hamdani, M., El Jemli, M., et al. (2018). *Anabasis aretioides* Coss. & Moq. phenolic compounds exhibit *in vitro* hypoglycemic, antioxidant and antipathogenic properties. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(2), 251–257.

Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S., & Benyamina, F. (2014). Evaluation of the leave and bud decoctions *Pinus halepensis* mill effects on the induced-phenol renal toxicity in wistar rats. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 6(2), 197–207.

Bhatt, A. J., Vyas, A. S., & Shah, D. P. (2019). New Frontier in the Treatment of Diabetes. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(5-s), 178–187.

Bigard, A. X. (2001). Lésions musculaires induites par l'exercice et surentraînement. *Science & Sports*, 16(4), 204–215.

Bimstein, E., Zangen, D., Abedrahim, W., & Katz, J. (2019). Type 1 Diabetes Mellitus (Juvenile Diabetes)—A review for the pediatric oral health provider. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 43(6), 417–423.

Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., & Aubourg, S. P. (2014). Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In *Antimicrobial compounds* (pp. 51–81). Springer.

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.

Bonina, F., Puglia, C., Tomaino, A., Saija, A., Mulinacci, N., Romani, A., & Vincieri, F. F. (2000). *In-vitro* Antioxidant and *In-vivo* Photoprotective Effect of Three Lyophilized Extracts of *Sedum telephium* L. Leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(10), 1279–1285.

Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Sayah, K., Cherrah, Y., & Faouzi, M. E. A. (2018). Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of alpha amylase, alpha glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic *Atractylis gummifera* L. extracts. *Plant Science Today*, 5(3), 103–112.

Bouhdid, S., Skali, S. N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M., & Abrini, J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African journal of Biotechnology*, 7(10).

Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum compactum* extracts. *Phytothérapie*.

Bouyahya, Abdelhakim, Abrini, J., Charfi, S., Boujida, N., Harsal, A. E., Talbaoui, A., et al. (2016b). *In vitro* antibacterial activity of organic extracts from north-west Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.). *Biotechnology Journal International*, 1–9.

Bouyahya, Abdelhakim, Bakri, Y., Belmehdi, O., Et-Touys, A., Abrini, J., & Dakka, N. (2017e). Phenolic extracts of *Centaureum erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pac J Trop Dis*, 7(7), 433–9.

Bouyahya, Abdelhakim, Bakri, Y., Et-Touys, A., Khouchlaa, A., El Idrissi, A. E. Y., Abrini, J., & Dakka, N. (2017c). *In vitro* screening of antibacterial and antioxidant

activities of essential oils from four Moroccan medicinal plants. *Microbiology Research Journal International*, 1–10.

Bouyahya, Abdelhakim, Bakri, Y., Khay, E. O., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., et al. (2017). Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review. *Asian Pac J Trop Dis*, 7(1), 57–64.

Bouyahya, Abdelhakim, Dakka, N., Talbaoui, A., Et-Touys, A., El-Boury, H., Abrini, J., & Bakri, Y. (December 1, 2017c). Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). *Industrial Crops and Products*, 108, 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.033>

Bouyahya, Abdelhakim, El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2016a). Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *Biotechnology Journal International*, 1–10.

Bouyahya, Abdelhakim, El Omari, N., Elmenyiy, N., Guaouguaou, F.-E., Balahbib, A., Belmehdi, O., et al. (2021). Moroccan antidiabetic medicinal plants: Ethnobotanical studies, phytochemical bioactive compounds, preclinical investigations, toxicological validations and clinical evidences; challenges, guidance and perspectives for future management of diabetes worldwide. *Trends in Food Science & Technology*.

Bouyahya, Abdelhakim, Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaoui, A., Fellah, H., Abrini, J., & Dakka, N. (October 1, 2017b). Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*, 111, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015>

Bouzidi, L. E., Larhsini, M., Markouk, M., Abbad, A., Hassani, L., & Bekkouche, K. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of *Withania frutescens*. *Natural product communications*, 6(10), 1934578X1100601009.

Brahim, M. A. S., Fadli, M., Markouk, M., Hassani, L., & Larhsini, M. (2015). Synergistic antimicrobial and antioxidant activity of saponins-rich extracts from *Paronychia argentea* and *Spergularia marginata*. *European Journal of Medicinal Plants*, 193–204.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25–30.

Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian Journal of Botany*, 1(1), 1–6.

Burak, M., & Imen, Y. (1999). Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klin Tip Bil Derg*, 19, 296–304.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 287–299.

Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Editorial Universitaria.

Calder, P. C. (2012). Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *The Journal of nutrition*, 142(3), 592S-599S.

Calleja, M. A., Vieites, J. M., Montero-Meterdez, T., Torres, M. I., Faus, M. J., Gil, A., & Suárez, A. (2013). The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British journal of nutrition*, 109(3), 394–401.

Camastra, S., Bonora, E., Del Prato, S., Rett, K., Weck, M., & Ferrannini, E. (1999). Effect of obesity and insulin resistance on resting and glucose-induced thermogenesis in man. *International journal of obesity*, 23(12), 1307–1313.

Camporese, A., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Morsellino, N., De Simone, F., & Tubaro, A. (2003). Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 103–107.

Cano, A., Acosta, M., & Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5(6), 365–370.

Carabajal, M. P. A., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2017). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. *South African Journal of Botany*, 110, 258–265.

Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids Essent Oils Antimicrob Agents*, 25, 203–38.

Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., et al. (2013). Snake venom PLA2s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013.

Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D. B., & Heck, H. d'A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. *Toxicological sciences: An official journal of the society of Toxicology*, 51(2), 236–244.

Caspary, W. F. (1978). Sucrose malabsorption in man after ingestion of  $\alpha$ -glucosidehydrolase inhibitor. *The Lancet*, 311(8076), 1231–1233.

Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648–653.

Chambers, H. F. (1995). Antimicrobial agents. General considerations. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 9, 1029–1142.

Chang, C.-H., Chen, M.-C., Chiu, T.-H., Li, Y.-H., Yu, W.-C., Liao, W.-L., et al. (2019). Arecoline promotes migration of A549 lung cancer cells through activating the EGFR/Src/FAK pathway. *Toxins*, 11(4), 185.

Chartone-Souza, E. (1998). Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. *Cienc Hoje*, 23(138), 27–35.

- Chattopadhyay, J. (1996). Effect of toxic substances on a two-species competitive system. *Ecological Modelling*, 84(1–3), 287–289.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481–493.
- Chen, H., Chen, T., Giudici, P., & Chen, F. (2016). Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1124–1138.
- Chen, L., Magliano, D. J., & Zimmet, P. Z. (2012). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature reviews endocrinology*, 8(4), 228.
- Cherif, H. S., Saidi, F., Boutoumi, H., Rouibi, A., & Chaouia, C. (2009). Identification et caractérisation de quelques composés chimiques chez *Aristolochia longa* L. *Agricultura*, 3, 76–82.
- Cherif, H. S., Saidi, F., & Guedioura, A. (2014). Toxicological evaluation of *Aristolochia longa* L. extract in mice. *Indian Journal of Applied Research*, 4(5), 26–30.
- Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(8), 1233–1239.
- Choi, H.-J., Jang, H.-J., Chung, T.-W., Jeong, S.-I., Cha, J., Choi, J.-Y., et al. (2013). Catalpol suppresses advanced glycation end-products-induced inflammatory responses through inhibition of reactive oxygen species in human monocytic THP-1 cells. *Fitoterapia*, 86, 19–28.
- Christudas, I. N., Kumar, P. P., Sunil, C., Vajravijayan, S., Sundaram, R. L., Siril, S. J., & Agastian, P. (2013). *In vitro* studies on  $\alpha$ -glucosidase inhibition, antioxidant and free radical scavenging activities of *Hedyotis biflora* L. *Food chemistry*, 138(2–3), 1689–1695.
- Chu, Y.-H., Wu, S.-H., & Hsieh, J.-F. (2014). Isolation and characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Rhodiola crenulata*. *Food research international*, 57, 8–14.
- Chua, M.-T., Tung, Y.-T., & Chang, S.-T. (2008). Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*, 99(6), 1918–1925.
- Chuang, C.-Y., Hsu, C., Chao, C.-Y., Wein, Y.-S., Kuo, Y.-H., & Huang, C. (2006). Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR $\alpha$  in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Journal of Biomedical Science*, 13(6), 763–772.
- Cimanga, K., Apers, S., de Bruyne, T., Van Miert, S., Hermans, N., Totté, J., et al. (2002). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 382–387.

Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., et al. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 144–151.

Constabel, C. P., Yoshida, K., & Walker, V. (2014). Diverse ecological roles of plant tannins: plant defense and beyond. *Recent advances in polyphenol research*, 4, 115–142.

Consultation, W. H. O. (1999). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*. Part.

Control, C. for D., & Prevention (CDC). (2004). Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes—United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 53(45), 1066–1068.

Coombes, J. S., Powers, S. K., Rowell, B., Hamilton, K. L., Dodd, S. L., Shanely, R. A., et al. (2001). Effects of vitamin E and  $\alpha$ -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *Journal of Applied Physiology*, 90(4), 1424–1430.

Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 30(2), 280–285.

Cordell, G. A. (1981). Introduction to alkaloids: A biogenetic approach. *John Wiley & Sons*.

Coste, A. (2011). 3193 *Aristolochia longa*. Tela botanica. [https://www.tela-botanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num\\_nom=6468&onglet=synthese](https://www.tela-botanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num_nom=6468&onglet=synthese). Accessed 29 May 2021

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 569–590.

Couldiati, T. H., Millogo-Kone, H., Lamien-Meda, A., Lamien, C. E., Lompo, M., Kiendrebeogo, M., et al. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of *Combretum niroense* Aubrév. ex Keay (Combretaceae). *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 12(3), 264–269.

Council, N. R. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals: Washington. DC: *The National Academies Press*.

Das, K. C., Lewis-Molock, Y., & White, C. W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 17(6), 713–726.

Dauncey, E. A., & Larsson, S. (2018). Plants that Kill: A Natural History of the World's Most Poisonous Plants. *Princeton University Press*.

Debnath, B., Uddin, M. J., Patari, P., Das, M., Maiti, D., & Manna, K. (2015). Estimation of alkaloids and phenolics of five edible cucurbitaceous plants and their antibacterial activity. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7(12), 223–227.

Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine*, 21(3), 213–238.

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804), 4.

Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 50(17), 4959–4964.

Dey, A., & De, J. N. (2011). *Aristolochia indica* L.: A review. *Asian Journal of Plant Sciences*.

Dhouioui, M., Boulila, A., Chaabane, H., Zina, M. S., & Casabianca, H. (2016). Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 83, 301–306.

Dhouioui, M., Boulila, A., Jemli, M., Schiets, F., Casabianca, H., & Zina, M. S. (2016a). Fatty acids composition and antibacterial activity of *Aristolochia longa* L. and *Bryonia dioica* Jacq. growing wild in Tunisia. *Journal of oleo science*, 65(8), 655–661.

Dipasquale, D., Basiricò, L., Morera, P., Primi, R., Tröscher, A., & Bernabucci, U. (2018). Anti-inflammatory effects of conjugated linoleic acid isomers and essential fatty acids in bovine mammary epithelial cells. *Animal*, 12(10), 2108–2114.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006b). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654–660.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamri, S., Djireb, F., & Stocker, P. (2006a). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(6), 719–726.

Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 83(2), 255–262.

Dorman, H.-D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308–316.

Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S., & Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical chemistry*, 46(12), 2050–2068.

Duraffourd, C., Hervicourt, L. d', & Lapraz, J.-C. (1983). Cahiers de phytothérapie clinique: Examens de laboratoire, galénique, éléments thérapeutiques synergiques. *Masson*.

El Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 43–50.

El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., & Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), 149–158.

Emily, M. (2007). Toxicity. *Encyclopedia of Earth*. Eds. Cutler J. Cleveland, Washington DC.

Endtz, H. P., Ruijs, G. J., van Klingeren, B., Jansen, W. H., van der Reyden, T., & Mouton, R. P. (1991). Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 199–208.

Et-Touys, A., Fellah, H., Mniouil, M., Bouyahya, A., Dakka, N., Sadak, A., & Bakri, Y. (2016). Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Microbiology Research Journal International*, 1–10.

Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 647S–652S.

Ezoubeiri, A., Gadhi, C. A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., & Vanhaelen, M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of ethnopharmacology*, 99(2), 287–292.

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., Lebrazi, S., & Rachiq, S. (2017). Intrapopulation variability of *Myrtus communis* L. growing in Morocco: Chemometric investigation and antibacterial activity. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 7, 35–40.

Fadli, M., Bolla, J.-M., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., & Hassani, L. (2014). First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riatarum* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 61, 370–376.

Fadli, M., Chevalier, J., Saad, A., Mezrioui, N.-E., Hassani, L., & Pages, J.-M. (2011). Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, 38(4), 325–330.

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464–471.

Fehrenbach, E., & Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise immunology review*, 7, 66–89.

Fennane, M., Tattou, M. I., & Mathez, J. (1999). Flore pratique du Maroc: manuel de détermination des plantes vasculaires. Pteridophyta, Gymnospermae, Angiospermae (Lauraceae-Neuradaceae). *Institut scientifique*.

Feroze, N. G. (1969). Advanced Aquary Guide. *The Pet library Ltd Harrison NJ, USA*.



Fiebelkorn, K. R., Crawford, S. A., & Jorgensen, J. H. (2005). Mutations in folP associated with elevated sulfonamide MICs for *Neisseria meningitidis* clinical isolates from five continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 536.

Finch, R. G., Greenwood, D., Whitley, R. J., & Norrby, S. R. (2010). Antibiotic and chemotherapy e-book. *Elsevier Health Sciences*.

Foti, M. C., & Ingold, K. U. (2003). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by  $\gamma$ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2758–2765.

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.

Fuchs, J., Weber, S., Podda, M., Groth, N., Herrling, T., Packer, L., & Kaufmann, R. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(3), 330–336.

Fullerton, H. J., Ditelberg, J. S., Chen, S. F., Sarco, D. P., Chan, P. H., Epstein, C. J., & Ferriero, D. M. (1998). Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Annals of neurology*, 44(3), 357–364.

Gabardi, S., Munz, K., & Ulbricht, C. (2007). A review of dietary supplement-induced renal dysfunction. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(4), 757–765.

Gadhi, C. A., Weber, M., Mory, F., Benharref, A., Lion, C., Jana, M., & Lozniewski, A. (1999). Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel. *Journal of ethnopharmacology*, 67(1), 87–92.

Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120–1130.

Gershenson, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408–414.

Ghedadba, N., Bousselela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15–24.

Ghosh, D. (2015). Tannins from foods to combat diseases. *Int J Pharm Res Rev*, 4(5), 40–44.

Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A. (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 17(1), 2388–2411.

Girija, S., Duraipandiyan, V., Kuppusamy, P. S., Gajendran, H., & Rajagopal, R. (2014). Chromatographic characterization and GC-MS evaluation of the bioactive constituents with antimicrobial potential from the pigmented ink of *Loligo duvauceli*. *International Scholarly Research Notices*, 2014.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical engineering journal*, 14(3), 217–225.

Goeb, P. (1999). *Aromathérapie pratique et familiale*. Ed. Cap-d'Agde, MDB. 93pp.

Golden, T. R., Hinerfeld, D. A., & Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging cell*, 1(2), 117–123.

Gome, M. B., Kouakou, K., Toure, A., & Traore, F. (2011). Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 1777–1789.

Goncharov, N., Orekhov, A. N., Voitenko, N., Ukolov, A., Jenkins, R., & Avdonin, P. (2016). Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. Ed. Gupta RC Academic Press, 177.

González, F., & Pabón-Mora, N. (2018). Sinopsis actualizada de *Aristolochia* (Aristolochiaceae, Piperales) en Panamá. *Acta botánica mexicana*, (122), 109–140.

Gourgari, E., Wilhelm, E. E., Hassanzadeh, H., Aroda, V. R., & Shoulson, I. (2017). A comprehensive review of the FDA-approved labels of diabetes drugs: Indications, safety, and emerging cardiovascular safety data. *Journal of Diabetes and its Complications*, 31(12), 1719–1727.

Governa, P., Bains, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A. R., et al. (2018). Phytotherapy in the management of diabetes: a review. *Molecules*, 23(1), 105.

Grassmann, J., Hippeli, S., & Elstner, E. F. (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 471–478.

Griesbach, R. J. (2005). Biochemistry and genetics of flower color. *Plant Breed Rev*, 25, 89–114.

Grollman, A. P., Scarborough, J., & Jelaković, B. (2009). Aristolochic acid nephropathy: an environmental and iatrogenic disease. *Advances in molecular toxicology*, 3, 211–227.

Guignard, J.-L. (1974). *Abrégé de biochimie végétale*.

Guinnin, F. F., Klotoe, J. R., & Ategbro, J.-M. (2017). Acute toxicity evaluation of ethanolic extract of *Aristolochia albida* Duch. leaves on wistar rats liver and kidney functions. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(7), 35.

Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*, 83(3), 371–382.

- 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.
- Hajji, H., Talbaoui, A., Elalaoui, F. E. F., & Abdennebi, E. (2016). *In vitro* evaluation of antibacterial action of *Caralluma europaea* extracts on *Rhodococcus equi*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(5), 943–952.
- Han, K.-S., Jung, T.-H., & Shin, K.-O. (2019). Studies on the general analysis and antioxidant component analysis of *Chenopodium album* var. *centrorubrum* and biochemical analysis of blood of mice administered *C. album*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 51(5), 492–498
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1365–1402.
- Harada, H., Yamashita, U., Kurihara, H., Fukushi, E., Kawabata, J., & Kamei, Y. (2002). Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer research*, 22(5), 2587–2590.
- Harmon, D. L., & McLeod, K. R. (2001). Glucose uptake and regulation by intestinal tissues: Implications and whole-body energetics. *Journal of Animal Science*, 79(suppl\_E), E59–E72.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, 5(7), 294–300.
- Hassan, R. A., Sand, M. I., & El-Kadi, S. M. (2012). Effect of some organic acids on fungal growth and their toxins production. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 3(9), 391–397.
- Hassanpour, S., MaheriSis, N., & Eshratkhah, B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review.
- Hayek, S. A., & Ibrahim, S. A. (2012). Antimicrobial activity of xoconostle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium. *International Journal of Microbiology*, 2012.
- He, Q., Lv, Y., & Yao, K. (2007). Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101(3), 1178–1182.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., & Simmonds, M. S. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. *Journal of ethnopharmacology*, 125(1), 108–144.
- Helfand, S. L., & Rogina, B. (2003). Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics*, 37(1), 329–348.

Hinou, J., Demetzos, C., Harvala, C., & Roussakis, C. (1990). Cytotoxic and antimicrobial principles from the roots of *Aristolochia longa*. *International Journal of Crude Drug Research*, 28(2), 149–151.

Holloway, W. D., Tasman-Jones, C., & Lee, S. P. (1978). Digestion of certain fractions of dietary fiber in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 31(6), 927–930.

Hossen, S. M., Hossain, M. S., Islam, J., Pinto, M. N., Jannat, N. E., & Ahmed, F. (2014). Comparative preliminary phytochemical and biological investigations on *Andrographis paniculata* (Nees) and *Aristolochia indica* (Linn). *Der Pharma Chemica*, 6, 332–8.

Hostettmann, K., & Wolfender, J.-L. (2000). Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. *Bioactive natural products: isolation, structure elucidation and biological properties*, 31–68.

Houbairi, S., Elmiziani, I., Lamiri, A., & Essahli, M. (2015). Comparison of the antioxidant activity of aromatic medicinal plants of Moroccan origin. *European Journal of Medicinal Plants*, 1–10.

Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *New England journal of medicine*, 345(11), 790–797.

Hu, S.-L., Zhang, H.-Q., Chan, K., & Mei, Q.-X. (2004). Studies on the toxicity of *Aristolochia manshuriensis* (Guanmuton). *Toxicology*, 198(1–3), 195–201.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Huang, D.-W., & Shen, S.-C. (2012). Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism *via* modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 358–366.

Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012). Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 21(12), 1801–1818.

Huang, T.-C., Chen, S.-M., Li, Y.-C., & Lee, J.-A. (2014). Increased renal semicarbazide-sensitive amine oxidase activity and methylglyoxal levels in aristolochic acid-induced nephrotoxicity. *Life sciences*, 114(1), 4–11.

Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to, & Cancer, I. A. for R. on. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (Vol. 82). *World Health Organization*.

Jack Jr, L., Boseman, L., & Vinicor, F. (2004). Aging Americans and diabetes. A public health and clinical response. *Geriatrics (Basel, Switzerland)*, 59(4), 14–17.

Jackson, L. (1964). Aristolochic acid (NSC-50413); phase I clinical study. *Cancer Chemother Rep*, 42, 35–37.

Jalal, Z., El Atki, Y., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2015). Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 458–461.

Jamali, C. A., El Bouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, M., Wohlmuth, H., et al. (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chemistry & biodiversity*, 9(6), 1188–1197.

Janani, & Revathi. (2018). *In vitro* evaluation of *Aristolochia indica* for its anti-inflammatory, antidiabetic and anticancer efficacy. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*, 4,(6), 23–30.

Jang, H.-H., Kim, D.-H., Ahn, T., & Yun, C.-H. (2010). Functional and conformational modulation of human cytochrome P450 1B1 by anionic phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 493(2), 143–150.

Jangid, H., Chaturvedi, S., & Khinchi, M. P. (2017). An overview on diabetes mellitus. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 1–11.

Jegadeeswari, P., Nishanthini, A., Muthukumarasamy, S., & Mohan, V. R. (2014). Evaluation of antioxidant activity of *Aristolochia Krysagathra* (Aristolochiaceae)-An important medicinal herb. *International Journal of Pharmacy*, 4(1), 410–416.

Jenkins, R., & Goldfarb, A. (1993). Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2), 210–212.

Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry. *Sports medicine*, 5(3), 156–170.

Jia, G., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*, 61(1), 21–28.

Jigna, P., & Sumitra, C. (2008). Phytochemical screening of some plants from western region of India. *Plant Archives*, 8(2), 657–662.

Jing, H., Liu, J., Liu, H., & Xin, H. (2014). Histochemical investigation and kinds of alkaloids in leaves of different developmental stages in *Thymus quinquecostatus*. *The Scientific World Journal*, 2014.

Jothy, S. L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y. L., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules*, 16(6), 5268–5282.

Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2), 213–217.

Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3042–3053.

Kala, C. P. (2005). Current status of medicinal plants used by traditional Vaidyas in Uttaranchal state of India.

Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.-F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160–164.

Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.

Kangralkar, V. A., Patil, S. D., & Bandivadekar, R. M. (2010). Oxidative stress and diabetes: a review. *Int J Pharm Appl*, 1(1), 38–45.

Karan, S. K., Mishra, S. K., Pal, D., & Mondal, A. (2012). Isolation of sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan-induced diabetic mice with a reference to *in-vitro* antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1219–1223.

Kasai, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 450–456.

Kasrati, A., Jamali, C. A., Fadli, M., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., et al. (2014). Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, 61, 338–344.

Kekuda, P. T., Manasa, M., Poornima, G., Abhipsa, V., Rekha, C., Upashe, S. P., & Raghavendra, H. L. (2013). Antibacterial, cytotoxic and antioxidant potential of *Vitex negundo* var. *negundo* and *Vitex negundo* var. *purpurascens*-A comparative study. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 2(3), 59.

Kessy, J. F. (1998). Conservation and utilization of natural resources in the East Usambara forest reserves: conventional views and local perspectives. *Wageningen Agricultural University*.

Kg, A., Zimmet, P., Shaw, J., & group, I. E. T. F. C. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059–62.

Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 51–55.

Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial crops and products*, 61, 41–48.

Khalipha, A. B. R., Ahmed, F., & Rahman, M. M. (2012). Antioxidant and antidiarrhoeal potentiality of *Diospyros blancoi*. *Int J Pharmacol*, 8(5), 403–409.

Khiyari, M. E. A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Zeroual, S., Markouk, M., Bekkouche, K., et al. (2014). Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* (Webb. & Helder)),

an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Industrial Crops and Products*, 57, 106–109.

Khouchlaa, A., Bakri, Y., & Tijane, M. (2018). Ethnobotanical study on the Bereztem Plant (*Aristolochia longa*) used in the treatment of some diseases in the cities of Rabat, Sale and Temara (Morocco).

Kim, S.-H., Jo, S.-H., Kwon, Y.-I., & Hwang, J.-K. (2011). Effects of onion (*Allium cepa* L.) extract administration on intestinal  $\alpha$ -glucosidases activities and spikes in postprandial blood glucose levels in SD rats model. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3757–3769.

King, A. M. Y., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99(2), 213–218.

Koruthu, D. P., Manivarnan, N. K., Gopinath, A., & Abraham, R. (2011). Antibacterial evaluation, reducing power assay and phytochemical screening of *Moringa oleifera* leaf extracts: effect of solvent polarity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(11), 2991.

Krasteva, A., Panov, V., Krasteva, A., Kisselova, A., & Krastev, Z. (2011). Oral cavity and systemic diseases—diabetes mellitus. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2183–2186.

Kumar, M. S., & Rajeswari, A. N. (2011). Evaluation of antimicrobial activities of *Aristolochia indica* (Linn). *Inter J Pharm Pharmaceut Sci*, 3, 271.

Kumar, Vikas, Kaur, J., Panghal, A., Kaur, S., & Handa, V. (2018). Caffeine: a boon or bane. *Nutrition & Food Science*.

Kumar, Vineet, Prasad, A. K., & Parmar, V. S. (2003). Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Natural product reports*, 20(6), 565–583.

Kumari, K., & Augusti, K. T. (2002). Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (*Allium cepa* Linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats.

Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, 99(8), 2981–2988.

Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique*.

Lameire, N., Van Biesen, W., & Vanholder, R. (2005). Acute renal failure. *The Lancet*, 365(9457), 417–430.

Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama*, 300(11), 1303–1310.

Leclaire, S. (2008). Digestion et absorption des nutriments. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 43(1), 45–50.

Lee, H. S., & Han, D. S. (1992). A new acylated N-glycosyl lactam from *Aristolochia contorta*. *Journal of natural products*, 55(9), 1165–1169.

Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Lee, J. W., Lee, S. Y., Ha, T. Y., Oh, K. W., et al. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain research*, 1250, 164–174.

Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O., & Heinecke, J. W. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1–2), 186–192.

Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1643–1647.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916–4922.

Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790–796.

Lewis, D. A. (1989). Anti-inflammatory drugs from plant and marine sources. *Agents and actions Supplements*, 27.

Li, Y., Liu, Z., Guo, X., Shu, J., Chen, Z., & Li, L. (2006). Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells *in vitro*. *Archives of toxicology*, 80(8), 524–532.

Li, Z.-J., Njateng, G. S., He, W.-J., Zhang, H.-X., Gu, J.-L., Chen, S.-N., & Du, Z.-Z. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chemistry & biodiversity*, 10(11), 2032–2041.

Liebman, W. M., Thaler, M. M., DeLorimier, A., Brandborg, L. L., & Goodman, J. (1980). Intractable diarrhea of infancy due to intestinal coccidiosis. *Gastroenterology*, 78(3), 579–584.

Linnane, A. W., Zhang, C., Yarovaya, N., Kopsidas, G., Kovalenko, S., Papakostopoulos, P., et al. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 396–411.

Liu, C., Zhang, M., Hu, M., Guo, H., Li, J., Yu, Y., et al. (2013). Increased glucagon-like peptide-1 secretion may be involved in antidiabetic effects of ginsenosides. *J Endocrinol*, 217(2), 185–196

Liu, M.-C., Maruyama, S., Mizuno, M., Morita, Y., Hanaki, S., Yuzawa, Y., & Matsuo, S. (2003). The nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis* in rats is attributable to its aristolochic acids. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology*, 7(3), 186–194.



Livrea, M. A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintaudi, A. M., Ciaccio, M., & Riccio, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(3), 401–409.

Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Saleh, K. A., & Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 43–47.

Lonappan, A., Bindu, G., Thomas, V., Jacob, J., Rajasekaran, C., & Mathew, K. T. (2007). Diagnosis of diabetes mellitus using microwaves. *Journal of Electromagnetic Waves and Applications*, 21(10), 1393–1401.

Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food chemistry*, 141(3), 2170–2176.

Lovejoy, J. C. (2002). The influence of dietary fat on insulin resistance. *Current diabetes reports*, 2(5), 435–440.

Loza-Tavera, H. (1999). Monoterpenes in essential oils. *Chemicals via higher plant bioengineering*, 49–62.

Lozniewski, A., & Rabaud, C. (2010). Résistance aux antibiotiques. *CCLIN Sud-Est*.

Lugasi, A. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1–4), 119–125.

Ma, J., Whittaker, P., Keller, A. C., Mazzola, E. P., Pawar, R. S., White, K. D., et al. (2010). Cucurbitane-type triterpenoids from *Momordica charantia*. *Planta medica*, 76(15), 1758–1761.

Ma, Y.-S., Stone, W. L., & LeClair, I. O. (1994). The effects of vitamin C and urate on the oxidation kinetics of human low-density lipoprotein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 206(1), 53–59.

Machado, M. B., & Lopes, L. M. (2008). Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry*, 69(18), 3095–3102.

Mahomoodally, M. F., Subratty, A. H., Gurib-Fakim, A., Choudhary, M. I., & Nahar Khan, S. (2012). Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes *in vitro* and reduce postprandial blood glucose peaks *in vivo*. *The Scientific World Journal*, 2012.

Malgras, D. (1992). Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes.

Marles, R. J. (1994). Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res*, 6, 149–187.

Marmouzi, I., Ali, K., Harhar, H., Gharby, S., Sayah, K., El Madani, N., et al. (2018). Functional composition, antibacterial and antioxidative properties of oil and phenolics from Moroccan *Pennisetum glaucum* seeds. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(3), 229–234.

Marmouzi, I., Karym, E. M., Saidi, N., Meddah, B., Kharbach, M., Masrar, A., et al. (2017). *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-hyperglycemic activities of moroccan oat cultivars. *Antioxidants*, 6(4), 102.

Marmouzi, I., Kharbach, M., El Jemli, M., Bouyahya, A., Cherrah, Y., Bouklouze, A., et al. (2019). Antidiabetic, dermatoprotective, antioxidant and chemical functionalities in *Zizyphus lotus* leaves and fruits. *Industrial Crops and Products*, 132, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.007>

Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718.

Marze, S. (2017). Modeling of Food Digestion. In *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes* (pp. 353–374). Elsevier.

Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., & Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 7115–7121.

McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1015.

McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(12), 1420–1433.

Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 36–44.

Mengs, U. (1987). Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Archives of toxicology*, 59(5), 328–331.

Mengs, U., & Stotzem, C. D. (1993). Renal toxicity of aristolochic acid in rats as an example of nephrotoxicity testing in routine toxicology. *Archives of toxicology*, 67(5), 307–311.

Merouani, N., Belhattab, R., & Sahli, F. (2017). Evaluation of the biological activity of *Aristolochia longa* L. extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5), 1978–1992.

Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M., & Maiza, F. (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial crops and products*, 67, 249–256.

Michl, J., Ingrouille, M. J., Simmonds, M. S., & Heinrich, M. (2014). Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Natural product reports*, 31(5), 676–693.

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.

Mohamed, E. A. H., Siddiqui, M. J. A., Ang, L. F., Sadikun, A., Chan, S. H., Tan, S. C., et al. (2012). Potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1–7.

Monnier, L., & Thuan, J.-F. (2007). Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of the adult. Complications of diabetes. *La Revue du praticien*, 57(6), 653–664.

Morel, D. W., Hessler, J. R., & Chisolm, G. M. (1983). Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *Journal of lipid research*, 24(8), 1070–1076.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, 40(2), 223–231.

Mudoï, T., Deka, D. C., & Devi, R. (2012). *In vitro* antioxidant activity of *Garcinia pedunculata*, an indigenous fruit. *In vitro*, 4(1), 334–342.

Mukinda, J. T., & Eagles, P. F. (2010). Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 236–240.

Mukinda, J. T., & Syce, J. A. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 112(1), 138–144.

Munro, B. H. (1971). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Pathology*, 3(3), 249.

Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128–132.

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 247–256.

Nazarian-Samani, Z., Sewell, R. D., Lorigooini, Z., & Rafieian-Kopaei, M. (2018). Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: A systematic review. *Current diabetes reports*, 18(10), 1–13.

Negi, P. S., Anandharamakrishnan, C., & Jayaprakasha, G. K. (2003). Antibacterial activity of *Aristolochia bracteata* root extracts. *Journal of medicinal food*, 6(4), 401–403.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022–1037.

Nguyen, D. V., Shaw, L., & Grant, M. (2012). Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in endocrinology*, 3, 170.

Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418–425.

Nile, S. H., Keum, Y. S., Nile, A. S., Jalde, S. S., & Patel, R. V. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(1), e22002.

Nile, S. H., Nile, A. S., & Keum, Y.-S. (2017). Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*, 7(1), 1–10.

Nisa, H., Kamili, A. N., Bandh, S. A., Lone, B. A., & Parray, J. A. (2013). Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of *Rumex dentatus* L.–a locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 3(6), 434–440.

OA, A.-S., TM, E.-H., & AA, A.-M. (2002). Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, 70(2), 135–145.

Och, A., Zalewski, D., Komsta, \Lukasz, Ko\lodziej, P., Kocki, J., & Bogucka-Kocka, A. (2019). Cytotoxic and proapoptotic activity of sanguinarine, berberine, and extracts of *Chelidonium majus* L. and *Berberis thunbergii* DC. toward hematopoietic cancer cell lines. *Toxins*, 11(9), 485.

Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269.

Orban, J.-C., & Ichai, C. (2008). Complications métaboliques aiguës du diabète. *Réanimation*, 17(8), 761–767.

Organization, W. H. (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *Genève: Organisation mondiale de la Santé*.

Organization, W. H. (2003). Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. *Genève: Organisation mondiale de la Santé*.

Organization, W. H. (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation.

Organization, W. H. (2016). *Global Report on Diabetes*. ISBN 978 92 4 156525 7. *Geneva*.

Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F. O., Taleb, M., & Greche, H. (2016). Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 89, 1–9.

Ozhogina, O. A., & Kasaikina, O. T. (1995).  $\beta$ -Carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 575–581.

Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., & Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of physiology and pathophysiology*, 4(4), 46–57.

Pacheco, A. G., Machado de Oliveira, P., Piló-Veloso, D., & Flávio de Carvalho Alcântara, A. (2009). <sup>13</sup>C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules*, 14(3), 1245–1262.

Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of sports sciences*, 15(3), 353–363.

Palani, S., Raja, S., Kumar, R. P., Jayakumar, S., & Kumar, B. S. (2009). Therapeutic efficacy of *Pimpinella tirupatiensis* (Apiaceae) on acetaminophen induced nephrotoxicity and oxidative stress in male albino rats. *Int J PharmTech Res*, 1(3), 925–934.

Palmer, F. M., Nieman, D. C., Henson, D. A., McAnulty, S. R., McAnulty, L., Swick, N. S., et al. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *European journal of applied physiology*, 89(1), 100–107.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.

Panunto, W., Jaijoy, K., Lerdvuthisophon, N., Lertprasertsuke, N., Jiruntanat, N., Soonthornchareonnon, N., & Sireeratawong, S. (2010). Acute and chronic toxicity studies of the water extract from dried fruits of *Terminalia chebula* Rezt. in rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 3(4), 36–43.

Patey-Mariaud de Serre, N., Verkarre, V., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., & Schmitz, J. (2000). Diagnostic étiologique d'une atrophie villositaire. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 24(4), 436–446.

Paul, S. (1977). Guide des plantes médicinales. *Delachaux et Niestli, Ferdinand Pari*, 396p.

Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Saed, G. M., et al. (2010). Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 205–213.

Perez-Gutierrez, R. M., & Damian-Guzman, M. (2012). Meliacinolin: a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor isolated from *Azadirachta indica* leaves and *in vivo* antidiabetic property in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes in mice. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 35(9), 1516–1524.

Pfau, W., Schmeiser, H. H., & Wiessler, M. (1990). Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA. *Carcinogenesis*, 11(2), 313–319.

Pfau, W., Schmeiser, H. H., & Wiessler, M. (1991). N<sup>6</sup>-adenyl arylation of DNA by aristolochic acid II and a synthetic model for the putative proximate carcinogen. *Chemical research in toxicology*, 4(5), 581–586.

- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035–1042.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233–239.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., et al. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679–684.
- Ponnusamy, S., Haldar, S., Mulani, F., Zinjarde, S., Thulasiram, H., & RaviKumar, A. (2015). Gedunin and azadiradione: human pancreatic alpha-amylase inhibiting limonoids from neem (*Azadirachta indica*) as anti-diabetic agents. *PloS one*, 10(10), e0140113.
- Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4), 1025–1033.
- Pozdzik, A. A., Berton, A., Schmeiser, H. H., Missoum, W., Decaestecker, C., Salmon, I. J., et al. (2010). Aristolochic acid nephropathy revisited: a place for innate and adaptive immunity? *Histopathology*, 56(4), 449–463.
- Pratt, D. S., & Kaplan, M. M. (2000). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*, 342(17), 1266–1271.
- Preiser, J.-C. (2012). Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147–154.
- Qiu, Q., Liu, Z.-H., Chen, H.-P., Yin, H.-L., & Li, L.-S. (2000). Long-term outcome of acute renal injury induced by *Aristolochia manshuriensis* Kom in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(12), 1129–1135.
- RADak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., SASVari, M., et al. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1–2), 69–74.
- Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Khallouki, F., & Amrani, S. (2015). Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2), 93–100.
- Ramkumar, K. M., Thayumanavan, B., Palvannan, T., & Rajaguru, P. (2010). Inhibitory effect of *Gymnema Montanum* leaves on  $\alpha$ -glucosidase activity and  $\alpha$ -amylase activity and their relationship with polyphenolic content. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 948–961.

Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250–264.

Reid, M. B. (2001). Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of applied physiology*, 90(2), 724–731.

Renke, J., Popadiuk, S., Korzon, M., Bugajczyk, B., & Woźniak, M. (2000). Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(2), 101–104.

Rhattas, M., Douira, A., & Zidane, L. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 97, 9187–9211

Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 378–386.

Ribeiro-Filho, J., Carvalho Leite, F., Surrage Calheiros, A., de Brito Carneiro, A., Alves Azeredo, J., Fernandes de Assis, E., et al. (2019). Curine Inhibits Macrophage Activation and Neutrophil Recruitment in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Toxins*, 11(12), 705.

Ricardo-da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Cabanis, J.-C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 111–125.

Rice, L. B., & Eliopoulos, G. M. (2000). Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clinical infectious diseases*, 31(3), 762–769.

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.

Richard, A. D., & Daneel, F. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205–211.

Rimbach, G., Höhler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., & Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archives of Animal Nutrition*, 52(3), 203–222.

Ripsin, C. M., Kang, H., & Urban, R. J. (2009). Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *American family physician*, 79(1), 29–36.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866–2887.

Robinson, T. (1991). The organic constituents of higher plants.

Robisch, G., Schimmer, O., & Göggelmann, W. (1982). Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research Letters*, 105(4), 201–204.

Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(9), 2709–2729.

Rodrigues, L., Póvoa, O., Teixeira, G., Figueiredo, A. C., Moldão, M., & Monteiro, A. (2013). Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 43, 692–700.

Rorsman, P., & Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology*, 75, 155–179.

Rother, K. I. (2007). Diabetes treatment—bridging the divide. *The New England journal of medicine*, 356(15), 1499.

Rufino, A. T., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., & Mendes, A. F. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European journal of pharmacology*, 750, 141–150.

Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G., & Oehlbauer, M. (2009). The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? *Burns*, 35(5), 695–700.

Sakagami, Y., & Kajimura, K. (2002). Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Hospital Infection*, 50(2), 140–144.

Salehi, B., Quispe, C., Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., Sharifi-Rad, J., et al. (2020). Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 11.

Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L., & Douira, A. (2010). Floristic and ethnobotanical study of medicinal plants of Kénitra (Maroc). *Lazarooa*, 31, 133–146.

Samanta, A., Das, G., & Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 100(6), 12–35.

Samaradivakara, S. P., Samarasekera, R., Handunnetti, S. M., & Weerasena, O. J. (2016). Cholinesterase, protease inhibitory and antioxidant capacities of Sri Lankan medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 83, 227–234.

Samir, D., Khaoula, Z., Safa, G., & Yahia, K. (2018). Beneficial Effects of *Aristolochia Longa* and *Aquilaria Malaccensis* on lead-induced hematological alterations and heart oxidative stress in rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 10(9), 8–15.

Samir, D., Khaoula, Z., Safa, G., Yahia, K., & Anouar, F. (2017). Protective effects of *Aristolochia longa* and *Aquilaria malaccensis* against lead induced acute liver injury in rats. *Journal of Acute Disease*, 6(5), 193.



Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., et al. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263–1269.

Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., & Faouzi, M. E. A. (2017). Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *BioMed Research International*, 2017.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.

Scheepers, A., Joost, H.-G., & Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 28(5), 364–371.

Schmeiser, H. H., Lyons, J., Janssen, J. W. G., Bartram, C. R., Scherf, H. R., Pfau, W., & Wiessler, M. (1989). Aristolochic Acid I Induced Tumors in Wistar Rats Contain Activating Mutations in Codon 61 of the H-ras Protooncogene. In *ras Oncogenes* (pp. 261–262). Springer.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International journal of antimicrobial agents*, 17(6), 431–437.

Schwarz, Stefan, Cloeckart, A., & Roberts, M. C. (2005). Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, 73–98.

Schwarz, Stefan, Loeffler, A., & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Advances in Veterinary Dermatology*, 8, 95–110.

Schwarz, STEFAN, & Noble, W. C. (1999). Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. *Veterinary dermatology*, 10(3), 163–176.

Sellers, R. S., Mortan, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J. K., Yano, B. L., et al. (2007). Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic pathology*, 35(5), 751–755.

SEN, C. K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33(3), 368–370.

Sen, C. K., & Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB journal*, 10(7), 709–720.

Shabrova, E. V., Tarnopolsky, O., Singh, A. P., Plutzky, J., Vorsa, N., & Quadro, L. (2011). Insights into the molecular mechanisms of the anti-atherogenic actions of flavonoids in normal and obese mice. *PloS one*, 6(10), e24634.

Shafran, S. D. (1990). The basis of antibiotic resistance in bacteria. *The Journal of otolaryngology*, 19(3), 158–168.

Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., et al. (2019). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 1–13.

Shin, S. M., Jeong, Y. J., Park, D. W., Ko, H., Kim, G. T., Kim, E.-H., et al. (2012). Screening for anti-diabetic effects of prescribed Korean traditional medicines. *Korean Journal of Plant Resources*, 25(6), 670–681.

Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), 1268–1273.

Simjee, S. (2011). Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin: A Report. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583.

Singh, S., Nair, V., Jain, S., & Gupta, Y. K. (2008). Evaluation of anti-inflammatory activity of plant lipids containing  $\alpha$ -linolenic acid.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–178.

Sivaraj, D., Shanmugam, S., Rajan, M., Sasidharan, S. P., Sathyanarayanan, S., Muniyandi, K., et al. (2018). Evaluation of *Aristolochia indica* L. and *Piper nigrum* L. methanol extract against centipede *Scolopendra moristans* L. using Wistar albino rats and screening of bioactive compounds by high pressure liquid chromatography: a polyherbal formulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1603–1612.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 26(2), 118–122.

Soare, J. R., Dinis, T. C., Cunha, A. P., & Almeida, L. (1997). Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free radical research*, 26(5), 469–478.

Soetan, K. O., & Aiyelaagbe, O. O. (2009). The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants-A review. *Journal of medicinal plants research*, 3(5), 324–328.

Song, Y., Manson, J. E., Buring, J. E., Sesso, H. D., & Liu, S. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and

systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(5), 376–384.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis*, 579(1–2), 200–213.

Springfield, E. P., Eagles, P. K. F., & Scott, G. (2005). Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. *Journal of ethnopharmacology*, 101(1–3), 75–83.

Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191–208.

Subramaniyan, V., Saravanan, R., Baskaran, D., & Ramalalingam, S. (2015). *In vitro* free radical scavenging and anticancer potential of *Aristolochia indica* L. against MCF-7 cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(6), 392–396.

Sukumaran, S., Kiruba, S., Mahesh, M., Nisha, S. R., Miller, P. Z., Ben, C. P., & Jeeva, S. (2011). Phytochemical constituents and antibacterial efficacy of the flowers of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(9), 735–738.

Sulyman, A. O., Akolade, J. O., Sabiu, S. A., Aladodo, R. A., & Muritala, H. F. (2016). Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots. *Journal of ethnopharmacology*, 182, 122–128.

Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), 7449–7454.

Swain, S. D., Rohn, T. T., & Quinn, M. T. (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(1), 69–83.

Szweda, P. A., Friguier, B., & Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 29–36.

Takahashi, A., Shimizu, H., Okazaki, Y., Sakaguchi, H., Taira, T., Suzuki, T., & Chiji, H. (2015). Anthocyanin-rich phytochemicals from aronia fruits inhibit visceral fat accumulation and hyperglycemia in high-fat diet-induced dietary obese rats. *Journal of oleo science*, 64(12), 1243–1250.

Takebayashi, J., Chen, J., & Tai, A. (2010). A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. In *Advanced protocols in oxidative stress II* (pp. 287–296). Springer.

Talbaoui, A., Bouyahya, A., Boury, H. E., Amzazi, S., Benjouad, A., Dakka, N., & Bakri, Y. (2016). *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *European Journal of Medicinal Plants*, 1–13.

Talbaoui, A., Jamaly, N., Idrissi, A. I., Bouksaim, M., Gmouh, S., El Moussaouiti, M., et al. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4593–4600.

Tang, W., & Eisenbrand, G. (2013). Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. *Springer Science & Business Media*.

Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(4), 200–207.

Tavafi, M. (2013). Diabetic nephropathy and antioxidants. *Journal of nephropathology*, 2(1), 20.

Tavazzi, B., Di Pierro, D., Amorini, A. M., Fazzina, G., Tuttobene, M., Giardina, B., & Lazzarino, G. (2000). Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 684–689.

Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372–1378.

Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., & Khetani, V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*, 179(3), 183–196.

Tepe, A. S., & Ozaslan, M. (2020). Anti-Alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *Industrial Crops and Products*, 145, 112069.

Terentis, A. C., Thomas, S. R., Burr, J. A., Liebler, D. C., & Stocker, R. (2002). Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circulation research*, 90(3), 333–339.

Teresa, J. D. P., Urones, J. G., & Fernandez, A. (1983). An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*. *Phytochemistry*, 22(12), 2745–2747.

Thangaraj, H. S., Adjei, O., Allen, B. W., Portaels, F., Evans, M. R. W., Banerjee, D. K., & Wansbrough-Jones, M. H. (2000). *In vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(2), 231–233.

Thomas, M. J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 16(7–8), 716–718.

Thomson, M., Alnaqeeb, M. A., Bordia, T., Al-Hassan, J. M., Afzal, M., & Ali, M. (1998). Effects of aqueous extract of onion on the liver and lung of rats. *Journal of ethnopharmacology*, 61(2), 91–99.

Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2).

Toeller, M. (1994).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(S3), 31–35.

Tomi, P., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J.-M., Costa, J., & Paolini, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 533–536.

Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (2001). Principes d'anatomie et de physiologie. *De Boeck Supérieur*.

Tripathi, B. K., & Srivastava, A. K. (2006). Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Medical science monitor*, 12(7), RA130–RA147.

Trujillo, W. A., Sorenson, W. R., Luzerne, P. L., Austad, J. W., & Sullivan, D. (2006). Determination of aristolochic acid in botanicals and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection and by liquid chromatography/mass spectrometry: single laboratory validation confirmation. *Journal of AOAC International*, 89(4), 942–959.

Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., et al. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 358(9277), 207–208.

Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606.

Usman, L. A., Hamid, A. A., Muhammad, N. O., Olawore, N. O., Edewor, T. I., & Saliu, B. K. (2010). Chemical constituents and anti-inflammatory activity of leaf essential oil of Nigerian grown. *Excli Journal*, 6.

Van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M. C., Wang, Y., & Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 51–82.

Vanhaelen, M. (1994). Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet*, 343, 174.

Vanherweghem, J.-L., Tielemans, C., Abramowicz, D., Depierreux, M., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., et al. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *The Lancet*, 341(8842), 387–391.

Vasankari, T. J., Kujala, U. M., Vasankari, T. M., Vuorimaa, T., & Ahotupa, M. (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidant defences. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(3), 509–513.

Von Morze, C., Allu, P. K., Chang, G. Y., Marco-Rius, I., Milshteyn, E., Wang, Z. J., et al. (2018). Non-invasive detection of divergent metabolic signals in insulin deficiency vs. insulin resistance *in vivo*. *Scientific reports*, 8(1), 1–12.

Vriet, C., Hennig, L., & Laloi, C. (2015). Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and molecular life sciences*, 72(7), 1261–1273.

Waghorn, G. C., Shelton, I. D., McNabb, W. C., & McCutcheon, S. N. (1994). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *The journal of agricultural science*, 123(1), 109–119.

Wallace, S. S. (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 1–14.

Walley, A. J., Blakemore, A. I., & Froguel, P. (2006). Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Human molecular genetics*, 15(suppl\_2), R124–R130.

Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505–515.

Wansi, J. D., Chiozem, D. D., Tcho, A. T., Toze, F. A. A., Devkota, K. P., Ndjakou, B. L., et al. (2010). Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from *Klainedoxa gabonensis*. *Pharmaceutical biology*, 48(10), 1124–1129.

Warda, K., Markouk, M., Bekkouche, K., Abbad, M. L. A., Romane, A., & Bouskraoui, M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(3), 101–104.

Wiert, C. (2006). Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific (pp. 1-50). *New Jersey: Humana Press. doi, 10, 978-1.*

Wikler, M. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *CLSI (NCCLS)*, 26, M7-A7.

Young, I. S., & McEneaney, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical society transactions*, 29(2), 358–362.

Yu, J. Q., Liao, Z. X., Cai, X. Q., Lei, J. C., & Zou, G. L. (2007). Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(2), 162–167.

Yuan, J.-B., Huang, Q., Ren, G., Shi, M., Chen, L., Yang, W.-L., et al. (2014). Acute and subacute toxicity of the extract of *Aristolochiae fructus* and honey-fried *Aristolochiae fructus* in rodents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b13-00736.

Zainol, M. K., Abd-Hamid, A., Yusof, S., & Muse, R. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*, 81(4), 575–581.

Zhang, H., Cifone, M. A., Murli, H., Erexson, G. L., Mecchi, M. S., & Lawlor, T. E. (2004). Application of simplified *in vitro* screening tests to detect genotoxicity of aristolochic acid. *Food and chemical toxicology*, 42(12), 2021–2028.

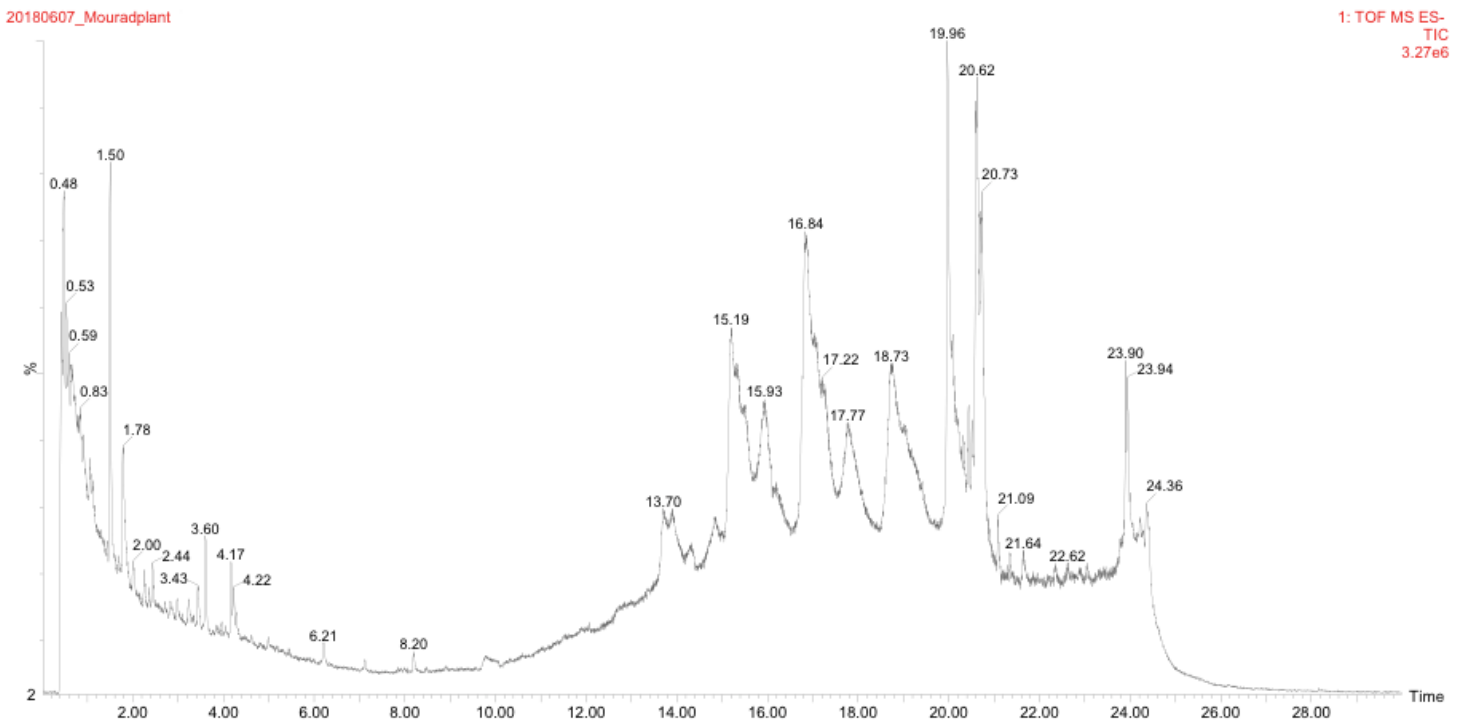
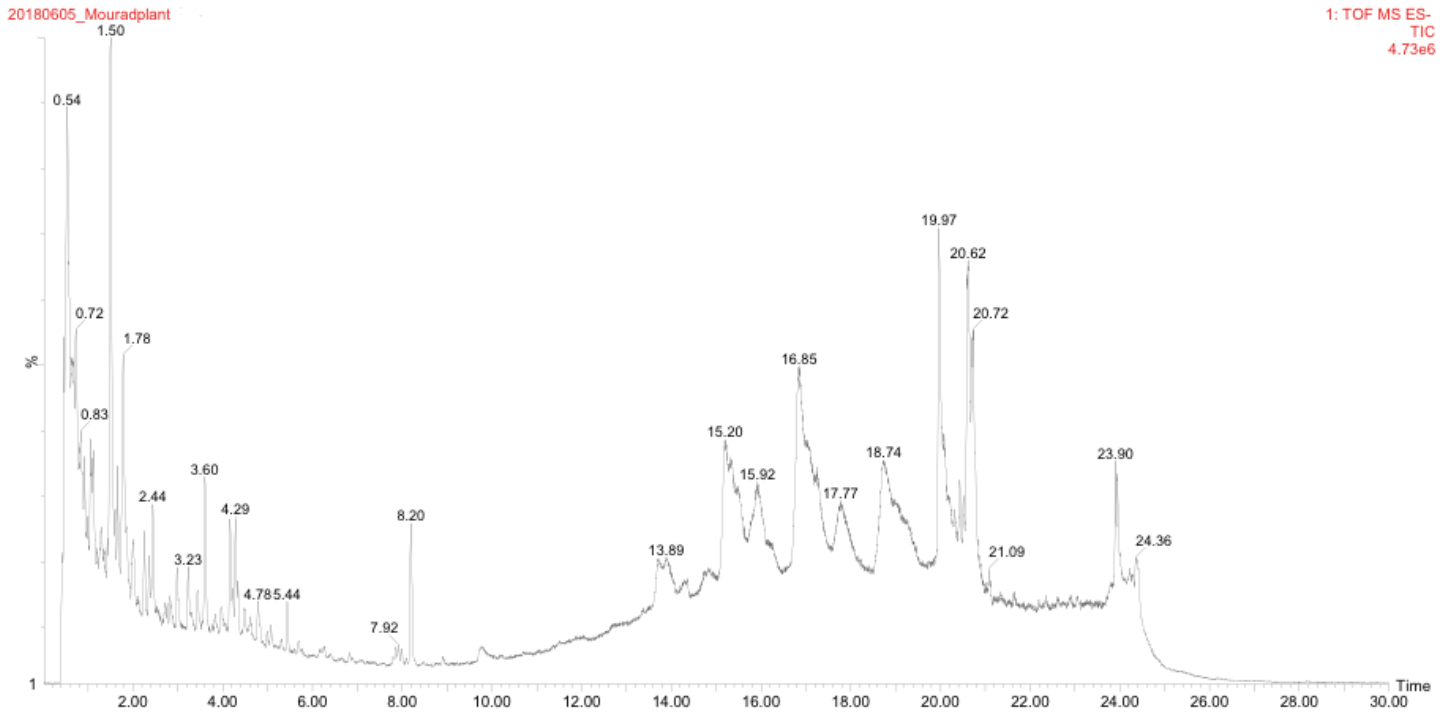
Zheng, C. J., Yoo, J.-S., Lee, T.-G., Cho, H.-Y., Kim, Y.-H., & Kim, W.-G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS letters*, 579(23), 5157–5162.

Zimmet, P., Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782–787.

Zirih, G. N., Kra, A. K. M., & Guédé-Guina, F. (2003). Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck O. Kuntze Asteraceae) «PYMI» sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*. *Revue de médecine et de pharmacopées Africaines*, 17(3), 11–19.

## ANNEXE





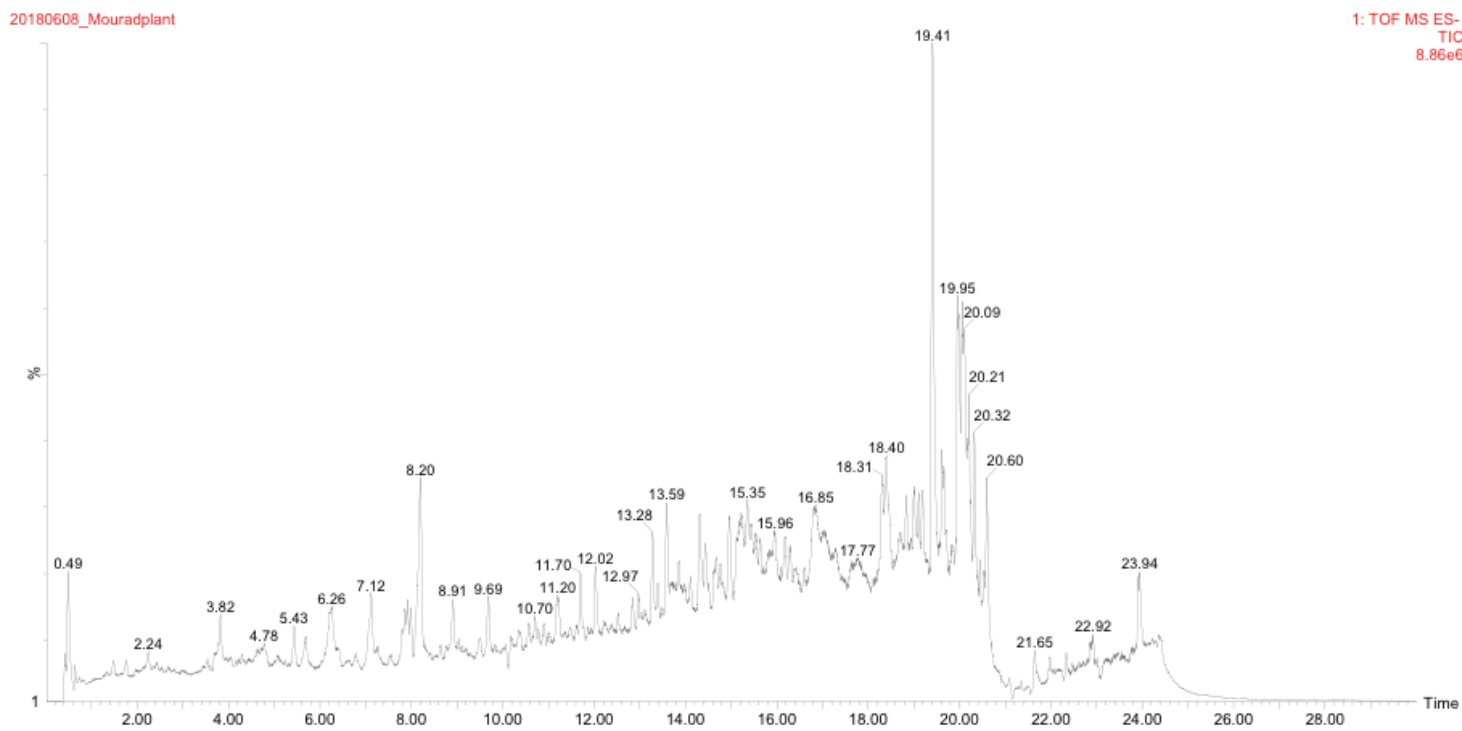


Figure 12: Profil chromatographique de la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. longa*

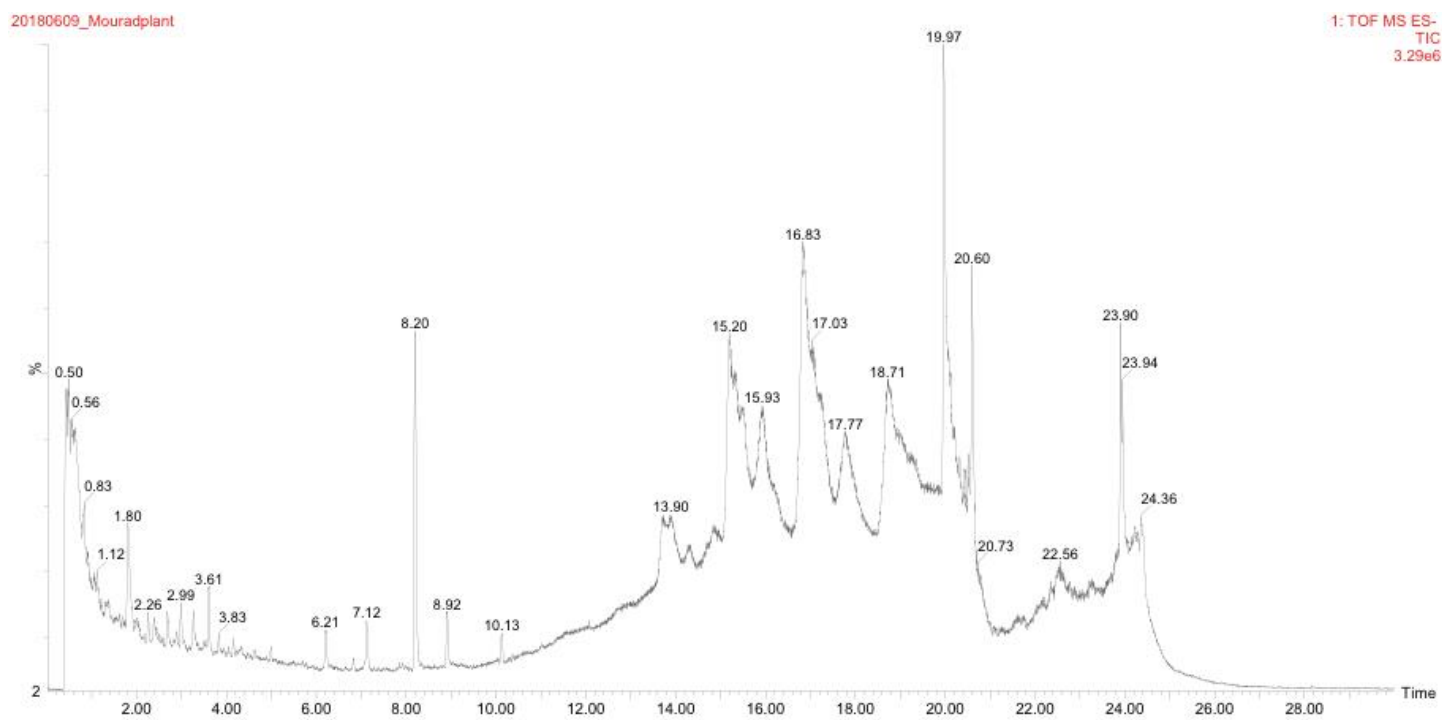


Figure 13: Profil chromatographique de l'extrait aqueux d'*A. longa*

## RESUME

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation des extraits aqueux (EA), et des fractions méthanoliques (FM), aqueuses (FA) et d'acétate d'éthyle (FAE) des racines d'*Aristolochia longa* par la justification scientifique de leur réputation médicinale, l'évaluation de leur toxicité et l'identification des composés phytochimiques susceptibles d'être responsables de leurs activités biologiques.

L'évaluation des activités antidiabétiques et antibactériennes a montré que la FAE présente les meilleurs résultats. En effet, cette fraction avait une capacité inhibitrice élevée contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase ( $CI_{50} = 1,112 \pm 0,026$  mg/mL) et une bonne action bactériostatique contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (CMI = 12,5 mg/mL). Concernant l'activité antioxydante examinée par trois méthodes (DPPH, ABTS et FRAP), elle a été caractérisée par des résultats relativement modérés. En fait, la FA avait la valeur d'inhibition des radicaux DPPH la plus élevée ( $CI_{50} = 125,40 \pm 2,40$   $\mu$ g/mL), tandis que la FM était la plus active contre le cation ABTS ( $CI_{50} = 61,58 \pm 2,15$   $\mu$ g/mL). Ce potentiel thérapeutique est clairement lié à la richesse de ces extraits en composés phénoliques révélés par l'étude phytochimique réalisée.

Nos investigations toxicologiques nous ont permis de déduire qu'un traitement oral de courte durée par un extrait aqueux des racines d'*A. longa* est dépourvu de toute toxicité systémique, et que les véritables signes de toxicité n'apparaissent qu'à partir de la troisième semaine du traitement. En conséquence, si les préparations aqueuses de ces racines sont utilisées correctement, les gens peuvent en bénéficier sans effets indésirables.

A la lumière de ces résultats, des investigations plus approfondies (études *in vivo* et essais cliniques) sur cette plante devraient être menées afin de développer de nouveaux phytomédicaments au Maroc.

**Mots-clés:** *Aristolochia longa* ; extraits ; toxicité ; étude phytochimique ; composés phénoliques ; tests biologiques.

## ABSTRACT

This thesis work is part of the contribution to the valuation of aqueous extracts (AE), and methanolic (MF), aqueous (AF) and ethyl acetate (EAF) fractions of *Aristolochia longa* roots by the scientific justification of their medicinal reputation, the evaluation of their toxicity and the identification of phytochemicals likely to be responsible for their biological activities.

Evaluation of antidiabetic and antibacterial activities showed that EAF shows the best results. Indeed, this fraction had a high inhibitory capacity against the  $\alpha$ -glucosidase enzyme ( $IC_{50} = 1,112 \pm 0,026$  mg/mL) and a good bacteriostatic action against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (MIC = 12,5 mg/mL). Regarding the antioxidant activity examined by three methods (DPPH, ABTS, and FRAP), it was characterized by moderate results. In fact, AF had the highest DPPH radical inhibition value ( $IC_{50} = 125,40 \pm 2,40$   $\mu$ g/mL), while MF was the most active against the ABTS cation ( $IC_{50} = 61,58 \pm 2,15$   $\mu$ g/mL). This therapeutic potential is clearly linked to the richness of these extracts in phenolic compounds revealed by the phytochemical study carried out.

Our toxicological investigations enabled us to deduce that a short oral treatment with an aqueous extract of *A. longa* roots is devoid of any systemic toxicity, and serious signs of toxicity do not appear until the third week of treatment. Consequently, if the aqueous preparations of these roots are used correctly, people can benefit from them without adverse effects.

In the light of these results, more in-depth investigations (*in vivo* studies and clinical trials) on this herb should be carried out in order to develop new phytomedicines in Morocco.

**Keywords:** *Aristolochia longa* ; extracts ; toxicity ; phytochemical study ; phenolic compounds ; biological tests.

**Structure de recherche:** Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique.