

THÈSE

présentée à la Faculté Sciences et Techniques de Béni Mellal pour obtenir le grade de :

Docteur

CED : Sciences et Techniques:

Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé.

Spécialité: Biologie-Physiologie

Option: Physiologie Animale - Pharmacologie

Intitulée:

**Étude de quelques activités Pharmacologiques, Biologiques,
Fonctionnelles et Comportementales des extraits de
Caralluma europaea chez l'animal**

par:

KEBBOU AAZIZ

Soutenue le **26 Decembre 2020** à 10 heure

devant la commission d'examen :

Pr. Hassan AIT MOUSE	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Président / Rapporteur
Pr. Thami HIMMI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Pr. Samira BOULBAROUD	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.P. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Pr. Khalid HABBARI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Examineur
Pr. Abderrahman CHAIT	Professeur, Université Cadi Ayyad , F.S.S.M Marrakech, Maroc	Examineur
Pr. Abdelmajid ZYAD	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni- Mellal, Maroc	Directeur de Thèse

Dédicaces

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

Je dédie cette thèse :

À la mémoire de Ma défunte mère et à mon défunt père

Vous êtes dans mon cœur par votre gentillesse, franchise, encouragement et votre insistance à toujours travailler pour arriver.

Que Dieu ait vos âmes avec les saints et les martyres.

À Ma petite famille

Ma femme Selma toujours avec et pour moi, Ghita, Kenza et Hafsa douces et aimablement en attente d'un bel avenir.

À Mon défunt frère et ami Mohamed

Tu as toujours été présente à mes côtés durant les années de mes études, tes encouragements, tes coups de main sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Tu as été et tu resteras pour moi mon deuxième père. Que Dieu tout puissant ait ton âme avec les saints et les martyres.

Ma défunte belle soeur Fatima Que Dieu tout puissant ait ton âme avec les saints et les martyres.

À Mes beaux-parents Lhajja Zhor et Lhaj Sidi Mohamed Alaoui. que dieu me les préserve.

À Mes sœurs et mes frères Fatima, Jemaa, Aicha, Nadia Mustapha, Elhouceine et Lahcen, que dieu me les préserve.

À Mes chers nièces et neveux

Mes beaux frères et belles sœurs et leurs familles.

À Ma grande famille, je citerai mon oncle Moha et tous les autres.

À Mes chers amis et amies

À Mes chers amis et amies du laboratoire pour votre soutien sans limites.

À Tous mes professeurs

À Tous ceux qui me sont chers

Et à tous ceux qui ma réussite les intéresse.

Veillez trouver dans ce travail un témoignage de ma gratitude la plus profonde et qu'il soit l'expression de mes plus sincères remerciements.

Remerciements

J'exprime mes remerciements les plus sincères à mon maitre et directeur de thèse,

Professeur Abdelmajid ZYAD, pour m'avoir chaleureusement accueillie en tant que doctorant au sein de son équipe de recherche, je le remercie pour tous les efforts qu'il a déployé pour la réalisation de cette thèse, pour l'intérêt qu'il avait toujours porté à ce travail et son suivi perpétuel au fil des années passées.

Son grand savoir et ses larges connaissances, qu'il n'a jamais hésité à partager, sa rigueur scientifique et ses qualités humaines, ses conseils et ses remarques pertinentes m'ont toujours été d'une grande aide. Je garderai toujours dans mon cœur votre générosité et votre gentillesse. Soyez assuré de mon profond respect, ma vive reconnaissance et ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à mon maitre et co-directeur de thèse,

Professeur Abderrahman CHAIT, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour son encadrement, pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe de recherche, pour ses précieux conseils, ses remarques pertinentes et ses critiques constructives en plus de son grand savoir et ses larges connaissances, qu'il n'avait d'ailleurs jamais hésité à partager. Je vous remercie pour les efforts que vous avez prodigué pour l'aboutissement de cette thèse, pour votre suivi au fil des années, votre disponibilité permanente et d'avoir cru à mes capacités. Je vous remercie également pour votre aide précieuse lors de la réalisation de mon travail de paillasse et lors de la rédaction de ce manuscrit. J'aimerais également vous dire à quel point j'ai apprécié vos qualités humaines, de respect, d'estime, de compréhension, d'écoute et d'encouragements. Je garderai toujours dans mon cœur votre générosité et votre gentillesse. Soyez assuré de mon profond respect, ma vive reconnaissance et ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à nos maitres et juges, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'être membre de jury de ce travail et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet de recherche.

Monsieur Hassan AIT MOUSE, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Président / Rapporteur ;

Monsieur Thami HIMMI, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Rapporteur ;

Madame Samira BOULBAROUD, Professeur Habilité, Faculté Polydisciplinaire, Béni Mellal, Rapporteur ;

Monsieur Khalid HABBARI, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Examineur ;

Je remercie vivement, Mme Pr **Hanane Rais** chef de service du Laboratoire d'Immunohistochimie, Département d'Anatomie Pathologique au Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad, pour sa contribution à la réalisation des coupes présentées dans ce travail. Qu'elle trouve ici avec tous les membres de son staff l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je voudrais aussi remercier mes collègues et amis du laboratoire de Neurobiologie, Pharmacologie et Comportement de la Faculté des Sciences Semlalia, pour tous leurs conseils, leur aide et leur soutien.

Mes vifs remerciements à Monsieur REGRAGUI A. pour son aide et son assistance technique côté animaux utilisés au cours de cette étude.

Enfin, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de mon travail.

FICHE PRESENTATIVE DE LA THÈSE

Nom et prénom de l'auteur : Aaziz KEBBOU

Intitulé du travail : Études de quelques activités Pharmacologiques, Biologiques et Fonctionnelles et comportementales des extraits de *Caralluma europaea* chez l'animal

Encadrant :

-Nom, prénom et grade : Abdelmajid ZYAD, PES

-Laboratoire et institution : Laboratoire d'Immuno-pharmacologie cellulaire et moléculaire, Équipe d'Oncologie expérimentale et substances naturelles, , Faculté des sciences et techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Beni-Mellal, Maroc

Co-encadrant :

-Nom, prénom et grade : Abderrahman CHAIT, PES

-Laboratoire et institution : Laboratoire de Pharmacologie, Neurobiologie, Anthropobiologie et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

Laboratoire où les travaux ont été réalisés :

-: Laboratoire de Pharmacologie, Neurobiologie, Anthropobiologie et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

- Laboratoire d'Immuno-pharmacologie cellulaire et moléculaire, Équipe d'Oncologie expérimentale et substances naturelles, Faculté des sciences et techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Beni-Mellal, Maroc.

Laboratoires et établissements avec lesquels il y a eu collaboration :

- Laboratoire d'Immunohistochimie, Département d'Anatomie Pathologique au Centre Hospitalier Universitaire Mohamed VI, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad.

Principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu et auxquelles l'auteur a contribué :

Publications :

- **Aaziz Kebbou**, Mehdi Ait Laaradia, Sara Oufquir, Ayoub Aarab, Zineb El Gabbas, Hanane Rais, Abdelmajid Zyad, Abderrahman Chait. 2019. Antioxidant Activity, AntiInflammatory and Analgesic Effects of *Caralluma europaea* (Eddaghmous) in Mice. OnLine Journal of Biological Sciences, 19(4), 272-285. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2019.272.285>
- Zineb El Gabbas, Kenza Bezza, Jawad Laadraoui, Mehdi Ait Laaradia, **Aaziz Kebbou**, Sara Oufquir, Abderrahman Boukhira, Rachida Aboufatima and Abderrahman Chait. 2019. *Salvia officinalis*, Rosmarinic and Caffeic Acids Attenuate Neuropathic Pain and Improve Function Recovery after Sciatic Nerve Chronic Constriction in Mice. Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2019, Article ID 1702378, 17 pages <https://doi.org/10.1155/2019/1702378>
- Jawad Laadroui, Aboufatima Rachida, Ouarhach Aicha, Bezza Kenza, Zineb El Gabbas, Mehdi Ait Laaradia, Fatimazahra Marhoume, **Aaziz Kebbou** & Abderrahman Chait. 2019. Behavioral and histological characterization of the effects of cigarette smoke inhalation and withdrawal in rats. Journal Toxicological & Environmental Chemistry. 101: 1-2. Pages 129-147. <https://doi.org/10.1080/02772248.2019.1628236>

Communication orale :

Aaziz Kebbou, Mehdi Ait Laaradia, Sara Oufquir, Ayoub Aarab, Zineb El Gabbas, Hanane Rais, Abdelmajid Zyad, Abderrahman Chait. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant potentials of *Caralluma europaea*. VARENA 2019. Rabat, Maroc.

Communications affichée:

Aaziz Kebbou, Mehdi Ait Laaradia, Sara Oufquir, Ayoub Aarab, Zineb El Gabbas, Hanane Rais, Abdelmajid Zyad, Abderrahman Chait. In vitro antioxidant activity and analgesic effects of *Caralluma europaea* in mice. VARENA 2019. Rabat, Maroc.

Résumé

Le présent travail s'intéresse à l'étude de quelques propriétés pharmacologiques, fonctionnelles, biologiques et comportementales d'une plante très utilisée au Maroc, *Caralluma europaea*. Il s'agit d'évaluer, en premier lieu, la toxicité et de faire des études approfondies sur l'activité antalgique, l'activité anti-inflammatoire, l'activité antidépressive, l'activité antilithiasique et l'activité hépatoprotectrice des différents extraits.

Le premier axe est consacré à une revue bibliographique sur la plante. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à l'extraction et à l'étude phytochimique des extraits utilisés ainsi qu'à l'évaluation de leur pouvoir antioxydant.

L'évaluation de l'activité analgésique des extraits de *Caralluma europaea* a montré une activité analgésique très puissante. Dans le test de contorsion, le pourcentage d'inhibition de la douleur (IPP) était de $63,60 \pm 4,24$ % pour l'extrait éthanolique (EE) (200 mg/kg, p.o.) et $65,39 \pm 3,27$ % pour l'extrait d'acétate d'éthyle (EAE). Dans le test au formol, les IPP des phases précoce et tardive étaient, respectivement, de 41 % et 73 % pour l'EAE (200 mg/kg, p.o.) et de 28 % et 75 % pour l'EE. Le test de la plaque chauffante a montré que l'EE et l'EAE ont augmenté, en fonction de la dose, la latence de réaction aux stimuli thermiques. L'EAE semble être plus puissant que l'EE. Nous avons également démontré que le prétraitement par la naloxone (inhibiteur non sélectif des récepteurs opioïdiques) n'a pas d'effet sur le pouvoir antinociceptif de ces extraits. Ainsi, le(s) mécanisme(s) d'action antinociceptive de nos extraits ne semblent pas être liés au système opioïde. D'un autre côté, nos résultats ont montré que les deux extraits utilisés dans cette étude ont entraîné la réduction de la réponse inflammatoire aiguë, similaire au Diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien).

Les résultats obtenus sur l'étude de l'activité hépatoprotectrice des extraits butanolique et éthanolique de *Caralluma europaea*, ont montré que nos extraits ont un effet protecteur du tissu hépatique.

L'étude de l'activité antilithiasique des extraits éthanolique, acétate d'éthyle, hexanique et butanolique a montré que les quatre extraits présentent une activité antilithiasique chez le rat. Cependant, l'extrait butanolique possède l'activité antilithiasique la plus élevée.

Notre investigation pharmacologique réalisée sur les extraits de *C. europaeanus* permet de conclure que, les phytoconstituants actifs de cette plante possèdent plusieurs propriétés biologiques importantes, à savoir une activité analgésique, anti-inflammatoire hépatoprotectrice, et antilithiasique. Toute fois, les études neurocomportementales sur la dépression et l'anxiété ont démontré que l'extrait total de la plante peut provoquer des états dépressifs et anxiogènes.

Mots clés : *Caralluma europaea*, étude phytochimique, toxicité aiguë, activités pharmacologiques, modèles expérimentaux, animaux.

Abstract

The present work focuses on the study of some pharmacological, functional, biological and behavioral properties of a plant widely used in Morocco, *Caralluma europaea*. The aim is to evaluate, first of all, the toxicity and to carry out in-depth studies on the analgesic activity, anti-inflammatory activity, antidepressant activity, antilithiasis activity and hepatoprotective activity of the different extracts.

The first axis is devoted to a bibliographical review on the plant. In the second axis, we are interested in the extraction and a phytochemical study of the extracts used as well as the evaluation of their antioxidant power.

The evaluation of the analgesic activity of the extracts of *Caralluma europaea* showed a very powerful analgesic activity. In the contortion test, the percentage of pain inhibition (PPI) was $63.60 \pm 4.24\%$ for the ethanolic extract (EE) (200 mg/kg, p.o.) and $65.39 \pm 3.27\%$ for the ethyl acetate extract (EAE). In the formalin test, the early and late phase PPIs were 41% and 73% for EAE (200 mg/kg, p.o.) and 28% and 75% for EE, respectively. The hot plate test showed that EE and EAE increased the latency of response to thermal stimuli in a dose-dependent manner. EAE appears to be more potent than EE. We have also shown that pre-treatment with naloxone (a non-selective opioid receptor blocker) has no effect on the antinociceptive power of these extracts. Thus, the mechanism(s) of antinociceptive action(s) of our extracts do not appear to be related to the opioid system. On the other hand, our results showed that the two extracts used in this study resulted in a reduction of the acute inflammatory response, similar to Diclofenac (non-steroidal anti-inflammatory drug).

The results obtained on the study of the hepatoprotective activity of extracts of the butanolic and ethanolic extract of *Caralluma europaea*, showed that our extracts have a protective effect on hepatic tissue.

The results obtained on the study of the hepatoprotective activity of extracts of the butanolic and ethanolic extract of *Caralluma europaea*, showed that our extracts have an hepato-protective effect.

The study of the antilithiasis activity of the ethanolic, ethyl acetate, hexane and butanol extracts showed that the four extracts show antilithiasis activity in rats, however the butanol extract has the highest antilithiasis activity.

Our pharmacological investigation carried out on extracts of *C. europaea* allows us to conclude that the active phytoconstituents of this plant have several important biological properties, namely analgesic, anti-inflammatory hepatoprotective and antilithiasis activity. However, neurobehavioural studies on depression and anxiety have shown that the total extract of the plant can cause depressive and anxiety-inducing states.

Key words: *Caralluma europaea*, phytochemical study, acute toxicity, pharmacological activities, experimental models, animals.

يهتم هذا العمل بدراسة بعض الخصائص الدوائية ، الوظيفية ، البيولوجية والسلوكية لنبات يستخدم على نطاق واسع في المغرب وهو *Caralluma europaea*. المعروف محليا بالدغموس. لقد تم تقييم ، في المقام الأول ، السمية الحادة وإجراء دراسات معمقة حول النشاط المسكن ، النشاط المضاد للالتهابات ، النشاط المضاد للاكتئاب ، النشاط المضاد للتحصي الكلوي والنشاط الوقائي للكبد لكل مستخلص.

تم تخصيص المحور الأول للمراجعة البيولوجرافية عن النبتة. في المحور الثاني ، كنا مهتمين باستخراج ودراسة كيميائية نباتية للمستخلصات المستخدمة وكذلك تقييم قوتها المضادة للأكسدة. وهكذا ، أظهر تقييم النشاط المسكن لمستخلصات *Caralluma europaea* نشاطاً مسكناً قوياً للغاية. في اختبار الالتواء ، كانت النسبة المئوية لتثبيط الألم (63.60 ± 4.24 PPI) للمستخلص الإيثانولي ((EE) 200 مجم / كجم) و 65.39 ± 3 ، 27% لمستخلص أسيتات الإيثيل (EAE). في اختبار الفورمالين ، كانت مؤشرات PPI في المرحلة المبكرة والمتأخرة 41% و 73% (200 EAE مجم / كجم) ، و 28% و 75% EE ، على التوالي. أظهر اختبار اللوح الساخن أن EE و EAE زاد ، اعتماداً على الجرعة ، زمن الاستجابة للمنبهات الحرارية. يبدو أن EAE أقوى من EA. لقد أظهرنا أيضاً أن المعالجة المسبقة بالنالوكسون (مثبطات مستقبلات أفيونية غير انتقائية) ليس لها أي تأثير على قدرة هذه المستخلصات المضادة للألم. وبالتالي ، لا يبدو أن آلية (آليات) العمل المضاد للألم لمستخلصاتنا مرتبطة بنظام المواد الأفيونية. من ناحية أخرى ، أظهرت نتائجنا أن المستخلصين المستخدمين في هذه الدراسة أسفروا عن تقليل الاستجابة الالتهابية الحادة ، على غرار عقار ديكلوفيناك (عقار مضاد للالتهاب غير ستيرويدي). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة النشاط الوقائي الكبدي لمستخلصات المستخلص البوتانولي والإيثانولي من *Caralluma europaea* أن مستخلصاتنا لها تأثير وقائي على الأنسجة الكبدية.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للتحصي لمستخلصات الإيثانول وخل الإيثيل والهكسان والبيوتانول أن المستخلصات الأربعة تظهر نشاطاً مضاداً للتحصي في الجرذان ، إلا أن مستخلص البيوتانول له أعلى نشاط مضاد للتحصي.

تسمح لنا دراستنا الدوائية التي أجريت على مستخلصات *C. europaea* في استنتاج أن المكونات النباتية النشطة لهذا النبات لها العديد من الخصائص البيولوجية الهامة ، وهي النشاط المسكن والمضاد للالتهابات والمضاد للتحصي. ومع ذلك ، فقد أظهرت الدراسات السلوكية العصبية حول الاكتئاب والقلق أن المستخلص الكلي للنبات يمكن أن يسبب حالات الاكتئاب والقلق.

الكلمات المفتاحية *Caralluma europaea* : دراسة الكيمياء النباتية ، السمية الحادة ، الأنشطة الدوائية ، النماذج التجريبية ، الحيوانات.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Chapitre 1: GENERALITES SUR LA PLANTE	5
I. Introduction	5
II. Historique	5
I.1. Systématique	5
I.2. Répartition géographique	6
I.3. Description botanique	7
I.4. Utilisations traditionnels de certaines espèces	8
I.5. Données phytochimiques	9
I.6. Données pharmacologiques	11
I.6.1. Les effets antibactériens	11
I.6.2. Les effets anticancéreux	12
I.6.3. Les effets analgésiques et anti inflammatoires	12
I.6.4. Les effets antidiabetiques	12
I.6.5. Les effets comportementaux	12
I.6.6. Essais cliniques	12
Chapitre II- Généralités sur les activités pharmacologiques et comportementales étudiés	14
I. La douleur ou la nociception	14
I.1. Définition	14
I.1.1. La composante sensori- discriminative	14
I.1.2. La composante affective-émotionnelle	15
I.1.3. La composante cognitive	15
I.1.4. La composante comportementale	15
I.2. Physiologie de la douleur	15
I.2.1. Les voies périphériques	16
I.2.2. La moelle épinière	17
I.2.3. Les Voies ascendantes	18
I.2.4. Les centres supérieurs	19
I.3. Les systèmes de contrôle de la douleur	19
I.3.1. Contrôle segmentaire : contrôle de la porte (Théorie de Melzack et wall)	20
I.3.2. Les contrôles d'origine supraspinale	21
I.4. Contrôles neurochimiques de la douleur	21
II. La dépression :	24
II.1. Données générales sur la dépression	24
III. L'anxiété	27
III.1. Définitions	27
III.2. Neurochimie de l'anxiété	27
IV. La fonction hépatique	28
IV.1. Données générales sur le foie :	28
IV.2. Les différents types de cellules hépatiques:	29
IV.2.1. Les hépatocytes	29
IV.2.2. Les cellules de Kupffer	29
IV.2.3. Les cellules d'Ito ou cellules stellaires	30
IV.2.4. Les puits cells	30

IV.3.	Les fonctions du foie :	31
IV.3.1.	Fonctions métabolique	30
IV.3.1.1.	Métabolisme glucidique :	31
IV.3.1.2.	Métabolisme des lipides :	31
IV.3.1.3.	Métabolisme de protéines :	32
IV.3.1.4.	Détoxification:	32
IV.3.1.5.	Les systèmes de protection piègeurs de radicaux libres hépatique	33
a)	Les systèmes endogènes enzymatiques	33
b)	Les systèmes endogènes non enzymatiques	34
c)	Les systèmes exogènes antioxydants	34
IV.3.2.	Hépatotoxicité du foie :	34
V.	La fonction rénale	37
V.1.	Données générale sur les Fonctions rénales :	37
V.1.1.	Structure des reins et des voies urinaires	37
V.1.2.	Fonction des néphrons : formation de l'urine:	39
V.1.2.1.	La filtration glomérulaire	39
V.1.2.2.	La réabsorption du liquide tubulaire	40
V.1.2.3.	La sécrétion tubulaire	40
V.1.3.	Fonctions des reins:	40
V.1.3.1.	Catabolisme rénal des hormones polypeptidiques :	41
V.1.3.2.	Hormones agissant sur le rein :	41
V.1.3.3.	Hormones produites par le rein :	41
V.2.	Les lithiases rénales	42
V.2.1.	La lithiase calcique	43
V.2.2.	La lithiase urique	44
V.2.3.	La lithiase phospho-ammoniac-magnésienne	44
VI.	Modèles comportementaux et fonctionnels	45
VI.1.	Les modèles d'étude de la nociception	45
VI.2.	Modèle comportemental de la dépression:	466
VI.3.	Modèles comportementaux d'anxiété	466
VI.4.	Aperçu sur les méthodes de tests de l'activité antilithiasique:	477
VI.5.	Aperçu sur les méthodes d'étude de l'activité hépatoprotectrice:	48
VI.5.1.	Modèles de lésions hépatiques intrinsèques induites par des médicaments	48
VI.5.2.	Modèles de lésions hépatiques idiosyncrasiques induites par des médicaments	49

Partie II : MATERIEL ET METHODES 51

Chapitre I: ETUDE PHYTOCHIMIQUE 52

I.	Matériel végétal	52
II.	Matériel technique	52
III.	Préparation des extraits de <i>Caralluma europaea</i> .	52
III.1.	Epuisement par l'hexane.	53
III.2.	Epuisement par l'acétate d'éthyle.	53
III.3.	Epuisement par le butanol.	53
IV.	Dosage des composés phénoliques	55
IV.1.	Dosage des polyphénols totaux	55
IV.2.	Dosage des flavonoïdes	55
IV.3.	Dosage des tanins	56
V.	Analyse par CLHP des polyphénols	56
VI.	Détermination de l'activité anti-oxydante	57

VI.1.	Test du piégeage du radical libre DPPH _____	57
VI.2.	Test du pouvoir réducteur du fer _____	58
Chapitre II: Tests biologiques et pharmacologiques et comportementaux _____		59
I.	Les animaux _____	59
II.	Le matériel végétal _____	59
III.	Toxicité aiguë _____	61
III.1.	Principe _____	61
III.2.	Animaux _____	61
III.3.	Matériel végétal _____	61
III.4.	Méthodologie _____	61
III.5.	Détermination de la DL 50 _____	62
Chapitre III : Etude de l'effet de l'extrait éthanolique sur l'activité comportementales chez la souris _____		63
I.	Anxiété _____	63
I.1.	Test de labyrinthe croisé surélevé ou Elevated Plus Maze _____	63
I.2.	Test chambre éclairée /obscur « Dark-Light Box test » _____	64
I.3.	Etude de l'activité locomotrice et l'anxiété: Test du champ ouvert "open field test" _____	65
	Description du dispositif _____	65
II.	Dépression _____	66
II.1.	Test de suspension par la queue « Tail suspension test » _____	66
II.2.	Test de la nage forcée _____	67
Chapitre IV : Evaluation des effets de quelques extraits de Caralluma europaea sur l'activité antinociceptive chez la souris _____		69
I.	Test de contorsion ou Writhing Test _____	69
	Figure: 19. Souris en pleine contorsion _____	70
II.	Test au formol ou Formalin test _____	70
III.	Test de la plaque chauffante _____	72
Chapitre V : Evaluation des effets des extraits de Caralluma europaea sur l'activité antiinflammatoire chez la souris _____		74
Chapitre VI : Evaluation des effets des extraits de Caralluma europaea sur l'activité hepatoprotectrice chez la souris _____		76
I.	Principe _____	76
II.	Protocole expérimental : _____	76
II.1.	Induction de la lésion hépatique : _____	76
II.2.	Répartition des animaux _____	76
III.	Le suivi de la variation journalière du poids corporel des animaux _____	77
IV.	Etude biochimique _____	77
V.	Etude histopathologique _____	78
V.1.	Le sacrifice et perfusion des animaux _____	78
V.2.	Les étapes de l'étude histologique _____	78
V.2.1.	Macroscopie _____	79
V.2.2.	Imprégnation _____	79
V.2.3.	Inclusion _____	79
V.2.4.	Microtomie _____	80
V.2.5.	Coloration classique des organes étudiés à l'hématéine et à l'éosine _____	80
Chapitre VII : Evaluation des effets des extraits de Caralluma europaea sur l'activité antilithiasiques chez la souris _____		82

I.	Protocole expérimental	82
II.	Suivi du poids corporel des rats au cours de l'expérience	82
III.	Dosage sérique en quelques éléments	83
IV.	Etude histologique du rein	84
V.	Etudes statistiques	84
Partie III : RESULTATS		845
I.	Résultats de l'étude phytochimique des extraits de <i>Caralluma europaea</i>	85
I.1.	Résultat de l'extraction	85
I.2.	Dosage colorimétrique des composés phénoliques	85
I.3.	Profil CLHP des composés phénoliques des extraits de <i>C. europaea</i>	86
I.4.	Etude de l'activité antioxydante	93
I.4.1.	Test du piégeage du radical libre DPPH	93
I.4.2.	Test du pouvoir réducteur du fer	93
I.5.	La toxicité aigue	94
II.	Etude des effets neurocomportementaux de l'extrait éthanolique de <i>Caralluma europaea</i> chez la souris.	95
II.1.	Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. europaea</i> sur l'anxiété	95
II.1.1.	Test du champ ouvert «Open Field»	95
II.1.2.	Test chambre éclairée /obscur «Dark-Light Box»	96
II.1.3.	Test labyrinthe en croix surélevé	97
II.2.	Effet de l'extrait éthanolique de <i>Caralluma europaea</i> sur la dépression	98
II.2.1.	Test suspension par la queue	98
II.2.2.	Test de la nage forcée	98
III.	Étude de l'activité anti nociceptive des extraits de <i>C. europaea</i> .	100
III.1.	Test de contorsion induite par l'acide acétique	100
III.2.	Test au formol	100
III.3.	Test de la plaque chauffante	102
IV.	Étude de l'activité antiinflammatoire des extraits de <i>Caralluma europaea</i> .	104
V.	Effet hépatoprotecteur de <i>Caralluma europaea</i>	106
V.1.	Les effets Morphologiques de l'induction de l'hépatotoxicité chez les rats.	106
V.2.	Variation journalière du poids corporel chez les animaux traités par le CCl4 et les extraits de <i>Caralluma europaea</i> :	107
V.3.	Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques	107
V.4.	Résultats de l'étude histologique :	108
VI.	Etude de l'activité anti-lithiasique de <i>Caralluma europaea</i>	110
VI.1.	Variation du poids corporel des rats	110
VI.2.	Analyse biochimiques des marqueurs de la fonction rénale	112
VI.3.	Analyse histologique du rein	112
Partie IV : DISCUSSIONS		116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		131

Liste des figures

Figure 1 : Image d'une tige avec boutons florales au sommet latéral de la tige de <i>C.europaea</i>	7
Figure 2 : Image d'une tige avec fleur sommet latéral de la tige de <i>C.europaea</i> montrant les dimensions de la plante et les fleurs.....	8
Figure 3 : Image d'une tige avec follicule au sommet latéral de la tige de <i>C.europaea</i>	8
Figure 4 : Exemple de structure chimique des glycosides pregnane (Al-Massarani et <i>al.</i> , 2012).....	9
Figure 5 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (Meunier et <i>al.</i> , 2004).....	16
Figure 6 : Transduction nociceptive.....	17
Figure 7: Les voies ascendantes : les neurones de la corne dorsale se projettent, via le tractus spinothalamique, vers le thalamus et le cortex primaire somesthésique.....	18
Figure 8 : Théorie de la porte 'gate control' (D'après Payen et <i>al.</i> , 2001).....	20
Figure 9 : Anatomie de foie : (A) la position du foie dans le corps (Netter, 2011). (B) le foie, les voies biliaires et pancréas (Ciaccio et Castaing, 2015).....	29
Figure 10 :L'ultrastructure du parenchyme hépatique.....	30
Figure 11: Schéma générale du mécanisme aboutissant à une hépatotoxicité (Savary, 2014) :.....	36
Figure 12 : Face antérieure du rein droit coupé sur plusieurs plans, montrant le parenchyme et le pelvis rénal (Netter., 2011).....	37
Figure 13 : Schéma du néphron et tubule rénale (Netter, 2011).....	38
Figure 14 : Extraction par macération.....	53
Figure 15 : Schéma du protocole expérimental d'extraction de la matière sèche.....	54
Figure 16 : Montage de récupération de l'extrait sec par l'évaporateur rotatif.....	54
Figure 17 : Dispositif expérimental du labyrinthe en croix surélevée.....	64
Figure 18 : Le dispositif de la chambre éclairée-obscur (Dark-light box).....	65
Figure 19 : Le dispositif du champ ouvert "open field"......	66
Figure 20 : Le dispositif du test de suspension par la queue « Tail suspension test ».....	67
Figure 21 : Le dispositif du test de la nage forcée.....	68
Figure 22 : Souris en pleine contorsion.....	70
Figure 23 : Souris lèche la patte injectée par le formol.....	72
Figure 24 : Souris en plein du test de la plaque chauffante.....	73
Figure 25 : Application locale de xylène pure.....	75
Figure 26 : Schéma du protocole expérimental utilisé pour évaluer les effets des extraits de <i>Caralluma europaea</i> sur les lésions hépatiques causées par le CCl4 chez le rat.....	76
Figure 27 : Etapes de la réalisation des coupes histologiques.....	80
Figure 28 : Dispositif de micro-imagerie numérique ; pour la lecture des lames et la prise de photos.....	81
Figure 29 : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait éthanolique de <i>Caralluma europaea</i>	91
Figure 30 : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait Hexanique de <i>Caralluma europaea</i>	91
Figure 31 : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait d'Acétate d'éthyle de <i>Caralluma europaea</i>	92
Figure 32 : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait Butanolique de <i>Caralluma europaea</i>	92

Figure 33: Effet de l'extrait éthanolique de <i>C.europaea</i> sur le comportement de la souris (A. Le nombre total de lignes centrales traversées (LCT), B. Le nombre total de lignes périphériques traversées (LPT), C. Le Temps d'immobilité et D. le nombre de redressements) dans le test de l'exploration champs libre.....	96
Figure 34: Effet de l'extrait éthanolique de <i>Caralluma europaeas</i> sur les paramètres comportementaux relevés au test de la chambre claire /obscure (A.le nombre de transition. B.temps passé dans la chambre.....	97
Figure 35: Effet de l'extrait éthanolique de <i>C.europaea</i> sur le comportement de la souris (A. Le temps passé dans les bras fermés, B. Le nombre total de transition) dans Test labyrinthe en croix surélevé.	98
Figure 36: Effet de l'administration par voie orale de l'extrait éthanolique de <i>C.europaea</i> sur le temps d'immobilité au A. test de la nage forcée et B. test de suspension par la queue chez les souris.....	99
Figure 37 : Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de <i>Caralluma europaea</i> sur la réponse nociceptive des souris dans le test de la plaque chauffante.....	103
Figure 38: Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de <i>Caralluma europaea</i> sur la réponse nociceptive des souris prétraités par le Naloxone dans le test de la plaque chauffante. ...	103
Figure 39: Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de <i>Caralluma europaea</i> sur la réponse nociceptive des souris dans le test de la plaque chauffante.....	104
Figure 40: Coupes histopathologiques montrant l'œdème de l'oreille induit par le traitement au xylène.	105
Figure 41: Image des rats témoins (positif et négatif)	106
Figure 42: Image illustre la différence des urines entre le témoin positif et négatif.....	106
Figure 43: Variation de différence du poids corporel après administration de CCl4 et les extraits de <i>Caralluma europaea</i> chez les rats.	107
Figure 44: Effets de l'administration de CCl4 et des extraits éthanolique et butanolique de la plante sur le taux des transaminases hépatiques. (A : ASAT, B : ALAT)	108
Figure 45: Images du foie entier des rats : les lésions hépatiques, A : rat témoin négatif, B : rat traité par l'extrait éthanolique, C : rat témoin positif, D : rat traité par l'extrait butanolique.....	109
Figure 46: Lésions tissulaires du foie des rats A : Témoin négatif, B : Rat traité par l'extrait éthanolique, C : Témoin positif, D : Rat traité par l'extrait butanolique. H : Hépatocyte ; DV : Dégénérescence vacuolaire.....	110
Figure 47: Variation du poids corporel des rats après administration de l'éthylène glycol et traitement par les extraits de <i>C. europaea</i>	111
Figure 48: Taux sériques d'urée (A) et de la créatinine (B) Valeurs exprimées en Moyenne ± écart type pour 6 animaux dans chaque groupe (n=6). Les valeurs sont significativement différentes comparées aux témoins négatifs quand *: p < 0,05 ; **: p < 0,01 ; ***: p < 0,001.....	112
Figure 49: Coupes histologiques du rein observées au microscope optique.....	113
Figure 50: Coupes histologiques du rein observées au microscope optique (×100). Les flèches indiquent les formations cristallines implantées dans le rein.....	115

Liste des tableaux

Tableau 1: Résumé des Tests pharmacologiques et comportementaux par le type d'animaux utilisés et l'extrait de plante évalué	60
Tableau 2: Rendements de l'extraction par macération de la matière sèche de <i>Caralluma europaea</i>	85
Tableau 3: Teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tannins des extraits de <i>Caralluma europaea</i> (moyenne ± SEM).....	86
Tableau 4: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait éthanolique de <i>Caralluma europaea</i> allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.	87
Tableau 5: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait Hexanique de <i>Caralluma europaea</i> allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.	88
Tableau 6: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait d'Acétate d'éthyle de <i>Caralluma europaea</i> allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.	89
Tableau 7: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait Butanolique de <i>Caralluma europaea</i> allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.	90
Tableau 8: Les valeurs de CI50 (µg / ml) des extraits de <i>Caralluma europaea</i> comparé aux antioxydants synthétiques (acide ascorbique, quercétine et BHT).	94
Tableau 9: Les valeurs des DL 50 (g / kg) des extraits de <i>Caralluma europaea</i>	94
Tableau 10 : Résultats de la réponse nociceptive au test de contorsions en nombre contorsion et en Pourcentage d'inhibition d.	100
Tableau 11: Effet des extraits de <i>Caralluma europaea</i> sur la sensibilité nociceptive au test au formol.	102
Tableau 12 : Les intensités des lésions hépatiques présentes chez les rats (-):nulle (+):peu modéré (++) :modéré (+++) :élevé.....	110
Tableau 13 : Taux des altérations histologiques observées au niveau des reins des groupes témoins et des groupes traités par les extraits éthanolique, hexanique et butanolique de <i>C. europaea</i>	114
Tableau 14: Taux des cristaux d'oxalate de calcium observées au niveau des reins des groupes témoins et des groupes traités par les extraits éthanolique, hexanique et butanolique de <i>C. europaea</i>	114

Liste des abréviations

ALAT : Alanine amino-transférase

ANF: Anaphraline

ASA : Acide Acethyl Salicylique

ASAT : Aspartate amino-transférase

BHT: Butyl hydroxy-toluène

BZP: Diazepam

C.L.H.P. : Chromatographie liquide haute performance

CA : Chlorure d'Ammonium

CAT : Catalase

CaOx : Oxalate de Calcium

CCl4 : Tétrachlorure de carbone

CAPM : Centre Anti-Poison du Maroc

DL 50 : Dose Létale 50

DI 50 : Dose Inhibitrice 50

DO: Densité Optique

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl

DV : dégénérescence vacuolaire

EAC: équivalent de catéchine

EAG: équivalent d'acide gallique

EE: Extrait Ethanolique

EAE: Extrait d'Acétate d'Ethyle

EH: Extrait Hexanique

EB: Extrait Butanolique

EG : Ethylène Glycol

ERO: Espèces Réactifs de l'Oxygène

Guss. N.E.Br: Giovanni Gussone et NicholasEdward Brown

IASP : International Association for the Study of Pain

ip : intra-péritonéal

Mor: Morphine

MS: matière sèche

NAFLD : Foie gras non alcoolique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PMA : Plantes Médicinales et Aromatiques

p.o: Par voie orale

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La phytothérapie est la base de la médecine traditionnelle qui est une technique de soins fondée sur l'utilisation des extraits des plantes et ses principes actifs pour venir à bout des causes et symptômes de diverses maladies (Gayet, 2013).

Depuis longtemps, les plantes occupent une place très importante dans les arts culinaires et en médecine traditionnelle. Depuis son apparition sur terre, l'Homme s'est intéressé aux plantes qu'il avait à sa disposition pour se nourrir et pour se soigner et lutter contre les maladies et les épidémies. Dans toutes les civilisations anciennes, des traces de cette utilisation de phytothérapie ont été trouvées.

Avec le développement de la médecine moderne, il y a eu un délaissement des plantes médicinales en faveur d'une médication synthétique.

Cependant, en raison de plusieurs problèmes qui sont essentiellement d'ordre économique et sanitaire liés en particulier aux effets secondaires occasionnés par les composés chimiques, nous assistons à un retour en force vers tout ce qui est naturel, et en particulier vers l'utilisation des plantes médicinales pour la nourriture et pour les soins primaires.

Ainsi les plantes médicinales ont fait leurs preuves en tant que source de composés actifs ayant des applications thérapeutiques et, à l'heure actuelle, elles constituent une importante collection pour la découverte de nouvelles pistes de médicaments.

En effet, selon les statistiques de 2003 de l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale se réfèrent à ces plantes pour se soigner et se nourrir (Fleurentin et Pelt, 1990). Aussi, elle recommande aux pays en voie de développement d'une part d'initier des programmes concernant l'identification, la préparation, la culture et la conservation des plantes médicinales et d'autre part, d'évaluer la qualité et l'efficacité de ces remèdes à l'aide des techniques modernes.

Dans notre société marocaine, la population a l'habitude de l'automédication familiale, modeste et moins coûteuse qui est basée sur les connaissances de nos ancêtres et des herboristes. Ces connaissances sur les usages thérapeutiques des plantes et sur leurs toxicités sont accumulées au cours des siècles et même des millénaires. Plusieurs études montrent que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaire d'une fraction importante de la population marocaine. Ceci est dû au fait que le Maroc est le second pays biologiquement diversifié du bassin méditerranéen. Il contient au moins 600 plantes médicinales (Rejdali, 1996), dont la population marocaine n'utilise que quelques-unes dans la phytothérapie.

INTRODUCTION GENERALE

Les espèces naturelles au Maroc connaissent actuellement une dégradation très intense et très poussée ; à cause de l'exploitation intensive de ces espèces pour des besoins médicaux.

En effet, la quasi-totalité des espèces médicinales utilisées au Maroc proviennent de sources sauvages, les cultures de plantes médicinales demeurant relativement limitées, c'est ainsi que, l'exploitation de ces espèces au Maroc est loin d'être rationnelle.

Par exemple les résultats de l'enquête ethno-pharmacologique et ethnobotanique sur les plantes médicinales dans le Haut Atlas central du Maroc faite par Abderrazak El Alami et Abderrahman Chait (2017) et plus précisément dans la région qui couvre tout le versant nord de l'Atlas d'Azilal, qui s'étend entre la ville de Beni Mellal et la ville de Demnat, 172 espèces végétales sont utilisées en phytothérapie réparties en 81 plantes médicinales spontanées, 40 plantes cultivées et 51 plantes commerciales. Les habitants obtiennent les plantes médicinales par récolte dans la région (espèces spontanées et cultivées) ou par achat chez les droguistes et les herboristes. Les parties utilisées des plantes spontanées vivaces sont récoltées durant toute l'année, au contraire, les fruits et les fleurs des plantes vivaces et les plantes annuelles sont récoltés pendant une seule période de l'année. Il faut noter que certaines plantes sont fortement recherchées par les habitants pour l'usage thérapeutique et le commerce.

L'analyse de la bibliographie médicinale marocaine montre que les données relatives aux plantes médicinales régionales sont très fragmentaires et dispersées (Bammi et Douira, 2002 ; Benkhnigue et *al.*, 2011).

De même, le savoir populaire est détenu actuellement par peu de personnes parmi lesquelles on trouve un taux d'analphabétisme élevé (Hseini et Kahouadji, 2007). Les jeunes personnes n'ont pas de connaissances suffisantes sur les usages thérapeutiques des plantes médicinales, ce sont les femmes, et surtout celles qui sont mariées, qui utilisent plus ces plantes pour soigner leurs familles (El Alami et *al.*, 2017).

Ainsi, il est devenu nécessaire de sauvegarder et de traduire ce savoir-faire populaire en savoir scientifique afin de l'utiliser d'une manière rationnelle.

C'est dans cette optique qu'on a opté pour une étude pharmacologique, fonctionnelle et comportementale des extraits de l'espèce *Caralluma europaea* (Guss.) N.E.Br (Al-Massarani, 2011) ou *Apteranthes europaea* (Guss.) (s.l.) (Plowes, 1995)

Au Maroc, Le genre *Caralluma* est vraisemblablement représenté par 5 espèces dont l'espèce *Caralluma europaea* utilisée en médecine traditionnelle contre des affections métabolique (diabète), respiratoire (asthme) et gynécologique (kystes ovariens) (Daoudi et *al.*, 2015 ; Lakhdar, 2015). Aussi, des études sur cette espèce ont permis d'isoler ses composés et ont mis

INTRODUCTION GENERALE

en exerçant ses potentielles activités biologiques (Formisano *et al.*, 2009; Meve et Heneidak, 2005; Zito *et al.*, 2010). Dans ce sens, quelques espèces appartenant au même genre ont montré des activités de type anxiolytique (Rajendran *et al.*, 2014), des effets bénéfiques sur le taux de signaux circulants régulant le comportement alimentaire (Kuriyan *et al.*, 2007), analgésique et anti-inflammatoire (Ramesh *et al.*, 1999). Bon nombre de ces effets étant attribué aux prégnantes glycosides que renferment de nombreux taxons de ce genre.

Malgré cela, le *Caralluma europaea* reste très peu étudié sur le plan scientifique.

L'objectif de ce travail est de faire une étude aussi large que possible sur quelques activités pharmacologiques, biologiques, fonctionnelles et comportementales de cette plante. Le choix de ces activités nous est dicté par les différents usages de cette plante par les populations des différentes régions du Maroc. Il s'agit, dans cette étude, de vérifier les quelques propriétés et usages qui lui sont attribués par une frange importante de la population marocaine.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la toxicité afin d'évaluer les degrés de toxicité que peut présenter cette plante. Le choix de l'étude de l'activité antalgique nous est dicté par le fait que cette plante est largement utilisée pour traiter certaines douleurs comme les douleurs viscérales et celles provoquées par les règles chez la femme. Le choix de l'étude des activités anti dépressive et anxiolytique repose sur le fait que cette plante est très utilisée par les femmes au moment de la ménopause afin de soulager quelques symptômes de cette dernière comme les survenues d'épisodes de dépression et de mélancolie, bouffées de chaleurs...

L'étude de l'activité hépatoprotectrice nous est dictée par la réputation qu'a cette plante, au sein de la population marocaine, dans les traitements des différentes atteintes hépatiques et dans les traitements des différentes formes de kystes. Selon plusieurs herboristes, cette plante est préconisée également dans le traitement des calculs rénaux, une partie de ce travail consiste à vérifier cette activité sur la lithiase urinaire induite chez les animaux de laboratoire.

Ce présent travail constitue une contribution à l'étude de certaines propriétés pharmacologiques des extraits de *Caralluma europaea* à l'aide de modèles expérimentaux chez l'animal. Avant d'entamer notre investigation pharmacologique, nous avons réalisé au préalable une étude botanique suivie d'une étude phytochimique et enfin une étude de la toxicité aiguë des différents extraits testés.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à donner un inventaire botanique de l'espèce étudiée. Cette étude a pour but de définir d'une façon appropriée la plante afin d'éviter toute confusion entre autres espèces. Après avoir donné un aperçu systématique de

INTRODUCTION GENERALE

l'espèce, nous avons relaté les différentes utilisations traditionnelles et les propriétés pharmacologiques de l'espèce de *Caralluma europaea*. Cet ensemble d'informations va nous servir de base pour nous guider dans le choix du profil pharmacologique que nous allons étudier.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de la composition chimique et les propriétés antioxydantes de chaque extrait de la plante étudiée. Cette partie va nous permettre d'avoir une idée générale sur la nature des différents constituants chimiques et propriétés susceptibles d'être responsables des activités pharmacologiques testées.

La troisième partie porte sur l'étude de la toxicité aigüe et la détermination de la dose létale 50 (DL50) des extraits testés.

Enfin dans la quatrième partie, nous avons tenté de mettre en évidence à l'aide d'une série de tests *in vivo* chez l'animal, quelques activités pharmacologiques des extraits de *C. europaea*. Nous nous sommes intéressés à étudier l'effet des extraits (éthanolique et acétate d'éthyle) de cette espèce sur la sensibilité nociceptive chez l'animal à l'aide de trois modèles spécifiques d'étude de la douleur et de l'analgésie. Ainsi, le choix a été porté sur ces trois modèles pour étudier l'effet des extraits testés sur la douleur provoquée par des stimuli variés, notamment chimiques et thermiques. Ces différents stimuli sont à l'origine de douleurs, phasiques, toniques et viscérales représentées respectivement par le test de la plaque chauffante, test au formol et test de contorsions. En outre, les mécanismes neuronaux impliqués dans ces tests sont variés et pourraient donner des indications sur la nature de l'analgésie : périphérique ou centrale et le mode d'action des différents extraits.

Dans un autre volet, nous avons testé l'effet de l'extrait total de *C. europaea* dans trois modèles comportementaux spécifiques pour l'étude de l'anxiété : test labyrinthe en croix surélevé, test de la chambre claire/obscur, et test de l'exploration libre.

Pour l'étude de la dépression nous avons utilisé le test de suspension par la queue et test de la nage forcée. Ces modèles sont largement utilisés pour mettre en évidence les deux activités : anxiolytique et antidépressive chez l'animal.

D'autre part et afin de confirmer ou d'infirmer la réputation hépatoprotectrice de notre plante, nous avons évalué l'activité hépatoprotectrice des extraits butanolique et éthanolique de *Caralluma europaea* contre une intoxication chronique induite par le CCl₄ chez les rats.

Enfin, nous nous sommes intéressés à tester l'effet des extraits de *Caralluma europaea* (éthanolique, acétate d'éthyle, hexanique et butanolique) sur la lithiase rénale. Le modèle expérimental adopté étant l'induction de la lithiase rénale chez le rat par ingestion de

INTRODUCTION GENERALE

l'éthylène glycol (70%) et le chlorure d'ammonium (30%). Ce modèle est largement utilisé pour mettre en évidence l'activité anti-lithiasique chez l'animal.

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: GENERALITES SUR LA PLANTE

I. Introduction

Le genre *Caralluma* R.Br., étymologiquement dérivé du mot arabe « *qarh al luhum* » qui signifie plaie charnelle, abcès, dû à l'odeur putride de certains taxons, est un genre constitué d'espèces xérophytes dont le nombre est estimé à 330 espèces (Bruyns et al., 2010). C'est un genre qu'on retrouve dans des régions arides ou semi-arides de l'Asie tropicale, une partie du pourtour méditerranéen (péninsule ibérique), au proche orient et en Afrique centrale, orientale et au Maghreb (Albers et Meve, 2002).

Le genre *Caralluma* R.Br. est aussi caractérisé par sa richesse en pregnane glycosides, de noyau stéroïde aglycone, des flavones et divers esters (Adnan et al., 2014; Al-Massarani, 2011), molécules qui seraient à l'origine de ses nombreux effets pharmacologiques et l'usage de bon nombre de taxons en ethnobotanique.

II. Historique

Bien qu'il n'y ait aucun doute sur le fait que les stapéliées aient toujours été connues en Afrique australe aussi longtemps qu'ont eu noté la présence humaine dans cette région, leur présence fut pour la première fois notifiée par des voyageurs occidentaux en 1624 quand Justus Huernius découvrit une espèce de stapéliée connue aujourd'hui sous le nom de *Orbea variegata* (Bruyns, 2005). De plus, le botaniste danois P. Schoesboe fut le premier à rapporter la présence d'un autre stapéliée au Maroc entre 1791 et 1793 qui, plus tard, fut reconnu comme étant *Caralluma europaea*. La même espèce fut découverte en 1822 en Espagne par Mariano Lagasca puis par Giovanni Gussone en 1828 d'où la nomenclature *Caralluma europaea* (Guss.) (Bruyns 2005).

I.1. Systématique

Le genre *Caralluma* appartient au superordre des Gentiananae, ordre des Gentianales, de la classe Magnoliopsida et à la sous-classe Asteridae (Adnan et al. 2014) et fait partie du plus large genre parmi les stapéliées. Il appartient à la famille des Apocynaceae qui inclue entre autres la sous-famille des Asclepiadoideae, et représente la septième plus grande famille chez les angiospermes et regroupant plus de 424 genres (Bruyns, 2005).

Les taxons de ce genre partagent des caractéristiques morphologiques similaires. En effet, les plantes *Caralluma* sont dressées, rampantes, leurs tiges sont succulentes, tétragones, dentées le long de la marge avec des épines douces dans les encoches, elles montrent des branches

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

avec des herbes d'environ 15-45 cm jusqu'à 1 m de hauteur avec la tige comportant des rainures. Les épines qui couvrent la tige coudée font office de feuilles (Adnan et al. 2014).

La couronne externe possède 5 segments bifides au niveau interne tandis que la couronne interne est de 5 segments linéaires posés sur les anthères. La colonne staminale est courte, provenant de la base de la corolle et les anthères sont sans appendices (Al-Massarani, 2011). L'organisation florale ainsi que sa morphologie est un caractère de discrimination intraspécifique (Audissou, 2005).

De plus, l'une des particularités de ce genre est sa capacité à s'adapter dans des conditions de climats extrêmes, il réalise pour ce faire une régulation fine de la transpiration via une réduction de la surface foliaire, la diminution de la vitesse d'évaporation, en plus de la constitution de réserve d'eau à l'intérieur des tissus (Masrahi *et al.*, 2012). Ce genre est de ce fait rangé parmi les plantes à métabolisme CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Ce caractère, comme nous le verrons plus tard dans la partie extraction, est à prendre en compte dans les phases de prétraitement (séchage) de la plante.

Position Systématique

Classe : Equisetopsida C. Agardh

Ordre : Gentianales. Juss. Ex Bercht. & J. Presl

Famille : Apocynaceae. Juss.

Sous-famille : Asclepiadoideae. R. Br

Tribu : Ceropegieae. Decne

Sous-tribu : Stapeliinae. G. Don (Meve et Heneidak 2005)
(Endress, Liede-Schumann, et Meve 2014)

Genre : *Apteranthes*. J.C. Mikan ou *Caralluma*. R.Br.

Espèce : *Apteranthes europaea* (Guss.) (s.l.) (Plowes, 1995)
ou *Caralluma europaea* (Guss.) N.E.Br (Al-Massarani, 2011)

Nom vernaculaire Dialecte marocain : Eddaghmous ou Iloulagane par région.

Nomenclature française : Doigt de dieu.

I.2. Répartition géographique

Alors que tous les autres grands genres de Stapéliées sont confinés au continent africain et le sud de la péninsule arabe, la répartition d'autres espèces s'étend bien au-delà de cette région. La plupart des espèces se trouvent dans les régions tropicales de l'hémisphère nord. Ce genre est réparti du Grand Canaria (Îles Canaries) en occident à la région centrale du

Myanmar (Asie) en orient et aussi au nord à 38° N, (dans le sud de l'Espagne) en Tanzanie centrale (6° S). Malgré sa vaste distribution, *Caralluma* est aussi diversifié dans la plupart des régions où d'autres Stapéliées survivent et la majorité de ces espèces (plus de 30 espèces) se trouvent dans des régions de la corne de l'Afrique et le sud de la péninsule arabique. Diverses espèces de *Caralluma* se retrouvent dans le sous-continent indien (notamment le Myanmar et Népal), où 14 espèces sont connues (Bruyns et al., 2010).

I.3. Description botanique

Les plantes constituant le genre *Caralluma* R.Br. Sont vivaces, avec présence ou absence de petites feuilles succulentes rarement charnues. Elles se trouvent sous forme de branches tétraogonales dentées le long de la marge avec des épines douces. La tige est dressée, ramifiée et généralement tétraogone de hauteur 15 à 25 cm. Les fleurs, assez petites sont solitaires terminées au sommet des rameaux, pédicellées, pendantes, d'un rouge sombre ou violacé en fonction de l'espèce (Al-Massarani, 2011; Lemaire, 1889), les fruits sont des follicules cylindriques, allongés, divergents et graines aigrettées (Voir figure.1,2, et 3).

De plus, la succulence des taxons constituant ce genre ainsi que leurs morphologies font qu'on les intègre dans un groupe nommé les Stapéliées car ils sont capables de stocker dans leurs tissus des réserves de « suc » pour faire face aux longues périodes de sécheresse. Ce qui traduit cette aptitude à s'adapter aux conditions climatiques rudes (Masrahi et al., 2012).



Figure 1 : Image d'une tige avec boutons florales au sommet latéral de la tige de *C.europaea*



Figure 2:Image d'une tige avec fleur au sommet latéral de la tige de *C.europaea* montrant les dimensions de la plante et les fleurs



Figure 3:Image d'une tige avec follicule au sommet latéral de la tige de *C.europaea*.

I.4. Utilisations traditionnelles de certaines espèces

L'usage séculaire des plantes comme remèdes dans toutes les sociétés humaines n'est plus à démontrer. Ces usages sont basés sur des connaissances empiriques aussi bien des ancêtres que des herboristes. De nombreuses espèces de *Caralluma* sont connues pour leurs vertus médicinales. Adnan et *al.*,(2014)ont, de ce fait, recensé plus de 24 espèces réputées pour leurs effets divers. Nous nous limitons à citer celles qui nous semblent les plus documentées.

Parmi les espèces comestibles, on trouve le jus de *Caralluma quadrangula* extrait de la tige, ajouté à du lait frais le tout consommé comme agent tonique par certaines tribus d'Inde(Dutt et *al.*, 2011).C'est aussi le cas pour *Caralluma adscendens* consommée par des tribus de l'Andhra Pradesh en Inde(Tambe et *al.*, 2010). *Caralluma adscendens* est de même connue pour ses effets supprimeurs de la faim et ses effets toniques. (Kuriyan et *al.*, 2007).

Caralluma fimbriata est une espèce connue pour ses effets sur le poids corporel et est même commercialisé sous le nom spécialisé de genaslim®. Aussi elle est utilisée pour ses effets hypoglycémiant, analgésiques, anti-inflammatoires et bien d'autres (Dutt et al., 2011).

Pour l'espèce *Caralluma europaea* ses les parties aériennes sont utilisées soit en décoction pour le traitement de la toux et l'asthme ou en poudre pour le traitement des kystes de l'appareil urogénital. (Lahsissene et al., 2009)

I.5. Données phytochimiques

Des investigations relatives aux constituants des espèces du genre *Caralluma* ont été menées en se basant sur les nombreux effets produits en ethnobotanique. Plusieurs espèces de *Caralluma* R.Br. contiennent des glycosides pregnanes issues d'une condensation entre un sucre et un pregnane (voir Figure 4), des acides gras, des stérols, des flavonoïdes ainsi que des megastigmanes. (Shukla et al., 2013), des triterpènes (β -sitosterolacétate, lupeol, lupeolacétate, guimarenol, lupenone) (Al-Massarani et al., 2012).

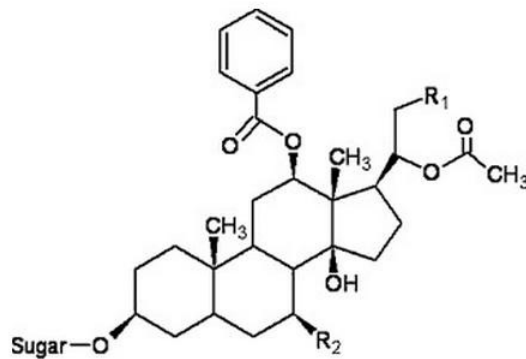


Figure 4: Exemple de structure chimique des glycosides pregnane (Al-Massarani et al., 2012).

Les données phytochimiques sur *C. europaea* sont :

- ✓ Les études de Formisano et al., (2009) ont fourni une composition chimique des composés volatils des fleurs soit 41 composés identifiés et quantifiés. Les principaux composés étaient, parmi les monoterpénoïdes, le terpinolène (23,3 %), α -terpinène (19,1 %) et le linalol (18,4 %), tandis que, parmi les composés carbonylés, les principaux constituants étaient l'heptanal (2,0 %), l'acide octanoïque (2,4 %) et l'acide hexanoïque (1,7 %). La présence d'un composé azoté, l'indole (0,8 %), et d'un composé soufré, le sulfure de diméthyle.
- ✓ les travaux de (Zito et al., 2010); dont les résultats :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Les analyses La composition chimique de l'huile essentielle des fleurs ont permis l'identification et la quantification de 74 composés volatils, dont 16 sont aromatiques et 58 non aromatiques.
- Tiges et fruits contenaient respectivement 1,4 % et 2,7 % de composés aromatiques, tandis que les composés non aromatiques étaient 88,3 % et 88,8 %. Les hydrocarbures non aromatiques étaient les composés les plus abondants dans les deux organes, suivis des acides gras.
- La différence des profils des tiges et des fruits qui ne partageaient que dix-huit composés ; les tiges en comptaient 38, tandis que fruits pour 53. Les fruits ont montré une plus grande diversité, notamment en ce qui concerne les composés aromatiques avec douze contre quatre en tiges.
- ✓ (Sagou et *al.*, 2016), ont effectué un screening phytochimique des tiges de *Caralluma europaea*(Guss.)
 - Deux types d'extraction par macération seule et par macération assistée par ultrasons. La comparaison des rendements des deux types d'extraction a montré que les solvants polaires et modérément polaires sont plus efficaces de point de vue rendement. Cette efficacité peut s'expliquer, d'une part, par leurs polarités, d'où une pénétration efficace et, d'autre part, en raison de leur pouvoir d'extraction ; Cela favorise la pénétration et la diffusion du solvant dans la plante et que les matières contenant les composés bioactifs et facilite ainsi la libération de ces derniers.
 - Le criblage photochimique des extraits issus de macération seule et ceux issus de la macération assistée par les ultrasons a montré la grande richesse de la plante en polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et saponines (le test des saponines pour les deux types d'extraction est modérément positif), produits naturels d'un intérêt considérable pour le domaine pharmacologique.
- ✓ Ouassou et *al.*,(2018); ont procédé à:
 - L'extraction par des solvants par Soxhlet des tiges de *Caralluma europaea* en donnant les rendements de chaque extrait. Ainsi que l'étude de l'activité inhibitrice des extraits de *Caralluma europaea* sur la α -glucosidase. Leurs résultats ont montré que les extraits dichlorométhane, d'Acétate d'éthyle et l'extrait aqueux se sont avérés capables d'inhiber significativement ($P < 0,01$ et $P < 0,001$) la α -glucosidase à deux doses par rapport au témoin.
- ✓ Ceux de Dra et *al.*, (2017); dont les résultats ont montré que:

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Le rendement de l'extraction de l'extrait méthanolique qui est de l'ordre 4,78% et l'extrait dichlorométhane est de l'ordre de 4,23%
- Le criblage phytochimique de l'extrait méthanolique a montré la présence de tanins, de flavonoïdes, de terpènes et de stéroïdes et l'absence d'alcaloïdes, de saponines et de quinones.
- Le dosage des composés phénoliques a montré que l'extrait méthanolique de *C. europaea* est riche en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

✓ **Hajji et al.,(2016)** dont les résultats ont montré que :

- Le rendement de l'extrait méthanolique est de l'ordre de 8.21% 4,25% pour l'extrait aqueux.
- le criblage phytochimique de l'extrait aqueux ne contient que des flavonoïdes et des alcaloïdes, tandis que l'extrait de méthanol contient, outre des alcaloïdes, des composés phénoliques. Quant à l'extrait d'acétate d'éthyle, il contient les quatre groupes de composés bioactifs ; alcaloïdes, flavonoïdes, composés phénoliques et tanins.

I.6. Données pharmacologiques

Nombreux sont les effets montrés par des espèces du genre *Caralluma sp.* et rapportés dans la littérature que ce soit dans des études *in vitro*, *in vivo* ou dans des études cliniques. On a tenu à les citer vu que notre plante a été sujette de peu d'études pharmacologiques.

I.6.1. Les effets antibactériens

Ainsi concernant les études *in vitro*, des extraits des solvants organiques (acétone et éther de pétrole) de *Caralluma fimbriata* ont montré des effets antibactériens contre *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Pseudomonas spp*, *Bacillus* et *Staphylococcus aureus* (Packialakshmi et Naziya, 2014).

Hajji et al.,(2016) ont évalué l'action antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle, de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de *Caralluma europaea* sur *Rhodococcusequi* est une bactérie pathogène connue qui affecte les humains et les animaux.

Ait Dra et al.,(2018-2019) ont évalué l'action antibactérienne des huiles essentielles de *Caralluma europaea*.

I.6.2. Les effets anticancéreux

Des extraits d'acétylacétate de *Caralluma tuberculata* ont montré une activité anti-proliférative contre 3 lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-468 Caco-2, huvecs et U937) (Waheed et al., 2011). Cette espèce a aussi montré une bonne activité antioxydante attribuée à ses composés phénoliques ainsi qu'aux flavonoïdes (Rehman et al., 2014).

I.6.3. Les effets analgésiques et anti inflammatoires

Les études in vivo montrent des effets analgésiques et anti-inflammatoires d'extraits éthanoliques à 10% de *Caralluma arabica* dans le test de la plaque chauffante (Zakaria et al., 2001).

I.6.4. Les effets antidiabétiques

L'extrait hydro-alcoolique de *Caralluma fimbriata* a montré son effet préventif sur la résistance à l'insuline, la peroxydation de macromolécules et sur le taux de leptine, de glucose et de triglycérides chez des rats obèses comparés à des rats témoins sur une période de 90 jours de traitement (Sudhakara et al., 2014).

Ouassou et al., (2018) ont étudié l'action antihyperglycémique de *C. europaea* chez la souris. L'action antihyperglycémique de *Caralluma europaea* peut être partiellement attribuée à l'inhibition intestinale de la α -glucosidase ainsi qu'à d'autres mécanismes.

Ait Dra et al., (2018-2019) ont évalué l'effet des extraits de *Caralluma europaea* sur le diabète qui s'est avéré efficace.

I.6.5. Les effets comportementaux

A dose-dépendante, *Caralluma fimbriata*, de même, a montré une activité de type anxiolytique dans le test de la croix surélevée (EPM) via des administrations chroniques sur plusieurs jours et une action nootrope dans les mêmes conditions avec des doses de 250, 500 et 1000 mg/kg (Rajendran et al., 2014b).

Des effets anorexigènes lui sont également attribués sur une modification de la prise alimentaire induite chez des rats sur une période de 90 jours avec augmentation du taux de leptine circulante (Kamalakkannan et al., 2010).

I.6.6. Essais cliniques

Dans des études d'essais cliniques, l'espèce *Caralluma fimbriata* montre des résultats contradictoires. En effet, une étude menée par Kuriyan et al., (2007) aurait montré des résultats significatifs relatifs à la perte de poids corporels chez 50 patients dans une étude

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

double-aveugle ; groupes contrôle-placebo, tandis qu'une autre étude ne trouve aucune différence significative entre les 2 groupes sur les paramètres anthropologiques et biochimiques (Khajuria *et al.*, 2015).

Chapitre II- Généralités sur les activités pharmacologiques et comportementales étudiées

I. La douleur ou la nociception

Comprendre, prévenir, guérir la maladie mais aussi soulager la douleur constituent les principaux fondements de la médecine. En effet, la douleur représente plus de 90 % des causes de consultations. Ce symptôme subjectif, complexe et multidimensionnel est cependant difficile à définir.

I.1. Définition

La fonction de la douleur est d'assurer la détection des stimulations susceptibles de menacer l'intégrité physique de l'organisme. Cette fonction, qualifiée de signal d'alarme, est utile à la protection de l'organisme et elle est assurée par le système neurophysiologique décrit sous le nom de nociception (Hirszowski, 2001). Mais à cette simple transmission du message nociceptif de la périphérie vers les centres corticaux somatosensibles s'ajoute une composante émotionnelle et comportementale. D'où le caractère complexe et multifactoriel de la douleur. La définition actuelle de la notion de la douleur a été rendue officielle par l'I.A.S.P. : « la douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en termes d'une telle lésion » (IASP, 2013).

L'intérêt de cette définition est de mettre sur un même plan les dimensions sensorielles et affectives. Cette définition met en évidence des mécanismes générateurs anatomo-physiologiques et psychologique.

La douleur n'est pas un événement sensoriel isolé, mais en lien avec un contexte, une signification. D'ailleurs, classiquement, on distingue quatre composantes à la douleur, intimement intriquées et indissociables :

I.1.1. La composante sensori- discriminative

Elle correspond aux mécanismes neurophysiologiques de la nociception. Ces mécanismes assurent la détection du stimulus nociceptif et l'analyse de ses caractères intensifs, qualitatifs, temoro-spatiaux (Hirszowski, 2001). La participation des structures corticales dans l'élaboration de cette composante et notamment le cortex sensoriel primaire S1 a été rapportée (Schnitzler et Ploner, 2000 ; Almeida et *al.*,2004).

I.1.2. La composante affective-émotionnelle

Elle confère à cette sensibilité son caractère désagréable. Toute douleur s'accompagne d'un retentissement touchant l'affectivité et l'émotion (angoisse, anxiété, dépression) et provoque des modifications comportementales (réactions d'attention, d'anticipation, de fuites...). La diffusion de l'information nociceptive dans des régions corticales notamment préfrontales et limbiques en serait responsable (Dallel *et al.*, 2003).

I.1.3. La composante cognitive

Elle est à l'origine de phénomènes comportementaux référés à l'expérience antérieure mémorisée (réactions d'attention, d'anticipation, de fuites...). Le rôle du système limbique est ici évoqué (Dallel *et al.*, 2003).

I.1.4. La composante comportementale

Elle regroupe l'ensemble des manifestations verbales ou non verbales observables chez un patient douloureux : plainte, gémissements, position antalgique. Les jeunes enfants expriment tout par leur comportement, tout se lit sur leur visage. Ainsi, si le langage fait défaut, le comportement exprime la douleur. Cette composante assure une fonction de communication avec l'entourage.

I.2. Physiologie de la douleur

Les premières considérations envisageaient la douleur comme un message sensoriel de très forte intensité provoqué par la sur-stimulation des récepteurs qui, normalement stimulés, donnent lieu à des sensations qui ont une qualité sensorielle bien définie.

Cependant, lorsque les circuits spécifiques de la nociception et les systèmes de contrôle qui modulent en permanence le transfert de l'information aux différents niveaux du circuit de la douleur ont été caractérisés, on a commencé à envisager le message nociceptif comme étant distinct du message sensoriel classique. Il est également nécessaire de rappeler que la douleur représente une modalité sensorielle complexe accompagnée de plusieurs aspects : affectifs et cognitifs et aussi associée à des réponses neurovégétatives (Almeida *et al.* 2004) ; d'où la complexité des différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif.

Dans ce paragraphe, nous avons décrit les différents systèmes neuroanatomiques impliqués dans la réception, le traitement et la transmission du message nociceptif afférent ; ce qui constitue des éléments fondamentaux pour la perception de la douleur (Figure 5).

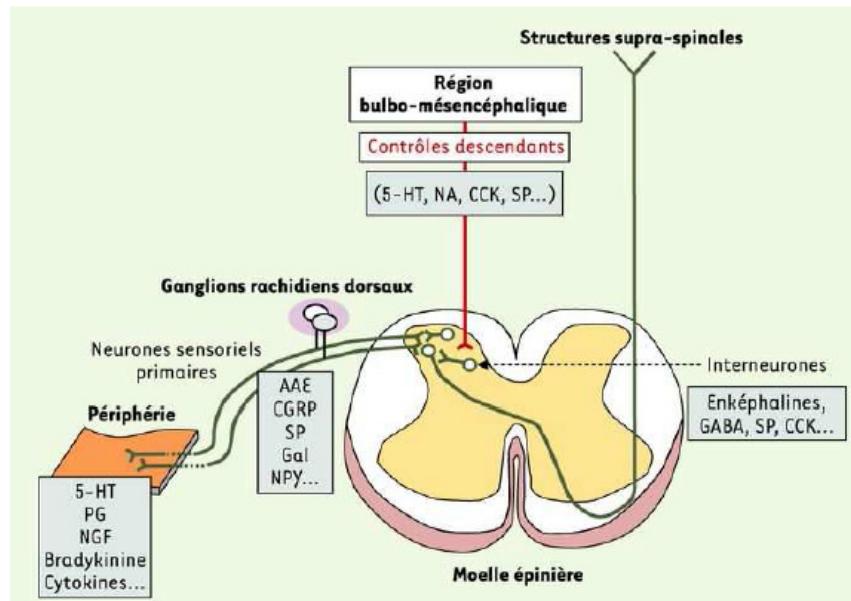


Figure 5: Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (Meunier et *al.*, 2004)

I.2.1. Les voies périphériques

La modulation du message nociceptif débute dès sa genèse à la périphérie. La transduction (figure 6) concerne la transformation d'une énergie mécanique, thermique ou chimique en énergie électrique sous forme de potentiel de récepteur qui se propage secondairement. Les cellules réceptrices ou nocicepteurs périphériques ne sont pas spécialisées dans la nociception. Pourtant, comme pour d'autres modalités sensorielles telles la vision, l'olfaction ou l'audition, ces cellules détectent des stimuli d'une certaine qualité et intensité.

Le message nociceptif résulte de la stimulation des terminaisons libres amyéliniques (nocicepteurs), très nombreuses (200 par cm²), arborisées dans les tissus cutanés, musculaires et articulaires, ainsi que dans les parois des viscères (Queneau et Ostermann, 2004).

Ce message est ensuite véhiculé dans les nerfs par différentes fibres classées selon leur diamètre et l'existence ou non d'une gaine de myéline :

Les fibres A δ de calibre fin (diamètre de 1 à 5 microns), sont faiblement myélinisées, répondent aux stimuli mécaniques, responsables de la perception de la douleur rapide, bien localisée de type piqûre.

Les fibres C, de très fin calibre (diamètre de 0,3 à 1,5 microns), sont dépourvues de myéline et leur conduction est lente ; elles répondent pour la plupart à tous types de stimuli (mécaniques, thermiques, chimiques) et sont appelées nocicepteurs "polymodaux".

Les corps cellulaires des fibres afférentes primaires forment les ganglions des racines dorsales (ganglions rachidiens) (Purves *et al.*, 2000) (figure 5, 6).

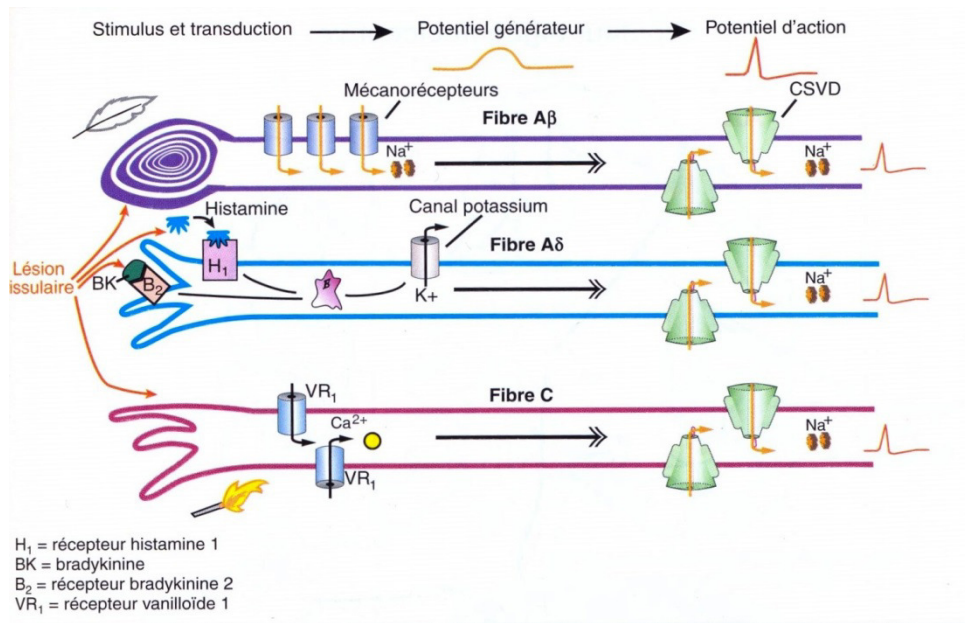


Figure 6: Transduction nociceptive (S.M.STAHL. 2010)

I.2.2. La moelle épinière

Les fibres nerveuses « nociceptives » rejoignent la moelle épinière au niveau de la corne postérieure de la substance grise de la moelle. C'est à ce niveau que l'information quitte ces premiers neurones pour être transmise à ceux qui vont la faire cheminer jusqu'au système nerveux central. Les fibres A-delta et C se séparent des grosses fibres tactiles pour se terminer dans les couches superficielles (couches I-II) et profondes (couches V-VI) de la corne dorsale (Almeida et *al.*, 2004). Le relais médullaire se fait alors avec deux types de neurones :

• Les neurones nociceptifs non spécifiques

Ils répondent à des stimulations très variées, chimique, mécanique, thermique, nociceptives ou non. Ils sont concentrés dans les couches profondes de la corne dorsale de la moelle (couche V) (Purves et *al.*, 2000). Des fibres afférentes primaires, provenant de territoires cutané ou viscéral peuvent faire synapses avec un même neurone de projection. Cette convergence viscéro-somatique sert de base physiologique à l'explication des douleurs projetées.

• Les neurones nociceptifs spécifiques

Ils ne répondent qu'aux stimulations mécaniques ou thermiques intenses (Brasseur, 1997). Ils sont localisés en plus grand nombre dans les couches les plus superficielles de la moelle (couches I et II), qui contiennent aussi des neurones répondant spécifiquement au froid. Les

couches superficielles constituent donc des relais importants dans la transmission des messages thermiques et douloureux.

I.2.3. Les Voies ascendantes

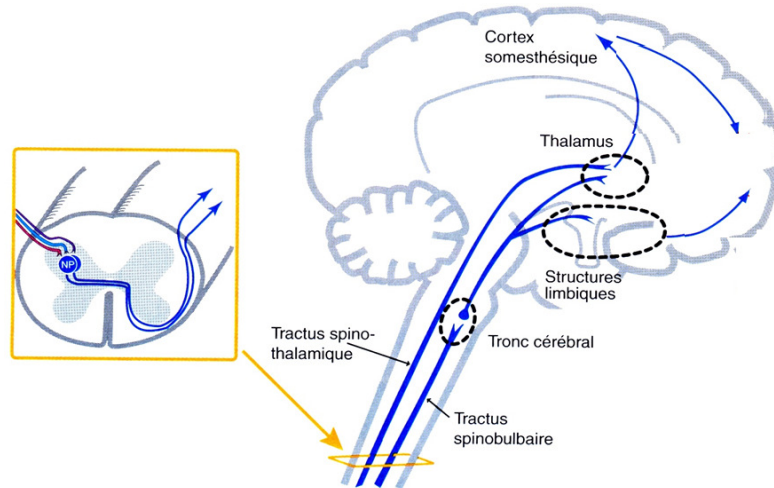


Figure 7: Les voies ascendantes : les neurones de la corne dorsale se projettent, via le tractus spinothalamique, vers le thalamus et le cortex primaire somesthésique

Après les lames médullaires, les messages nociceptifs gagnent les centres cérébraux par la voie antérolatérale croisée (Purves et *al.*, 2000). Deux voies ascendantes sont impliquées dans la transmission du message nociceptif à l'étage supra-spinal (figure 7):

- Le faisceau spino-thalamique (FST) chemine au niveau du cordon antérolatéral de la moelle. Les fibres du FST sont des fibres A-delta, et se projettent dans le thalamus latéral, puis dans le cortex sensitif (voie de la sensation).

- Le faisceau spino-réticulo-thalamique (FSRT) chemine aussi au niveau du cordon antérolatéral de la moelle.

- D'autres faisceaux ont été également caractérisés. Citons :

Le **faisceau spinoréticulaire** ; les informations envoyées de façon controlatérale mais également ipsilatérale en direction des noyaux gigantocellulaires et réticulaires latéral du tronc cérébral.

Le faisceau **spino-ponto-mésencéphalique** projette essentiellement sur la substance grise péri-aqueducale et l'aire parabrachiale.

Enfin, un **faisceau spino-hypothalamique** qui projette directement sur l'hypothalamus a été récemment décrit (Brooks et Tracey, 2005).

I.2.4. Les centres supérieurs

La sensation douloureuse est analysée par le système nerveux central. En effet, les fibres transmettant le signal nociceptif vont faire relais avec des neurones au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Elles envoient leurs axones vers les structures encéphaliques, où elles projettent les messages nociceptifs qui constituent les cellules d'origine des voies spinales ascendantes de la douleur (Aboufatima, 1999). Les neurones nociceptifs se projettent principalement vers trois sites : la formation réticulée, le mésencéphale et le thalamus latéral.

- **La formation réticulée bulbaire** correspond à une zone de contrôle et d'interaction de multiples systèmes : la vigilance, la respiration, la motricité, la régulation cardiovasculaire et la nociception. Ainsi, les neurones du noyau gigantho-cellulaire qui répondent aux stimulations nociceptives pourraient participer à la mise en alerte des systèmes de défense contre l'agression nociceptive. Par ailleurs, des fibres descendantes bulbospinales sont issues de ce noyau et participent à une régulation médullaire via une boucle spino-bulbospinale (Brasseur, 1997).

- **L'aire parabrachiale et la substance grise périaqueducule** reçoivent des informations nociceptives qui sont ensuite transmises vers l'amygdale et l'hypothalamus ; ceci peut être en rapport avec l'émotion, la peur et le stress liés à la douleur (Guirimand et Le Bars, 1996). En effet, des études ont démontré que le noyau central de l'amygdale est impliqué dans le comportement associé à la peur et aux réponses somatomotrices provoquées par le stimulus nocif. De même, plusieurs noyaux hypothalamiques sont également impliqués dans ces réponses comportementales (Aboufatima et *al.*, 2002 ; Price, 2002).

- **Le thalamus** est un lieu de convergence de multiples voies nociceptives directes ou indirectes. Les neurones du complexe noyau ventro-postéro-latéral, en codant les caractéristiques des stimulations (intensité, durée, localisation), participent aux composantes sensori-discriminatives de la douleur (Price, 2002).

Au terme de ces très brèves considérations anatomiques, il est clair que les voies de conduction des messages nociceptifs sont multiples et qu'il n'existe pas de centre spécialisé de la douleur.

I.3. Les systèmes de contrôle de la douleur

Les voies nociceptives afférentes, relativement spécifiques, sont en permanence modulées par des systèmes régulateurs, essentiellement inhibiteurs, au niveau de leurs divers relais du système nerveux central (corne dorsale spinale, tronc cérébral, thalamus...). Cette modulation

s'exerce par l'intermédiaire des informations sensorielles non douloureuses et des structures supra spinales.

Divers contrôles excitateurs et inhibiteurs modulent la transmission des messages nociceptifs.

On distingue :

I.3.1. Contrôle segmentaire : contrôle de la porte (Théorie de Melzack et wall)

Le premier niveau d'intégration s'effectue au niveau de la corne dorsale de la moelle qui représente un siège important de la modulation du message nociceptif. Elle réalise un véritable filtre où convergent de nombreux mécanismes modulateurs sur l'entrée des afférences nociceptives dans la moelle spinale.

Il existe une interaction segmentaire entre les fibres périphériques de gros calibres Aβ qui véhiculent des messages tactiles et les fibres amyéliniques C chargées des messages nociceptifs (Guirimand et Le Bars, 1996). Cette théorie appelée 'gate control' montre que l'activation des fibres sensitives cutanées de gros diamètre est responsable de l'inhibition de la transmission des fibres nociceptives de la corne postérieure (Queneau et Ostermann, 2004)(Figure 8). Ainsi s'explique le soulagement induit par stimulation tactile après une douleur dans le même territoire cutané.

Inhibition segmentaire (corne postérieure de la moelle)

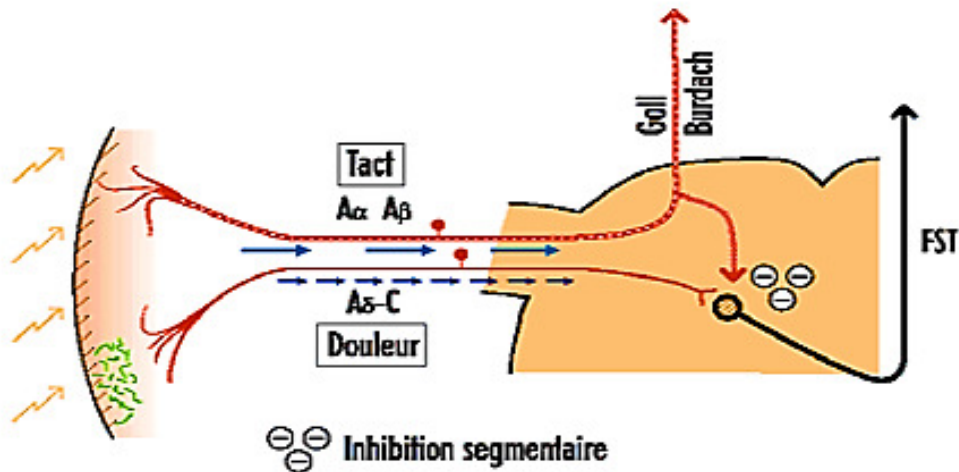


Figure 8:Théorie de la porte 'gate control' (D'après Payen et al., 2001)

I.3.2. Les contrôles d'origine supraspinale

Le contrôle de la douleur s'exerce au niveau du tronc cérébral par des voies descendantes qui inhibent la transmission spinale des messages nociceptifs. La substance grise péri-aqueducule (SGPA), le noyau du raphé magnus (NRM), l'aire parabrachiale, le locus coeruleus et l'hypothalamus y sont impliqués (Brooks et Tracey, 2005). La sérotonine et la noradrénaline jouent un rôle prépondérant dans ces contrôles. Ils mettent aussi en jeu des opioïdes endogènes (ou endomorphines) qui se fixent aux récepteurs opioïdes.

Un autre système de contrôle a été décrit. Ce mécanisme, appelé Contrôle Inhibiteur Diffus induit par la stimulation Nociceptive (CIDN) pourrait avoir comme rôle celui d'un filtre chargé de détecter le caractère nociceptif des messages en inhibant l'ensemble des activités de base des neurones spinaux faisant ainsi ressortir le signal nociceptif par rapport au bruit de fond. Ainsi, la survenue d'un message nociceptif entraîne l'inhibition des autres neurones à convergence de la moelle via l'activation d'une boucle spino-bulbo-spinale passant par le noyau subréticulaire dorsal et les cordons dorsaux (Danziger et al., 1999). Les CIDN permettent aussi d'expliquer que de ces deux douleurs, la plus forte inhibe la plus faible.

I.4. Contrôles neurochimiques de la douleur

La transmission, la modulation, la perception du message nociceptif sont la résultante de la libération de nombreuses substances biochimiques, les unes excitatrices, les autres inhibitrices (Collège Enseignants Neurologie, 2005).

Au niveau périphérique, la lésion tissulaire provoque la synthèse des médiateurs inflammatoires eux même algogènes. Ces médiateurs sont multiples (bradykinine, sérotonine, histamine, ions potassium et hydrogène) et regroupés sous le vocable de "soupe inflammatoire". Ils modifient la perméabilité aux ions des canaux membranaires des récepteurs nociceptifs et abaissent leur seuil de déclenchement par des mécanismes de transduction (hyperalgésie primaire) (Queneau et Ostermann, 1998). Ainsi, la sensibilisation des nocicepteurs traduite par l'hyperalgésie périphérique correspond à un seuil d'activation plus bas, une latence diminuée, des réponses aux stimuli non nociceptif 'allodynie' voire une activité spontanée des nocicepteurs.

De leur part, les terminaisons libres des nocicepteurs libèrent des agents vasodilatateurs capables d'augmenter la perméabilité vasculaire et, par conséquent, la fuite plasmatique. Après stimulation nociceptive, l'influx nerveux se propage non seulement vers la moelle mais aussi de façon antidromique, vers les autres terminaisons libres de la même fibre qui vont à leur tour libérer des peptides dont la substance P ou le CGRP. Il en résulte une dégranulation

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

mastocytaire et une libération de l'histamine et de la sérotonine responsables de l'inflammation neurogène (Besson, 1997).

D'un autre côté, l'importance des cytokines pro-inflammatoires dans la genèse et la persistance de la douleur ne cesse de s'affirmer. Ainsi, des travaux ont montré que la libération de nombreux médiateurs 'hyperalgiques' est secondaire à la mise en jeu de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 1, 6 et 8 (IL-1 α et β , IL-6, IL-8) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor) (Meunier et *al.*, 2004).

La corne dorsale de la moelle doit être considérée non seulement comme une plaque tournante des informations mais également comme une véritable usine biochimique, caractérisée par une concentration importante de substances excitatrices et inhibitrices, intervenant dans les processus de transmission et de filtrage de l'information nociceptive.

Au niveau spinal, les principaux neurotransmetteurs qui véhiculent les informations entre les afférences nociceptives et les neurones nociceptifs sont les acides aminés excitateurs (aspartate, glutamate) et les neuropeptides (substance P, CGRP, VIP...). La substance P et le glutamate semblent jouer un rôle primordial dans la transmission du message nociceptif jusqu'aux couches profondes, point de départ du faisceau spino-thalamique (Fundytus, 2001 ; Riedel et Neeck, 2001 ; Herpfer et Lieb, 2003). En plus de leur rôle de transmission, ces neuromédiateurs provoquent une sensibilisation des neurones convergents responsables de l'hyperalgie secondaire. Ainsi, les antagonistes des acides aminés excitateurs ont des propriétés anti-hyperalgésiantes, c'est le cas du paracétamol, sulfate de magnésium, le dextrometorphan et la kétamine. De même, une nouvelle approche thérapeutique tente d'employer des antagonistes synthétiques des récepteurs de la bradykinine, substance P et NMDA dans le traitement de la douleur (Besson, 1997).

D'un autre côté, les contrôles inhibiteurs descendants agissent sur les neurones convergents en libérant des amines biogènes dont la sérotonine, noradrénaline et dopamine. De ce fait, les antidépresseurs tricycliques exercent leur effet antalgique en augmentant la quantité de ces amines biogènes présentes dans ces synapses.

Enfin, on trouve dans la corne postérieure de grandes quantités d'enképhalines et de dynorphines, qui font partie des opioïdes endogènes (Toll et *al.*, 1994). Le système opioïde a fait l'objet de très nombreuses études depuis la découverte des récepteurs opioïdes. Les opiacés comme les opioïdes endogènes sont des agonistes des récepteurs opioïdiques. Il existe au moins trois sous types bien connus de ces récepteurs : mu, delta et kappa dans le système nerveux des mammifères (Reisine et Bell, 1993). Ces récepteurs sont localisés aussi bien au niveau périphérique (terminaisons des fibres afférentes primaires) qu'au niveau spinal

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

(corne postérieure de la moelle) et supra spinal (tronc cérébral, thalamus, système limbique). Ils appartiennent à la famille des récepteurs qui sont ancrés dans la membrane plasmique par sept segments hydrophobes et sont couplés à la protéine G (Charles et Hales, 2004). Leur activation induit une inhibition de l'activité de l'adénylatecyclase et donc une réduction de la concentration intracellulaire du second messager (AMPcyclique), une modulation de la conductance de certains canaux ioniques (Ca^{2+} , K^{+}) dont la perméabilité règle la polarisation des cellules et une régulation de la libération de divers neurotransmetteurs (substance P). Les peptides opioïdes endogènes sont divisés en trois catégories lesquelles sont issues de trois molécules précurseurs bien différentes.

Citons en premier les enképhalines qui sont des peptides constitués de cinq acides aminés et qui sont synthétisés à partir d'une molécule précurseur appelée la proenkephaline A.

En second lieu, il y a les endorphines, lesquelles pour leur part tiennent leur origine de la proopiomélanocortine (POMC).

La troisième catégorie de peptides opiacés est représentée par la dynorphine qui est issue de la molécule pro-dynorphine (pro-DYN). Les enképhalines se lient de façon préférentielle aux récepteurs opiacés de type δ mais possèdent également une affinité appréciable pour les récepteurs opiacés de type μ (Vion-Dury et Cupo, 1988). Quant aux endorphines, leur distribution dans le SNC s'avère moins importante que celle des enképhalines. Les endorphines se lient avec une très grande affinité aux récepteurs opiacés de type μ , mais possèdent également une bonne affinité pour les récepteurs opiacés de type δ (Cox, 1982). Les molécules de dynorphines, pour leur part, peuvent se lier aux trois types de récepteurs opiacés, mais avec une affinité beaucoup plus grande pour les récepteurs opiacés de type κ (Cox, 1982).

II. La dépression :

II.1. Données générales sur la dépression

De très nombreux liens unissent les concepts de dépression et d'affectivité. Selon la définition de Pichot la dépression est « une modification pathologique de la variété normale de l'humeur qui est la tristesse », en tant que symptôme, la dépression représente en effet un trouble affectif. En tant que syndrome et/ou en tant que maladie, la dépression est habituellement liée à l'existence d'un trouble de l'humeur (Féline et *al.*, 1991).

Le mot «dépression » est utilisé également pour qualifier un grand nombre d'états de l'humeur qui peuvent être soit normales, soit pathologiques. Ainsi, la dépression peut constituer une humeur ou un sentiment normal, un symptôme dans le cas où la dépression est une forme de réaction au stress ou une réaction secondaire des patients avec des problèmes organiques ou psychiatriques et enfin un trouble psychopathologique ou syndrome, comme par exemple le trouble dépressif majeur, le trouble dysthymique ou les troubles bipolaires, qui se classent aussi bien selon la CIM-10 (Classification Internationales des maladies, 10ème révision) (World Health Organization, 1993) et le DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders, 4th révision) (American Psychiatric Associations, 1994) dans des troubles de l'humeur. Par le terme« Troubles de l'humeur » ou jadis « Troubles Affectifs » on se réfère à un nombre de situations clinique dont la caractéristique principale est le trouble de l'humeur qui est suivi par des difficultés cognitives, psychomotrices, psycho-physiologiques et interpersonnelles (Kleftaras, 2004).

Bien que la dépression soit un phénomène relativement fréquent, sa définition n'est pas facile. Même les spécialistes ne sont pas d'accord sur sa nature, c'est à dire s'il s'agit d'un phénomène biologique ou psychologique. Néanmoins, il y a unanimité sur un point : la dépression se présente comme une caractéristique de la nature humaine, depuis la tristesse passagère jusqu'à la dépression profonde.

La dépression est un trouble affectif qui se traduit par un état de mauvaise humeur et une aversion pour les activités qui peuvent avoir un effet négatif sur le comportement de pensée, la vision du monde et le bien-être physique d'une personne (APA, 2013). De nombreux syndromes psychiatriques présentent l'humeur dépressive comme symptôme principal, c'est pourquoi il est devenu le principal problème psychiatrique mondial (Pillemer et *al.*, 2010). Environ 350 millions de personnes souffrent de dépression dans le monde (WHO, 2012).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les personnes souffrant de dépression sont aux prises avec une perte d'énergie et de motivation, ce qui influence leur capacité à être productif, faisant de la dépression la principale cause de l'handicap dans le monde (Kessler et al., 2009).

De nombreux travaux ont montré que certaines fonctions cognitives sont altérées précocement et parfois de manière importante dans la dépression, entraînant une baisse de l'efficacité intellectuelle (Watts et al., 1990 ; Golinkoff et Sweeney, 1989 ; Watts, 1995 ; Fossati et Allilaire, 2001 ; Peretti et Ferreri, 2006). Selon Schrijvers et ses collaborateurs (2008), le ralentissement psychomoteur est un symptôme constant et constitue probablement le symptôme central de la dépression. En effet, Fossati et Allilaire, (2001) avaient rapporté que les déprimés souffrent fréquemment, sinon constamment d'une perturbation des processus mnésiques. Lemelin et Baruch, (1998) ont rapporté l'existence d'un déficit de vigilance chez les déprimés. L'impossibilité pour un sujet déprimé d'effectuer correctement une tâche requérant un effort cognitif, résulterait de la faiblesse des ressources cognitives mobilisables dans la dépression et du manque de motivation générale prévalant (Watts et al., 1990 ; Austin et al., 2001).

Sur le plan endocrinien, plusieurs anomalies ont été décrites. Une hyperactivité du système hypothalamo-hypophysaire-surrénalien au cours des syndromes dépressifs (Carroll, 1975 ; Zerssen et Doerr, 1980). Cette hyperactivité s'exprime par une augmentation des corticostéroïdes et du cortisol plasmatique (Steiger et Holsboer, 1997), par une élévation du taux du cortisol dans le liquide céphalo-rachidien ainsi que par l'altération du rythme circadien du cortisol (Shopsin et Gershon, 1971; Sachar et al., 1973; Gold et al., 1980).

Nous notons également une perturbation du système hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien se traduisant par une diminution de la réponse de la T.S.H. (Thyroïde-stimulating-hormone) à l'administration de T.R.H. qui pourrait être liée aux taux de cortisol chez les déprimés (Carroll, 1975). Des troubles de sécrétion de la prolactine (Halbreich et al., 1979), de l'hormone de croissance (GH) (Garver et al., 1975) et de l'hormone lutéotrope (LH) (Brambilla et al., 1978) ont été décrits.

Dans l'ensemble, les altérations endocriniennes mises en évidence ne semblent pas résulter d'un mauvais fonctionnement hypophysaire mais des anomalies fonctionnelles hypothalamiques, avec une dépendance possible des monoamines cérébrales. Fuller, (1990) avait montré l'implication de la sérotonine dans la régulation de la sécrétion des hormones endocriniennes. Ces données sont en faveur d'une implication des neurones aminergiques dans la dépression. En effet, plusieurs études ont montré que, chez certains déprimés, il y a une réduction des métabolites des amines, traduisant un hypofonctionnement des neurones

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

aminèrgiques. Van Praag et Korf, (1971); Asberg et *al.*, (1976) ont montré que la concentration de la 5HIAA dans le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) est abaissée chez certains déprimés et que son accumulation dans le L.C.R. sous probénécide, est diminuée. Selon Asberg et ses collaborateurs (1976) il y a une corrélation inverse entre le taux de 5HIAA et la gravité clinique. En d'autres termes, les sujets avec les taux les plus bas ont les taux de suicides les plus marqués. Cependant, ces résultats restent équivoques dans certains cas, ou on n'a pas constaté d'abaissement notable des métabolites de la sérotonine chez les déprimés suicidaires.

III. Anxiété

III.1. Définitions

L'anxiété est définie comme un trouble émotionnel qui consiste à l'anticipation d'un danger réel ou imaginaire (Ohman *et al.*, 2001). Cet état émotionnel se manifeste par des caractères psychiques (pressentiment d'un danger vague et impression pénible d'impuissance ou de faiblesse devant la menace), comportementaux (réaction d'évitement, de fuite du danger...) ou encore physiologiques (hyperthermie, sueur, tremblements, sécheresse de la bouche...).

Il existe deux types d'anxiété : l'anxiété normale dite 'd'état' qui réfère ce qui est épisodique et que l'individu ressent à un moment particulier, et l'anxiété pathologique dite 'trait' qui réfère ce qui est permanent chez l'individu (Channouf et Rouan, 2004).

III.2. Neurochimie de l'anxiété

Le trouble anxieux tout comme le stress implique souvent le dysfonctionnement des systèmes neurobiologiques notamment au niveau des systèmes de neurotransmission et neuroendocrinien. En effet, le système neuroendocrinien constitue une interface entre l'environnement et les systèmes physiologiques de l'organisme (Dorshkend et Horseman, 2001). Il est maintenant admis qu'il existe un lien neurochimique entre la dépression, stress et anxiété (Iny *et al.*, 1994). Ainsi, il a été démontré qu'il ya des perturbations du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (CRF, ACTH, cortisol) dans le sens d'une hyperactivité à la fois dans l'anxiété, stress et dépression (Arborelius *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 2003). Certaines études ont démontré l'implication du système sérotoninergique mais également noradrénergique dans l'étiologie de l'anxiété (Inou *et al.* 2004).

Depuis plusieurs années déjà, des études ont démontré que le système de neurotransmission GABA est associé à l'anxiété. Les benzodiazépines qui agissent via l'acide gamma aminobutyrique possèdent un effet anxiolytique (Gram et Christensen, 1986). Ainsi, que d'autres neurotransmetteurs sont impliqués dans l'anxiété ou le stress, c'est notamment le cas de la vasopressine, de neuropeptide Y, de la CCK (Clement et Chapouthier, 1998 ;Carasco et Van de kar, 2003).

IV. Fonction hépatique

IV.1. Données générales sur le foie :

Le foie est le plus lourd viscère du corps, il représente 2,5% du corps (exemple 1,4 à 1,6 kg pour un sujet pèse 60 kg), de couleur rouge brun, une odeur similaire chez de nombreux animaux et une consistance particulière. Il est suspendu à la partie supérieure de la cavité abdominale, dans la région droite. Il est séparé des poumons et du cœur par le diaphragme, il est impalpable chez le sujet sain. Cette position lui offre deux avantages importants : d'une part, cet organe vital bénéficie de la protection de la cage thoracique (côtes inférieures) et, d'autre part, il est mitoyen avec le diaphragme, dont les mouvements respiratoires incessants lui apportent le meilleur massage fonctionnel (Figure 9). Il se divise en quatre lobes inégaux ; le lobe hépatique droit est le plus volumineux, le lobe hépatique gauche est la partie la plus étroite de l'organe. Entre ces deux lobes majeurs, deux autres lobes sont distingués, le lobe carré et le lobe caudé. (Ciaccio et Castaing, 2015). Dans le foie se situe la vésicule biliaire; non palpable physiologiquement.

C'est un organe très vascularisé, riche en sang filtré issu du système portal et qui gagne ensuite le système cave pour rejoindre le cœur (il contient plus de 10 % du sang total) (Marieb, 2008).

Le foie est une glande exocrine - il sécrète la bile et participe à la digestion- et endocrine puisqu'il synthétise et déverse une quantité importante de molécules dans la circulation sanguine. Il a aussi pour rôles la mise en réserve et la distribution des nutriments en provenance de l'intestin (tout ce qui vient de l'intestin passe dans le foie par la circulation porte), la biotransformation et l'élimination des déchets lipophiliques (membranes) endogènes et exogènes (médicaments), la formation des sels biliaires et de la bile, la régulation du flux sanguin (le foie est une « éponge à sang ») et enfin le processus de défense immunitaire.

Pour conclure, le foie est un organe vital impliqué dans le métabolisme, l'excrétion, le stockage, l'élimination et la sécrétion de métabolites.

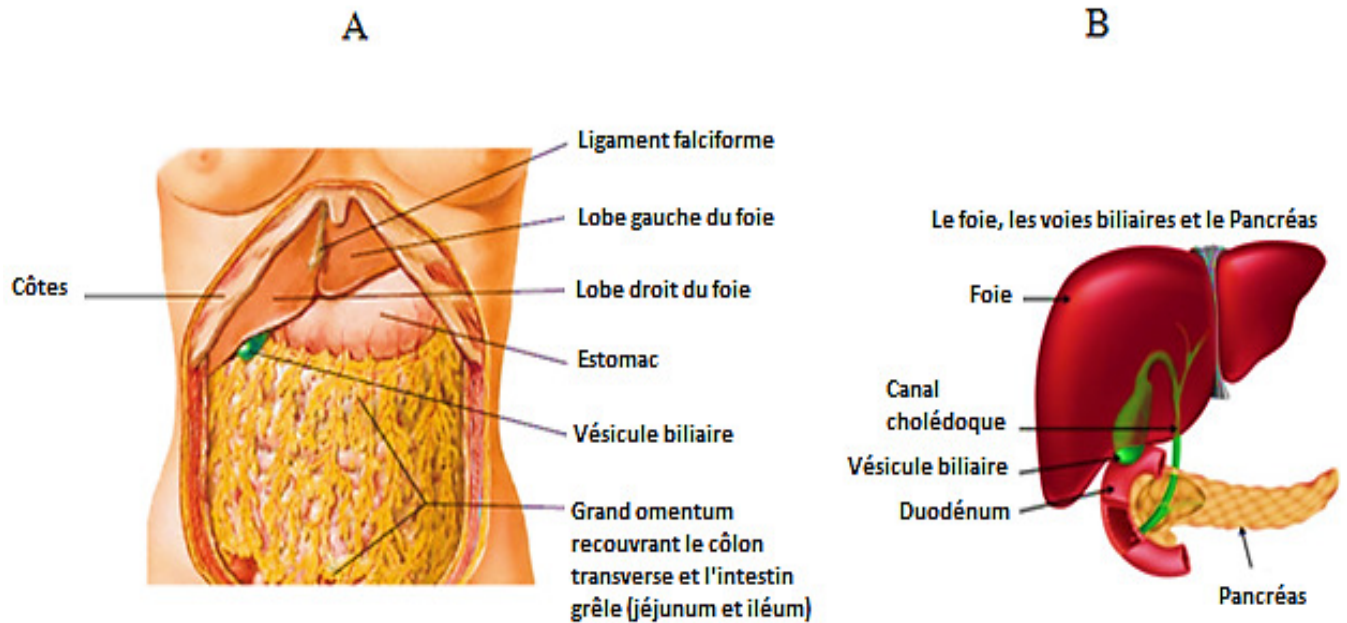


Figure 9: Anatomie de foie : (A) la position du foie dans le corps (Netter, 2011). (B) le foie, les voies biliaires et pancréas (Ciaccio et Castaing, 2015).

IV.2. Les différents types de cellules hépatiques :

IV.2.1. Les hépatocytes

Les cellules parenchymateuses du foie, les hépatocytes, se regroupent en lobules. Ces derniers sont limités par de fins septa de tissu collagénique de soutien. Elles sont grossièrement de forme hexagonale quel que soit le plan de coupe, reflet de leur forme polyédrique dans l'espace. Les branches de l'artère hépatique et de la veine porte sont situées aux angles des limites du lobule dans les espaces portes. Le sang venant des espaces portes converge, par les sinusoides situées entre les travées hépatocytaires, vers une petite veine hépatique terminale (veine centro-lobulaire), dans chaque lobule. Les veines centro-lobulaires se jettent dans la veine sus-hépatique. Chez un humain il y a 100 milliards d'hépatocytes, tant que 10-15% sont actifs, c'est le siège de la majorité des fonctions du foie

IV.2.2. Les cellules de Kupffer

Ce sont des macrophages résidents (5 à 10% du poids hépatique), situés à l'intérieur des sinusoides, qui ont pour fonction « d'épurer » le sang sinusoidal des particules étrangères non arrêtées par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales...) avant qu'elles ne gagnent la circulation générale. Ces cellules sont impliquées dans la phagocytose des hématies âgées et dans la dégradation de l'hémoglobine. Elles ont un rôle immunitaire très important.

IV.2.3. Les cellules d'Ito ou cellules stellaires

Ces cellules localisées dans l'espace de Disse, sont impliquées dans de nombreux processus métaboliques tels que le stockage de la vitamine A dans des vacuoles lipidiques, la sécrétion de médiateurs et la synthèse de molécules de la matrice extra-cellulaire. Elles se caractérisent par leur localisation et par la présence de grosses vacuoles lipidiques cytoplasmiques.

IV.2.4. Les pits cells

Ce sont des cellules « Natural Killer » présentes dans les sinusoides. Ce sont de grands lymphocytes granuleux, en contact avec les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Elles entrent en jeu dès que le foie subit une attaque par des virus, des bactéries ou des cancers. Leur rôle est probablement la défense contre les virus et les cellules tumorales.

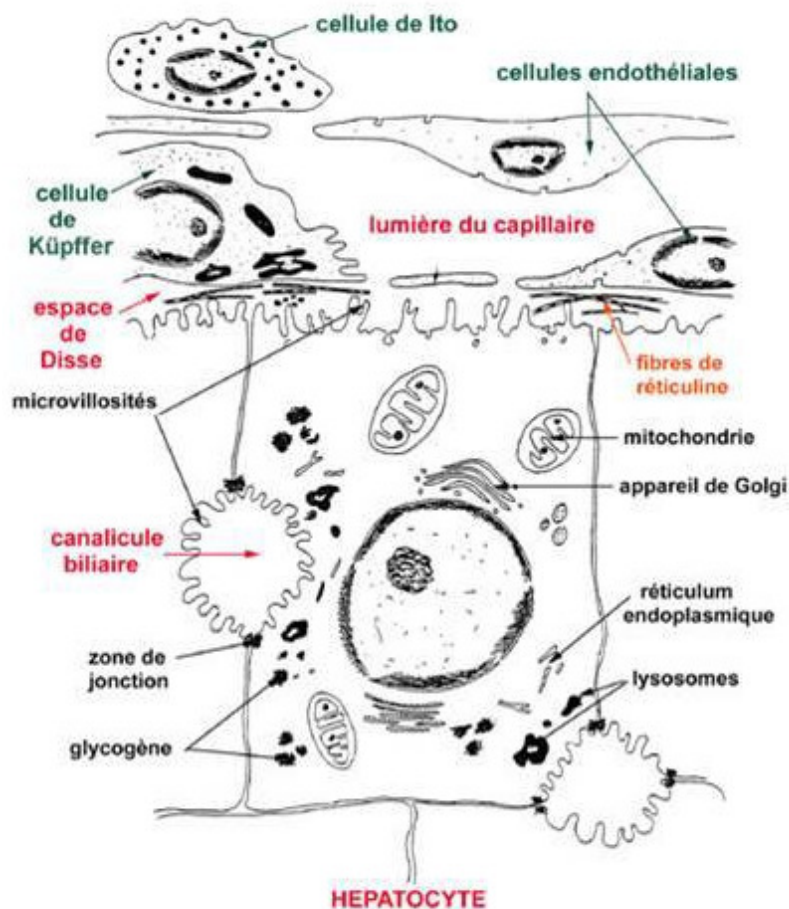


Figure 10:L'ultrastructure du parenchyme hépatique(Illustration de Vacheret. 1999)

IV.3. Les fonctions du foie :

Le foie joue un rôle dominant dans l'homéostasie nutritionnelle puisqu'il est un élément indispensable pour la régulation des différents métabolismes. Il assure son rôle grâce au pool sanguin et aux matériaux qui sont parvenus du tube digestif. Tout en sachant qu'il est le seul organe à se régénérer totalement suite à un stress.

IV.3.1. Fonctions métaboliques

IV.3.1.1. Métabolisme glucidique :

La digestion aboutit à l'hydrolyse des grosses molécules de glucides et l'absorption intestinale entraîne le passage des sucres dans la circulation sanguine. Il y a 80% de glucose, 10% de fructose et 10% de galactose. Le débit hépatique de glucose est de l'ordre de 200 à 250 mg/kg/h. Ainsi, le foie joue un rôle très important dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en contrôlant diverses voies de son métabolisme, telle que son stockage sous forme de glycogène (glycogénogenèse) quand son taux est élevé dans le sang ; quand, au contraire, la glycémie est faible, les hépatocytes dégradent ces réserves de glycogène en glucose (glycogénolyse). De même qu'ils peuvent synthétiser le glucose à partir des lipides et des protides (néoglucogenèse) (Han et *al.*, 2016).

Il faut noter que la régulation de la glycogénogénèse dépend de l'insuline, celle de la néoglucogenèse du cortisol et celle de la glycogénolyse des catécholamines et du glucagon.

IV.3.1.2. Métabolisme des lipides :

Le métabolisme des lipides commence par l'absorption intestinale des graisses alimentaires. Afin de traverser la lumière intestinale dans le plasma, les lipides sont émulsionnés et hydrolysés dans la lumière. Un foie sain est crucial pour l'absorption intestinale des lipides via les acides biliaires qui sont synthétisés dans l'hépatocyte et sécrétés dans le canal biliaire pour émulsionner les gouttelettes lipidiques grâce à leurs propriétés amphiphiles les rendant accessibles à l'hydrolyse des lipases.

Les lipides hydrolysés sont ensuite absorbés par les entérocytes, dans lesquels les lipides sont synthétisés à nouveau et emballés dans des particules de lipoprotéines (c.à.d. des chylomicrons naissants). Les chylomicrons naissants sont sécrétés dans le système lymphatique, où ils contournent le foie et pénètrent dans la circulation dans les deux heures suivant la prise de nourriture (Bechmann et *al.*, 2012).

Le foie joue un rôle fondamental dans l'homéostasie du cholestérol et des triglycérides. C'est le principal organe de synthèse et d'élimination du cholestérol, il produit plus de 90% du

cholestérol endogène, en plus il possède les voies de synthèse et d'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides (constitution des membranes cellulaires et grand nombre de réactions chimiques) dont un important : la lécithine.

C'est l'organe principal de stockage et de transformation des vitamines liposolubles (principalement la vitamine A). Dans certaines pathologies (diabète jeûne), l'oxydation des acides gras peut aboutir à la formation de corps cétoniques (la cétogenèse est essentiellement hépatique)

IV.3.1.3. Métabolisme de protéines :

Le foie fabrique la plupart des protéines que l'on trouve dans le sang (albumine et ferritine), des lipoprotéines qui participent au transport du cholestérol et des protéines de phase aiguë qui jouent un rôle dans l'inflammation. En plus de la dégradation des acides aminés non utilisés par l'organisme, vu qu'ils ne sont pas stockés.

IV.3.1.4. Détoxification :

Le foie est doté d'un système enzymatique qui assure le métabolisme des endo- et des xénobiotiques (médicaments, alcool et CCl₄). Outre la formation de l'urée, il élimine les substances nocives qui arrivent de la circulation splanchnique et les empêche de passer dans la circulation générale.

On distingue 2 phases de métabolisme pour éliminer ces substances :

Les réactions de phase I

Le métabolisme hépatique par réaction de phase I est dû à des réactions de fonctionnalisation, consistant à modifier ou adjoindre des groupements fonctionnels par des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Une réaction de fonctionnalisation permet de transformer un médicament lipophile en un métabolite hydrophile, via le cytochrome P450.

• Les réactions de phase II :

Ces réactions correspondent à des réactions de glucuroconjugaison. Cette glucuroconjugaison est très fréquente et rend les molécules très hydrosolubles facilitant l'élimination par l'urine et la bile. Les médicaments, le plus souvent liposolubles, sont transformés, par les enzymes des cyt-P450, en métabolites intermédiaires instables, puis en métabolites hydrosolubles, éliminés dans la bile ou dans les urines.

**IV.3.1.5. Les systèmes de protection piègeurs de radicaux libres
hépatique**

a) Les systèmes endogènes enzymatiques

➤ *La superoxyde dismutase ou EC 1.15.1.1. (SOD)*

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle assure, ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal Mn ou cuivre de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxyde-dismutases (Mates et *al.*, 1999 ; Milane, 2004). Les (Mn-SOD) : protègent la mitochondrie, cCu-ZnSOD protège le cytosol et Cu-ZnSOD protège la face externe de la membrane des cellules endothéliales et pCu-ZnSOD le plasma sanguin.

➤ *Le système glutathions peroxydases ou EC 1.11.1.9. (GSH-Px)*

Ces enzymes présentent le sélénium pour leurs activations. Elles sont localisées dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Ces enzymes sont, sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H₂O₂, mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Favier, 2003). L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. (Mates et *al.*, 1999 ; Servais, 2004)

➤ *La catalase ou EC 1.11.1.6. (CAT)*

C'est une enzyme répartie dans les tissus (Milane, 2004 ; Borg et Reeber, 2008). Elle catalyse la décomposition de H₂O₂ en 2 H₂O et O₂. Le H₂O₂ n'a pas de charge à sa surface ce qui rend ce ROS très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. La CAT est localisée principalement dans le peroxysome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme.

➤ *Les thioredoxines peroxydases ou EC 1.11.1.15. (Prx)*

Ce sont des petites protéines à activité antioxydante, localisées dans le cytosol, les mitochondries, les péroxysomes, associés aux noyaux et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, où l'H₂O₂, le peroxyde d'azote et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats (Avisar et *al.*, 1989). Ils jouent un rôle très important dans la détoxification vue leur quantité importante (0.1 à 0.8% de protéines solubles cellulaires) et leur large distribution cellulaire (Favier, 2003 ; Milane, 2004).

➤ *L'hème oxygénase ou EC 1.14.93. (HO)*

Le système oxygénase permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer (Koolman et Rohm, 1999 ; Ryter et Tyrell, 2000). L'effet protecteur de l'HO contre le stress oxydant est indirect, puisqu'il est relié au fait que La biliverdine se transforme en bilirubine à activité antioxydante(Ryter et Tyrell, 2000). Le fer produit par l'activité de l'HO stimule la synthèse de la ferritine, qui est aussi impliquée également dans la réponse antioxydante (Milane, 2004).

b) Les systèmes endogènes non enzymatiques

Les protéines de stress thermique : Ces protéines interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines par un stress oxydant (Milane, 2004).

Parmi ces antioxydants se trouvent les thiols (SH) dont certains sont synthétisés in vivo, comme le glutathion (GSH)(Favier, 2003). Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol.L⁻¹(Halliwell et Gutteridge, 1999). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant.

c) Les systèmes exogènes antioxydants

Un piègeur de radicaux libres désigne toute substance capable de capter les électrons libres d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire (Schisler et Singh, 1989 ; Tillement, 2001). Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux. Les antioxydants d'origine alimentaire, comme l'ascorbate, les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols présents dans certains fruits et légumes (persil, oignon, myrtilles, cerises), exercent des effets protecteurs importants in vivo (Van Acker et al., 1996 ; Gardès et al., 2003 ; Halliwell et Gutteridge, 2007). Les oligoéléments (Se, Zn, Cu, Mn, ...) sont des cofacteurs indispensables pour les enzymes antioxydantes (Favier, 2003 ; Milane, 2004).

IV.3.2. Hépatotoxicité du foie :

La multiplicité des fonctions du foie, sa position anatomique, la sensibilité de ses cellules ainsi que son irrigation essentiellement veineuse font du foie un organe souvent sujet à plusieurs dysfonctionnements ou hépatotoxicité. Ces derniers sont causés par divers produits chimiques nocifs tels que le CCl₄, la consommation excessive d'alcool ou certains médicaments comme le paracétamol.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'hépatotoxicité d'origine médicamenteuse ou xénobiotiques présente des défis pour les consommateurs, les cliniciens et les organismes de réglementation. Il est admis, néanmoins, que les toxiques sont à l'origine d'environ 10 % des insuffisances hépatiques aiguës et de 5 % des ictères (Dossing et *al.*, 1993). Aux États-Unis, la première cause d'insuffisance hépatique nécessitant une transplantation est toxique (Navarro et *al.*, 2006). Une étude récente a ainsi recueilli sur trois ans, tous les cas symptomatiques déclarés de toxicité hépatique dans une région française (Sgroet *al.*, 2002). Elle a retrouvé une incidence de 14 cas par an pour 100000 habitants, un ratio femme/homme de 0,9 avant 49 ans et 2,6 après 50 ans, un taux d'hospitalisation de 12 % et une létalité de 6 % aiguë. C'est également l'une des raisons les plus courantes de l'arrêt des nouveaux médicaments lors des essais précliniques et du retrait des nouveaux médicaments après leur commercialisation.

Les dysfonctionnements hépatiques sont nombreux ; on n'en citera que quelques-uns :

La stéatose ou foie gras non alcoolique (NAFLD) est un terme clinico-pathologique qui englobe un spectre de maladies allant de la simple accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes (stéatose hépatique) à la stéatose hépatique avec inflammation (stéato-hépatite), fibrose et cirrhose (Browning et *al.*, 2004).

La nécrose hépatique ou la mort hépatocellulaire est présentée dans presque tous les types de maladies du foie, elle est d'origine virale, toxique ou métabolique. Elle se développe ultérieurement en inflammation fibrose ou cirrhose (Luedde et *al.*, 2014).

La fibrose hépatique est une augmentation anormale de la quantité du tissu conjonctif dans le foie d'étiologie diverse. Et avec le temps elle déclenche une perturbation d'architecture hépatique et cirrhose (Civan, 2018).

La cirrhose est une étape tardive de la fibrose hépatique, caractérisée par des nodules de régénération entourés par un tissu fibreux dense, et elle peut provoquer une hypertension portale et une insuffisance hépatique sévère (due à un trouble ou à une substance qui endommage le foie) (Civan, 2018).

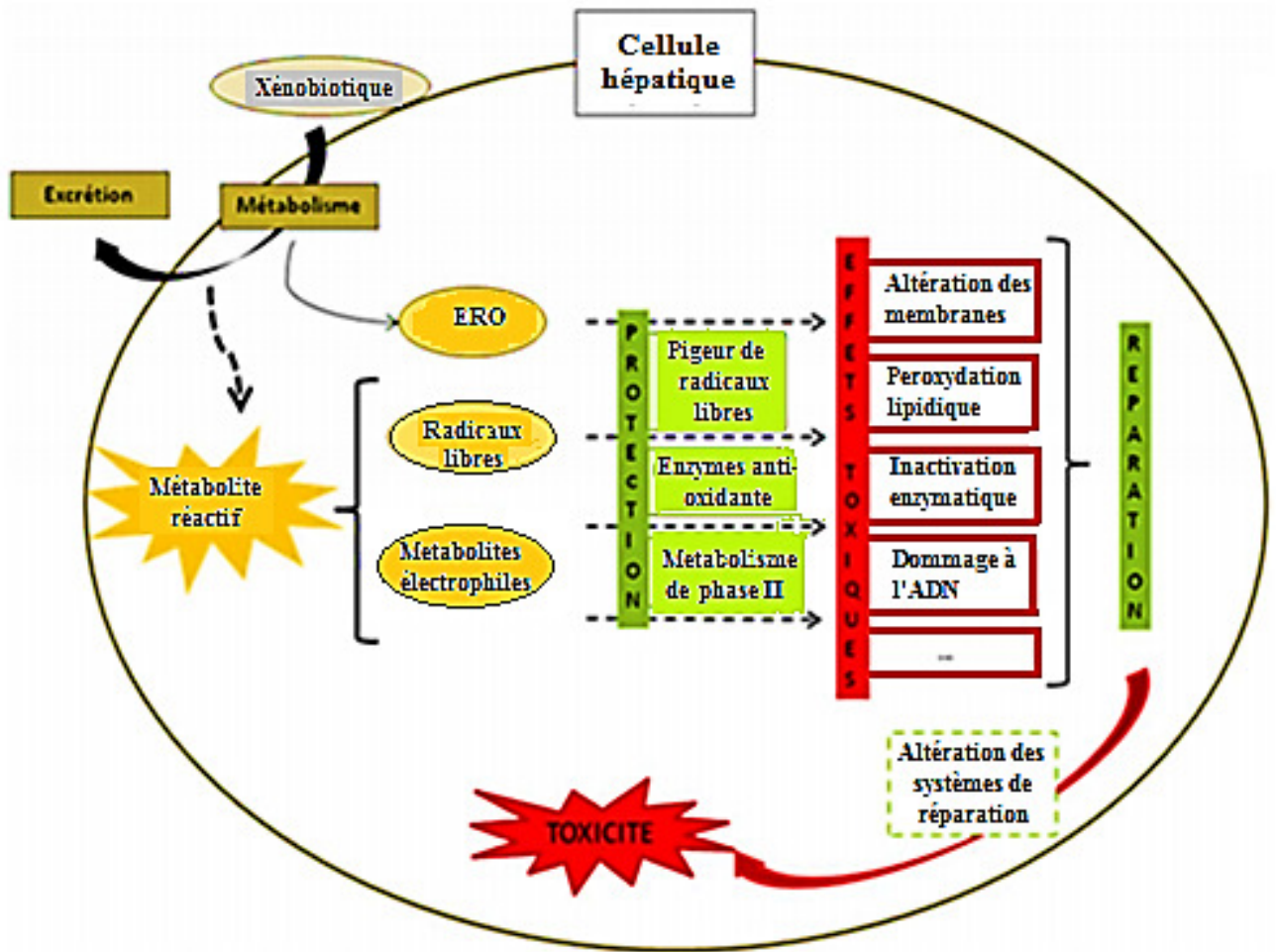


Figure 11: Schéma général du mécanisme aboutissant à une hépatotoxicité(Savary, 2014) :

Les voies principales de toxicité sont liées à la biotransformation chez l'Homme. La phase initiale de toxicité est la formation de métabolites réactifs (radicaux libres) et/ou d'ERO. Si les systèmes de protection piègeurs de radicaux libres ; enzymes antioxydantes ; métabolisme de phase II ; sont altérés des effets toxiques seront initiés. S'il est de même pour les systèmes de réparation, des dommages cellulaires seront inévitables.

V. Fonction rénale

Le système urinaire a pour fonction l'élimination des déchets cellulaires et des substances toxiques transportés par le sang. Les reins règlent le volume et la composition chimique du sang. Ils participent également à la régulation de la pression artérielle.

V.1. Données générales sur les fonctions rénales :

La structure des reins et de leurs néphrons permet de comprendre leurs multiples fonctions dans la régulation des liquides corporels.

V.1.1. Structure des reins et des voies urinaires

Le système urinaire est formé de deux reins, deux uretères, une vessie et un urètre. Chaque élément joue un rôle important dans l'élimination des déchets sous forme d'urine. Le rein est un organe pair très richement vascularisé, situé à l'arrière de l'abdomen, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Il est essentiel au fonctionnement de nombreux autres organes. Il comporte 2 régions bien distinctes : le cortex et la médullaire (Wallace, 1998) (Figure 12).

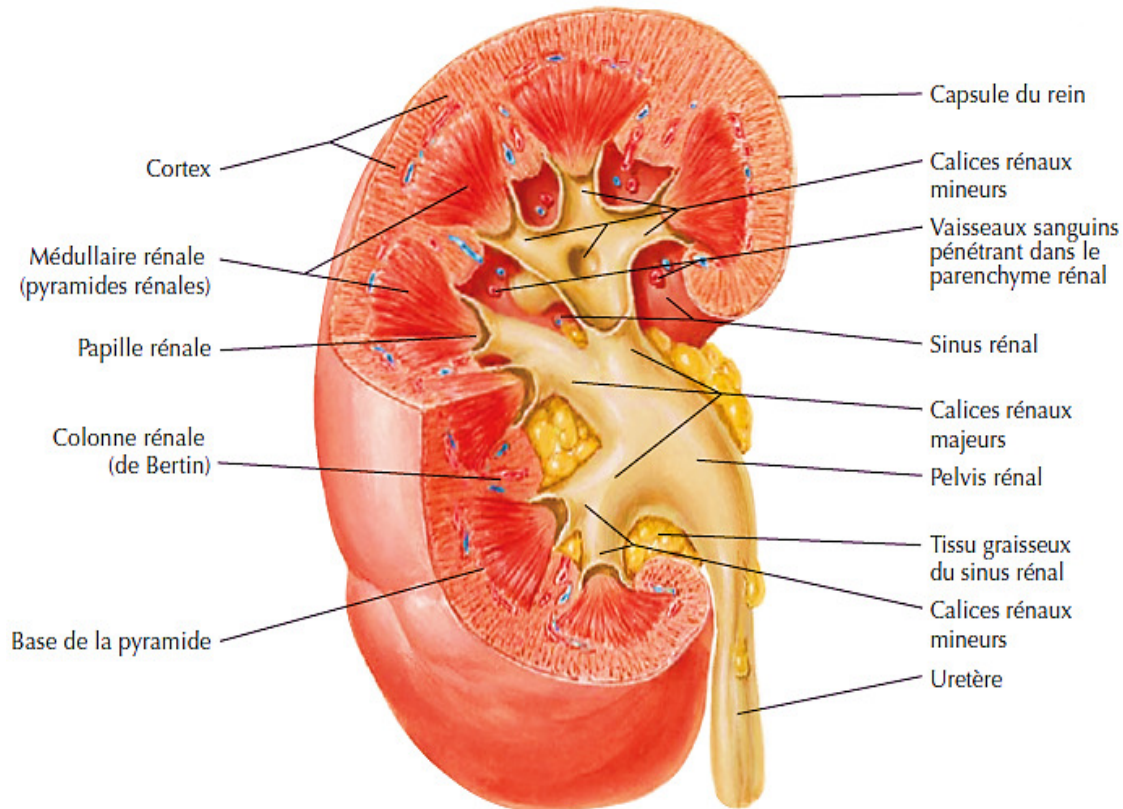


Figure 12: Face antérieure du rein droit coupé sur plusieurs plans, montrant le parenchyme et le pelvis rénal (Netter., 2011).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chaque rein est constitué, chez l'Homme, d'environ 1 million d'unités fonctionnelles appelées néphrons (Figure 13) (30 000 à 35 000 chez le rat). Les reins sont indépendants l'un de l'autre, si l'un est lésé ou ne fonctionne plus, l'autre peut tout de même fonctionner normalement.

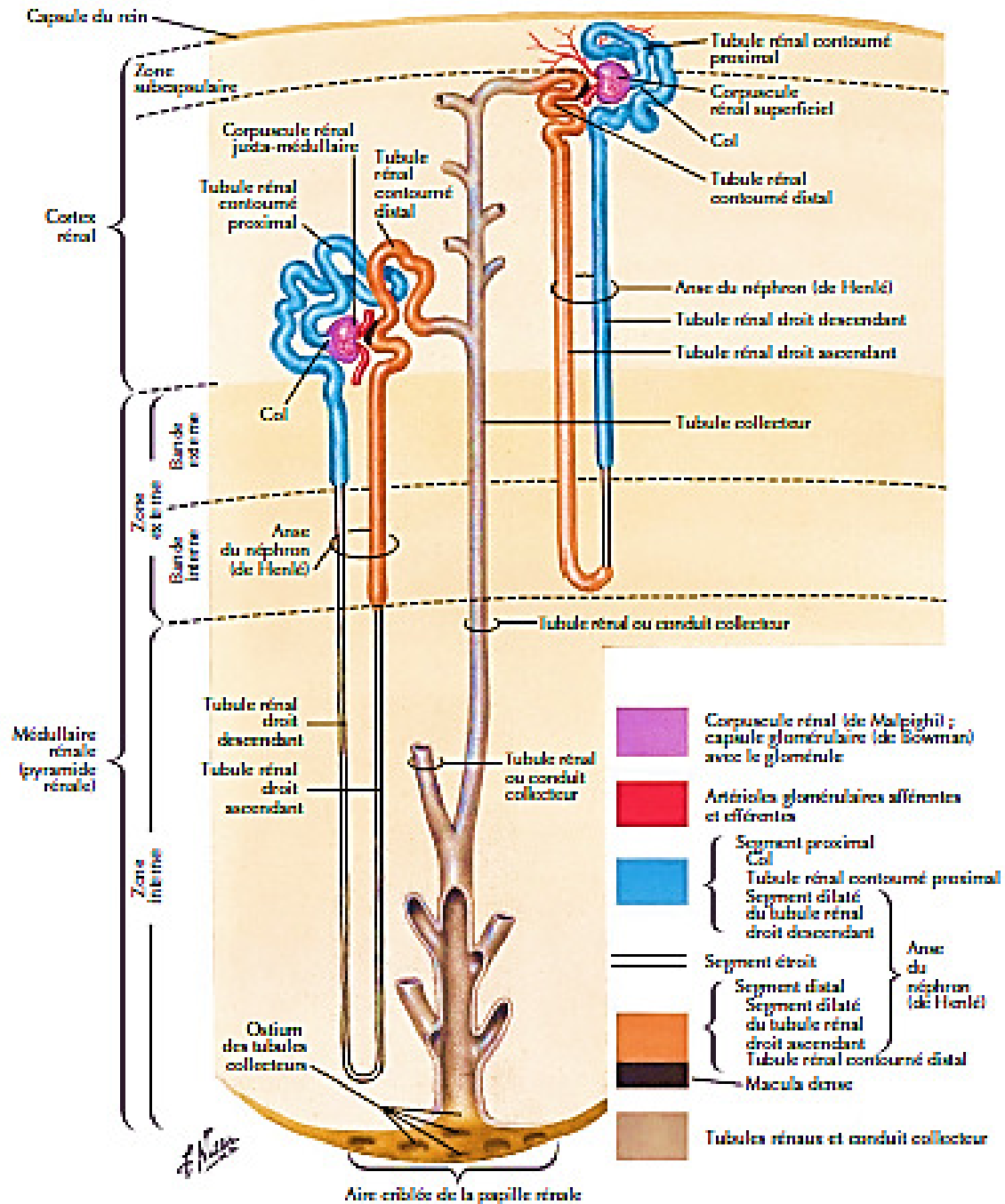


Figure 13: Schéma du néphron et tubule rénal (Netter, 2011)

Les néphrons sont situés à la fois dans le cortex et la médullaire, bien que leur plus grande partie soit située dans le cortex. Ils comportent deux parties principales, le corpuscule rénal ou corpuscule de Malpighi et le tubule rénal.

Le Corpuscule rénal

Il résulte de l'association de la capsule de Bowman qui représente l'extrémité invaginée du tube urinaire et un bouquet de capillaires émanant d'une artériole afférente (issue d'une artère interlobulaire) et convergeant vers une artériole efférente. Ce réseau de capillaire est appelé glomérule.

Le tubule rénal

Il s'étend de la capsule de Bowman jusqu'à sa jonction avec un tube collecteur. Ce tubule est formé du tube proximal, c'est la partie la plus longue et la plus contournée du tubule. L'anse de Henlé est le tube en forme de U responsable du transport de l'urine hors du néphron vers les calices. Elle est bordée par les tubes contournés proximal et distal et se caractérise par une branche descendante et une branche ascendante formant le U. Le tube contourné distal débouche vers le tube collecteur ou tube de Bellini à l'aide d'un canal d'union achevant ainsi la structure du néphron (Sokar, 2003). Les tubules collecteurs convergent vers le sommet des pyramides appelé papille rénale et se déversent dans les petits calices, lesquels à leur tour débouchent dans les calices majeurs qui s'ouvrent directement dans le bassin et rénal en forme d'entonnoir plus volumineux d'où les urines sont conduites à la vessie par l'uretère (Brunner et *al.*, 2006.).

V.1.2. Fonction des néphrons : formation de l'urine :

L'urine se forme dans les néphrons par un processus complexe comportant trois étapes :

La filtration glomérulaire du plasma des capillaires glomérulaires vers la lumière tubulaire. La réabsorption du liquide tubulaire vers la lumière des capillaires péri-tubulaires. La sécrétion tubulaire du plasma des capillaires péri-tubulaires vers la lumière tubulaire (Gougoux, 2005; Brunner et *al.*, 2006).

V.1.2.1. La filtration glomérulaire

Ce processus de filtration glomérulaire n'est pas très sélectif. En effet, Le sang passe par les capillaires glomérulaires, vaisseaux sanguins au début du néphron. À cet endroit, tout ce qui peut passer à travers la paroi des capillaires se retrouve dans le néphron, soit l'eau, l'urée, les sels minéraux et le glucose ; à l'exception des grosses molécules qui peuvent pénétrer dans les tubules rénaux (Kriz et Kaissling, 1985).

V.1.2.2. La réabsorption du liquide tubulaire

Le filtrat passe dans le tube contourné proximal, l'anse et le tube contourné distal. À ces endroits, il subit une réabsorption. Ce mécanisme est sélectif et il s'effectue entièrement par les cellules épithéliales des segments S1 et S2 des tubules contournés proximaux. Ainsi le glucose et les sels minéraux retournent dans le sang par les capillaires périlitubulaires.

V.1.2.3. La sécrétion tubulaire

En parallèle de la réabsorption du liquide tubulaire, le sang se débarrasse d'autres déchets, comme les ions acides H^+ , et les envoie dans le filtrat final "l'urine".

L'urine se rend ensuite dans le tube collecteur, puis vers le calice et le bassinnet du rein. Elle est transportée hors des reins par les uretères et amenée dans la vessie, avant d'être excrétée hors de l'organisme par l'uretère (Wallace., 1998).

L'urine est un liquide stérile composé principalement de l'eau, de l'urée, de l'acide urique, de l'ammoniaque, des électrolytes ainsi que des toxines exogènes. Sa production est d'environ 1,5 litres/24 heures chez une personne normale. Elle est dépourvue de protéines, de glucides ou de lipides. La présence de l'un de ces substances dans l'urine témoignerait de l'existence d'une pathologie (Touhami, 2008).

V.1.3. Fonctions des reins :

La fonction la plus importante des reins est de maintenir constants le volume, la tonicité et la composition des liquides corporels (homéostasie). Cette fonction essentielle des reins requiert la filtration continue, au niveau du glomérule, de grandes quantités de liquide plasmatique qui est ensuite presque complètement réabsorbé par le tubule.

Le rein corrige les changements du contenu d'eau et d'électrolytes dans l'organisme en adaptant rapidement leur excrétion urinaire et en maintenant ainsi leur bilan externe constant (Gougoux, 2005). Cette fonction des reins qui consiste à épurer les liquides corporels des produits de déchets endogènes et exogènes est bien connue. D'abord, les reins excrètent les déchets métaboliques azotés, tels que l'urée et la créatinine, et de nombreuses substances exogènes anioniques ou cationiques, qu'elles soient ingérées accidentellement ou prises comme médicaments (Gougoux, 2005).

De plus, le rein accomplit plusieurs autres fonctions, comme la conservation ou l'élimination des substances organiques et la sécrétion de diverses hormones contribuant à la régulation de la pression artérielle systémique, à la production des globules rouges par la moelle osseuse et à la minéralisation de l'os (Gougoux, 2005).

Le rein est à la fois l'organe effecteur de nombreux système hormonaux et un véritable organe endocrine capable de réguler le métabolisme des petites hormones polypeptidiques mais aussi de fabriquer des hormones ou des médiateurs d'action locale (Hannedouche, 2007).

V.1.3.1. Catabolisme rénal des hormones polypeptidiques :

Le rein assure la dégradation et le catabolisme des hormones peptidiques tels que l'insuline, le glucagon, parathormone, la calcitonine, l'hormone de croissance, de façon générale le catabolisme des protéines de petit poids moléculaire, chaînes légères d'immunoglobuline, bêta 2-microglobuline ; tous ces petits polypeptides sont librement filtrés par le glomérule, réabsorbés au niveau du tube proximal où ils sont dégradés. Il s'agit d'un important mécanisme de régulation de l'activité hormonale à court terme puisque toute élévation de la concentration circulante d'une hormone polypeptidique augmente la charge filtrée et par la suite l'élimination rénale (Hannedouche, 2007).

V.1.3.2. Hormones agissant sur le rein :

- **L'hormone antidiurétique** (ADH ou arginine vasopressine) est un peptide libéré par la posthypophyse. Elle provoque la réabsorption d'eau dans les tubes collecteurs.
- **L'aldostérone** est une hormone stéroïdienne produite par le cortex surrénal qui stimule la réabsorption de sodium dans le tube collecteur.
- **Le peptide atrial natriurétique** (ANP) est produit par les cellules cardiaques et stimule l'excrétion de sodium dans les tubes collecteurs.
- **L'hormone parathyroïdienne** (PTH) est une hormone polypeptidique produite par la glande parathyroïde qui stimule l'excrétion rénale de phosphate, la réabsorption de calcium et la production de la vitamine D.

V.1.3.3. Hormones produites par le rein :

- **La rénine**, indispensable à la régulation de la tension artérielle ; c'est une protéine libérée par l'appareil juxta-glomérulaire. La rénine stimule la formation d'angiotensine II ; qui est un puissant vasoconstricteur et stimule la réabsorption de sodium soit directement, soit via la production d'aldostérone.
- **Le calcitriol**, ou 1,25-dihydroxycholécalférol forme active de la vitamine D, c'est une hormone stéroïdienne métabolisée par le rein qui permet l'absorption du calcium et du phosphate par l'intestin et sa fixation dans les os, afin de garantir leur bon état et leur robustesse.
- **L'érythropoïétine** (EPO) est une hormone glycopeptidique produite dans le rein qui agit sur la moelle osseuse pour produire des globules rouges en quantité suffisante pour véhiculer

l'oxygène dans l'organisme. L'érythropoïétine est la principale hormone régulant la masse globulaire.

- **Les prostaglandines** sont produites par le rein, elles ont de nombreux effets notamment sur la vascularisation rénale et la natriurèse.

- **L'IGF1** (Insulin-like Growth Factor 1) et **l'EGF** (Epidermal Growth Factor) sont des hormones polypeptidiques qui interviennent localement dans la croissance ou la régénération des cellules tubulaires rénales.

V.2. Les lithiases rénales

Le mot « Lithiase » vient du grec lithos (pierre) et « Calcul » vient du latin calculus (cailloux) (Rieu, 2005). Elle signifie la présence de concrétions solides (calculs) organiques ou minérales à l'intérieur des canaux glandulaires, des conduits naturels ou cavités organiques.

Dans le cas de la lithiase rénale, il s'agit de la formation de concrétions au niveau du rein.

La formation d'un calcul n'est pas un processus continu irréversible mais relève d'une succession d'étapes. Ces dernières se déroulent sur des périodes de temps très variables, certaines pouvant être considérées comme instantanées ou rapides et nécessitent quelques secondes alors que d'autres, au contraire, sont beaucoup plus lentes, c'est-à-dire capables de se dérouler en quelques minutes voire quelques heures (Daudon et *al.*, 1994). Le calcul est un produit pathologique qui contient dans sa structure et sa composition cristalline les informations nécessaires à l'identification des processus biochimiques, particulièrement des processus pathogènes qui sont responsables de sa formation (Daudon et *al.*, 2001).

En général, la formation du calcul dans le rein comporte essentiellement 4 étapes (Mandel, 1994 ; Bigelow et *al.*, 1998):

- L'apparition d'une insoluble particule ou sursaturation urinaire
- l'augmentation de la taille des particules formées
- La rétention des cristaux en un niveau quelconque des voies excrétrices (Nucléation)
- La croissance du calcul à partir du nucleus ainsi constitué.

La masse minérale se fixe toujours sur une masse organique de nature protéique présente à la surface des cellules. Le calcul est donc composé d'une trame protéique associée à la substance cristalline, cette masse organique représente 2 à 3% du poids sec du calcul (Herremans et *al.*, 1993; Sokar, 2003).

L'origine de la lithiase rénale est encore mal connue. Cependant, on peut dire que tous les facteurs qui favorisent la sursaturation urinaire en un élément cristallin donné favorisent la lithiase. Il peut y avoir donc ; une hyperabsorption digestive, un apport alimentaire excessif, un désordre métabolique, un pH urinaire trop faible ou trop élevé, une diurèse réduite, des

troubles tubulaires (Sokar, 2003). Les calculs peuvent aussi apparaître quand certaines substances qui empêchent normalement la formation de cristaux dans l'urine (inhibiteurs de cristallisation), comme le citrate, le magnésium, la nephrocalcine et l'uropontine, sont présentes en quantité insuffisante (Brunner *et al.*, 2006).

Les cristaux urinaires sont constitués principalement de plusieurs espèces cristallines : oxalates de calcium, phosphates de calcium et acide urique (Daudon et Jungers, 1991 ; Grases *et al.*, 1998 (a); Famularo *et al.*, 2000; Saltel *et al.*, 2000; Moyano- Calvo *et al.*, 2001; Daudon *et al.*, 2004). Il existe plusieurs types de lithiases rénales, nous ne citerons que celles dont la fréquence dépasse 10% :

V.2.1. La lithiase calcique

C'est la forme la plus fréquente, représentant 70- 80% des lithiases rénales. Cette famille comprend tous les calculs dont une partie est formée par du calcium et l'autre par de l'oxalate, du phosphate, ou une combinaison des deux. Les calculs oxalo-calciques sont les plus fréquents dans les pays industrialisés et représentent 80 % des calculs rénaux (Daudon *et al.*, 1993 ; Atmani *et al.*, 2003). Parmi les facteurs importants pour la genèse de ces lithiases, l'hyperoxalurie, l'hypercalciurie, l'hyperuricurie, l'hypocitraturie et l'acidité urinaire (Hess et Jaeger, 1995).

Dans la lithiase oxalo-calcique, le mécanisme de la lithogénèse est multifactoriel et complexe. Il fait intervenir un déséquilibre entre une concentration excessive en solutés promoteurs et une teneur insuffisante en substances inhibitrices. Les urines des sujets normaux sont souvent sursaturées par différents sels de calcium, notamment l'oxalate de calcium, bien qu'ils ne forment pas de calculs. Ceci suggère que la sursaturation est contrebalancée par la présence de substances s'opposant à la formation des cristaux dans l'urine, désignées sous le nom d'inhibiteurs de la cristallisation (Paulhac *et al.*, 2002).

Concernant le traitement, il n'y a pas de médicaments dissolvant les calculs oxalophospho-calciques. Les thérapeutiques médicales sont surtout préventives et cherchent à réduire les perturbations biologiques lithogènes (Thomas et Thomas, 1987).

Il existe différents types de produits qui augmentent la solubilité des substances précipitantes tel que, le citrate, l'acide phytique, le fluorure et le magnésium (Pak, 1991 ; Conte *et al.*, 1999 ; Cheng *et al.*, 1992 ; Ettinger *et al.*, 1997). Il ya également des substances organiques inhibitrices de la lithiase de type protéique, tel que la néphrocalcine qui est synthétisée par les cellules de l'épithélium rénal, le Tamm-Horsfall qui est une glycoprotéine sécrétée au niveau de la branche ascendante de l'Anse de Henlé (Berland et Dussol, 1993 ; Gokhale *et al.*,

1996). Ces protéines ont été isolées dans les urines et exercent normalement un effet inhibiteur sur la cristallisation, elles s'adsorbent sur la surface cristalline ; empêchant ainsi la croissance et la maturation du calcul (Doré et Dussol, 1998). Nous pouvons citer aussi la prothrombine, l'uropontine et la lithostatine rénale (Berland et Dussol, 1993; Saklayen, 1997).

Certains auteurs postulent que les hormones sexuelles femelles exercent un effet inhibiteur sur la lithiase calcique. Ceci pourrait donner une explication à propos de la faible fréquence de cette maladie chez les femmes (Iguchi et al., 1999).

V.2.2. La lithiase urique

Elle représente 5 à 10 % de l'ensemble des lithiases, et sa fréquence est différente selon les pays ou les régions (Dana, 2001 ; Chevallier, 2005). 70 à 80% des lithiases uriques surviennent chez l'homme et surtout après 40 ans (Bouvenot et al., 1994). Cette maladie ne se voit guère chez la femme qu'à partir de la ménopause (Thomas et Thomas, 1987 ; Saklayen, 1997). Elle est favorisée par l'hyperuricurie, le pH urinaire acide (<5,5) et le faible volume de la diurèse qui, à la fois, abaisse le pH urinaire et augmente la concentration de l'acide urique (Doré, 2004 ; Bouvenot et al., 1994 ; Grases et al., 1995 ; Dana, 2001 ; Riese et Sakhae, 1992).

L'excrétion urinaire d'acide urique peut être augmentée en cas de défaut de réabsorption tubulaire et d'apport protidique important (Lopez et al., 2000). Son traitement préventif est basé sur l'alcalinisation des urines qui empêche la cristallisation de l'acide urique par des produits qui maintiennent le pH urinaire à 7 ou à 8, tel que le bicarbonate de Na, le citrate de K et la pipérazine (Bouvenot et al., 1994 ; Thomas et Thomas, 1987).

V.2.3. La lithiase phospho-ammoniac-magnésienne

Elle représente environ 15% de l'ensemble des lithiases (Lopez et al., 2000). C'est une lithiase qui atteint essentiellement les femmes jeunes et dans la très grande majorité des cas, il s'agit des femmes ayant une infection urinaire par *Proteus mirabilis* (Aboulker et al., 1971). Ce germe uréasique utilise l'urée comme substance énergétique et la transforme en gaz carbonique et ammoniac, ceci rend le pH (>6,5) urinaire alcalin et favorise la formation des calculs surtout en présence d'ammoniac (Baguet, 2000, Grases et al., 1995 ; Bouvenot et al., 1994). Le traitement médical consiste à irradier l'infection, maintenir une diurèse importante et à acidifier les urines pour favoriser la dissolution du calcul (Thomas et Thomas, 1987).

VI. Modèles comportementaux et fonctionnels

Par définition, un modèle expérimental est une représentation simplifiée d'un processus biologique qui ne peut pas être étudié chez l'Homme soit pour des raisons techniques, économiques ou éthiques. Un modèle animal de comportement essaie de reproduire un symptôme d'un désordre, un groupe de symptômes et même un syndrome. La conception d'un tel modèle peut inclure diverses manipulations comprenant des lésions cérébrales, des élevages sélectifs et l'application d'une diversité de facteurs qui peuvent être impliqués dans l'étiologie du désordre considéré. Ces manipulations conduisent à l'obtention d'un état comportemental qui est utilisé comme un outil pour étudier les différents aspects du désordre modélisé : son étiologie, son traitement et ses bases physiologiques. Pour des raisons économiques et pratiques c'est souvent les souris ou les rats qui sont utilisés. Cependant, parmi les contraintes majeures rencontrées lors de la conception de ces modèles c'est l'impossibilité d'affirmer l'existence chez les animaux d'états subjectifs analogues à ceux de l'Homme et qui sont souvent rencontrés dans la douleur ou encore dans les troubles affectifs et comportementaux.

VI.1. Les modèles d'étude de la nociception

Un modèle comportemental de douleur doit satisfaire les critères suivants (Bars et *al.*, 2001):

1. Spécificité : le stimulus doit être nociceptif.
2. Dans un modèle comportemental de nociception, il doit être possible de différencier entre la réponse à un stimulus nociceptif et la réponse à un stimulus non nociceptif. En d'autres termes, la réponse mesurée doit être déclenchée exclusivement ou de préférence par le stimulus nociceptif.
3. Sensibilité : la réponse mesurée doit être appropriée à un type particulier de stimulus et dépendant de son intensité.
4. Le modèle doit être sensible aux essais pharmacologiques. Il doit montrer notamment l'effet anti nociceptif des différentes classes d'analgésiques à des doses comparables à celles utilisées chez l'Homme.
5. Validité : Le modèle doit permettre de différencier les changements comportementaux non spécifiques (motilité, attention) de ceux engendrés par le stimulus nociceptif lui-même.
6. La consistance de scores doit être obtenue quand les animaux sont retestés avec une épreuve identique ou une forme équivalente de l'épreuve.
7. Reproductibilité : Les résultats obtenus pour un test doivent être reproductibles non seulement dans le même laboratoire mais aussi dans différents laboratoires.

En général, les tests nociceptifs peuvent être classés soit selon la nature du stimulus appliqué (mécanique, thermique, chimique ou électrique) soit en se basant sur la durée de l'application du stimulus. Selon ce critère, on distingue :

* Tests utilisant un stimulus de courte durée (la douleur phasique). Dans ce cas, la durée du stimulus pourrait être de l'ordre de quelques secondes. En général, ce genre de tests a un site de stimulation somatique plutôt que viscéral et implique la stimulation d'une surface minimale. Le stimulus nociceptif est soit thermique, mécanique ou électrique. Dans le cas des tests utilisant un stimulus thermique, c'est toujours la peau qui est stimulée. C'est l'exemple du test d'immersion de la queue dans l'eau chaude et du test de la plaque chauffante.

* Tests basés sur l'application d'un stimulus à longue durée : généralement, ces tests emploient un stimulus chimique irritant ou algogène. Plusieurs substances algogènes sont utilisées tel que : le formaldéhyde, la capsaïcine, l'acide acétique... Ces tests diffèrent des précédents par le fait que dans ce cas, on utilise une approche quantitative du comportement observé et non pas le seuil de la réaction nociceptive (ex : test de contorsions, test au formol).

VI.2. Modèle comportemental de la dépression :

Il existe plusieurs modèles animaux visant à mimer la dépression chez les rongeurs. Bien que leur méthodologie soit différente, le principe reste le même, mettre l'animal dans une situation aversive et étudier son comportement et ses réactions adaptatives. Le test de la nage forcée (*test de Porsolt*) constitue un modèle chez l'animal de désespoir chez l'animal (Nath et *al.*, 1988). En effet, ce comportement caractéristique d'immobilisation qu'on observe chez l'animal, reflète l'état de désespoir comparable à celui observé chez les dépressifs humains (Porsolt et *al.*, 1977). Le principe de ce test consiste à mettre l'animal dans une cuve remplie d'eau, l'animal est forcé de nager jusqu'à l'épuisement dans l'espoir de fuir. L'animal alterne des phases de nage avec des phases d'immobilité caractéristique de la résignation et donc du désespoir. Selon ce test, la dépression serait un comportement de désespoir.

VI.3. Modèles comportementaux d'anxiété

Selon Clement et Chapouthier (1998), les modèles animaux d'anxiété sont divisés en deux groupes :

* Modèles basés sur une situation de conflit (peur conditionnée), c'est notamment le cas du test du choc électrique ou il y a association entre un stimulus négatif (choc électrique) avec une récompense (eau et nourriture).

* Modèles basés sur le caractère aversif spontané que représente un milieu nouveau pour l'animal (peur non conditionnée). En effet, le fait d'introduire l'animal de force dans un milieu nouveau dépourvu de ses repères familiers constitue une situation très aversive et anxiogène (situation contraignante). Cette situation a pour effet d'entraîner une inhibition du comportement général de l'animal dans ce compartiment non familier. C'est le cas du test de "l'open field", test du labyrinthe en croix surélevé, test de l'escalier ou le test de la chambre claire/obscur. Dans ce dernier test, l'animal est introduit dans un milieu non familier fortement éclairé mais tout en ayant la possibilité de se soustraire dans un compartiment également inconnu mais moins anxiogène et plus sécurisant du fait de l'obscurité qui y règne. Une augmentation du temps de latence d'entrée dans le compartiment obscur, une augmentation du nombre de transitions effectuées entre les deux compartiments et une diminution du temps passé dans le compartiment obscur sont un indice d'une anxiété réduite (Clement et Chapouthier, 1998).

VI.4. Aperçu sur les méthodes de tests de l'activité antilithiasique :

Le rat est l'animal le plus utilisé dans les modèles du dépôt des cristaux d'oxalate de calcium dans les reins, un processus imitant la formation des calculs rénaux chez les humains (Atmani et *al.*, 2004). Le choix de cette espèce repose sur son métabolisme d'oxalate qui est proche de celui de l'Homme et sur sa disponibilité. Par conséquent, la lithiase oxalocalcique chez le rat est similaire à celle de l'Homme (Khan et Hackett., 1985 ; Khan, 1991 ; Khan, 1995).

Dans la majeure partie des cas, pour créer un modèle expérimental de rat porteur de lithiase, on a eu recours à l'éthylène glycol (EG) (Cheng et *al.*, 1992 ; Khan et Glenton, 1995 ; Grases et *al.*, 1998 (a) ; Iguchi et *al.*, 1999 ; Yasui et *al.*, 1999 (a, b)).

L'étude expérimentale réalisée chez l'animal a prouvé que l'EG est le responsable de la formation des cristaux d'oxalate de calcium dans les reins (Robinson et *al.*, 1990). Une telle action est sexe dépendante : les femelles des rats développent la lithiase à des doses plus élevées par rapport aux males. Cette remarque a été discutée dans la littérature, certains auteurs suggèrent que cette différence peut être expliquée par la grande aptitude des rats males à transformer l'EG en oxalate (Melnick, 1984 ; Depass et *al.*, 1986). Expérimentalement, il existe plusieurs processus pour élaborer le modèle expérimental de rats lithiasiques à l'aide de l'EG.

Le modèle chronique : L'EG est fourni *ad-libitum* dans l'eau de boisson à une dose de 0.75%, il faudrait 30 à 42 jours pour créer la lithiase (Gokhale et *al.*, 1996 ; Sarika et *al.*, 1996 ; Sarika et *al.*, 1999). L'EG peut être aussi apporté par gavage quotidiennement en présence

de la vitamine D3. Les cristaux sont bien développés au bout de 28 jours (Iguchi et *al.*, 1999 ; Yasui et *al.*, 1999 (a, b)). La vitamine D3 étant un facteur qui favorise le dépôt des cristaux d'oxalate de Ca⁺⁺ à partir d'une dose orale d'au moins 0.75 % d'EG pendant une durée de 4 semaines (De Water et *al.*, 1996).

Une autre méthode a été proposée récemment par Atmani et *al.*, (2003). Elle consiste à fournir l'EG *ad-libitum* dans l'eau de boisson à une dose de 0.75 % pendant 5 semaines. Le dépôt des cristaux est amorcé en associant, pendant les 3 premiers jours, le chlorure d'ammonium (1 %) à l'EG (0.75 %).

Le modèle accéléré : Il s'agit d'apporter dans l'eau de boisson *ad-libitum* 0.75 % d'EG avec 2% de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Les cristaux se forment à partir du 7^{ème} jour. Le NH₄Cl diminue le pH urinaire et favorise la formation de l'oxalate de Ca⁺⁺ (Khan et Glenton, 1995 ; Gokhale et *al.*, 1996 ; Grases et *al.*, 1998 a).

VI.5. Aperçu sur les méthodes d'étude de l'activité hépatoprotectrice :

L'hépatotoxicité d'origine médicamenteuse ou xénobiotiques présente des défis pour les consommateurs, les cliniciens et les organismes de réglementation. Il est admis, néanmoins, que les toxiques sont à l'origine d'environ 10 % des insuffisances hépatiques aiguës et de 5 % des ictères (Dossing et *al.*, 1993).

Les modèles de lésions hépatiques d'origine médicamenteuse se divisent généralement en deux formes : intrinsèques et idiosyncrasiques.

VI.5.1. Modèles de lésions hépatiques intrinsèques induites par des médicaments

Les modèles animaux de lésions hépatiques intrinsèques induites par des médicaments sont simples en ce qui concerne la technique. Dans la plupart des cas, on peut simplement traiter les animaux avec une forte dose du médicament en question pour provoquer une hépatotoxicité. Cependant, la bonne utilisation de ces modèles nécessite une compréhension de base des mécanismes de toxicité de chacun d'entre eux. Les deux modèles de loin les plus courants dans la recherche sur l'hépatotoxicité intrinsèque induite par les médicaments sont l'acétaminophène (APAP) et le tétrachlorure de carbone (CCl₄).

La molécule de CCl₄ est métabolisée par les monooxygénases dépendantes du cytochrome P450, principalement par l'isoforme CYP2E1 dans le réticulum endoplasmique et les

mitochondries. (McGill *et al.*, 2012) L'hépatotoxicité est produite par la formation du radical trichlorométhyl (CCl₃) qui est très réactif. Ces radicaux peuvent saturer le système de défense antioxydant de l'organisme, réagir avec les protéines, attaquer les acides gras insaturés, générer une peroxydation lipidique, réduire la quantité de cytochrome P450, ce qui conduit à une défaillance fonctionnelle ayant pour conséquence une diminution des protéines et une accumulation de triglycérides (foie gras), et modifier l'équilibre en eau et en électrolytes avec une augmentation des enzymes hépatiques (Cubero *et al.*, 2016). La peroxydation des lipides entraîne une cascade de réactions, telles que la destruction des lipides membranaires, la génération de substances toxiques endogènes, qui sont à l'origine d'un plus grand nombre d'hépatites et d'anomalies fonctionnelles. Pour cette raison, la peroxydation des lipides est considérée comme un facteur critique dans la pathogénèse des lésions hépatiques induites par le CCl₄(Jaeschke *et al.*, 2014). L'inhibition de la génération du radical CCl₃ est un point clé dans la protection contre les dommages générés. Pour cette raison, on a opté pour ce modèle pour l'évaluation des extraits de notre plante.

VI.5.2. Modèles de lésions hépatiques idiosyncrasiques induites par des médicaments

L'étude des lésions hépatiques induites par les médicaments chez les animaux pose des défis techniques plus importants. Pour obtenir une réaction indésirable d'un médicament connu par induisant des lésions hépatiques d'origine médicamenteuse chez l'Homme, il faut généralement un prétraitement ou une modification génétique visant à prédisposer les animaux à ces lésions. Bien entendu, tout prétraitement de ce type est susceptible d'affecter la pertinence clinique du modèle. Les trois principales approches utilisées jusqu'à présent impliquent soit l'induction d'une inflammation, soit la suppression de la tolérance immunitaire, soit la manipulation génétique de la fonction mitochondriale (Roth *et al.*, 1997 ; Leach *et al.*, 1941, Dickes *et al.*, 1957 ; Buchweitz *et al.*, 2002 ; Larrey *et al.*, 2013.).

Partie II : MATERIEL ET METHODES

Chapitre I :ETUDE PHYTOCHIMIQUE

Dans cette partie, et après identification de notre plante, nous avons procédé à la préparation des extraits éthanolique (extrait total), hexanique, d'acétate d'éthyle et butanolique de *Caralluma europaea* ensuite nous avons fait les dosages des composés phénoliques puis l'analyse par HPLC des polyphénols et enfin nous avons déterminé l'activité anti-oxydante de chaque extrait.

I. Matériel végétal

Caralluma europaea dont le nom commun au Maroc est EDDAGHMOUS, (Iloulaguen en Amazigh) est collectée dans la région de Beni Mellal à partir d'avril 2014. L'identification de l'espèce a été réalisée par le professeur A. Ouhammou, Laboratoire d'Ecologie et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. Un spécimen est gardé dans l'herbier de la Faculté des Sciences Semlalia au département de Biologie (Université Caddi Ayyad Marrakech-Maroc).

II. Matériel technique

Matériel : Séchoir ; Pulvérisateur, Broyeur électrique ; balance; erlenmeyers ; agitateur magnétique ; baguette d'agitation ;entonnoirs ; papier filtre; coton; cuves à couvercle; spatules, ballons; rota-vapeur ; balance analytique de précision ; ampoule à décanter ;flacons ; pipettes et micropipettes ; éprouvettes graduées ; bain marie ; tubes à essai ; pincettes, spectrophotomètre ;

Solvants et réactifs : Ethanol ; Hexane ; Acétate d'éthyle ; n-Butanol ;eau distillée ; réactif du Folin-Ciocalteu ; carbonate de sodium; acide gallique; Le trichlorure d'aluminium; nitrite de sodium; la vanilline; méthanol

III. Préparation des extraits de *Caralluma europaea*.

Les parties aériennes de la plante ont été séchées à l'ombre et à température ambiante. Elles sont ensuite pulvérisées puis conservées soigneusement à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à leur utilisation.

Les parties aériennes séchées de *Caralluma europaea* en poudre (100 g) ont été extraites par macération à l'éthanol (2L) pendant 24 h. Elles ont été filtrées puis ré-extraites par le même solvant pour une extraction complète(Figure14). Les deux extraits ont été mélangés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Figure16) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec "l'extrait brut d'éthanol".

Ce résidu a été dissous dans de l'eau distillée chaude (100 ml) et transféré dans une ampoule à décanter puis soumis à des épuisements successifs par des solvants de polarité croissante telles que; l'hexane, l'acétate d'éthyle et le butanol(Figure15) (Khamis Al-Jadidi et Hossain, 2015).

III.1. Epuisement par l'hexane.

La solution aqueuse est épuisée (trois fois) par l'hexane. Cette étape a pour but l'extraction des pigments et des matières grasses. La solution hexanique est par la suite évaporée à sec. À l'aide d'un évaporateur rotatif le résidu obtenu est **l'extrait héxanique** et il est soluble dans l'eau.

III.2. Epuisement par l'acétate d'éthyle.

Cette étape a été réalisée comme précédemment (5 à 7fois). Cet épuisement permet l'entraînement de certains alcaloïdes et flavonoïdes. La température de l'évaporateur rotatif ne doit pas dépasser 40°C pour éviter le risque de dégradation. Le résidu obtenu est l'extrait d'acétate d'éthyle et il est partiellement soluble dans l'eau.

III.3. Epuisement par le butanol.

Cette étape a pour but l'entraînement maximal des alcaloïdes, flavonoïdes et tanins. Le résidu obtenu est l'extrait butanolique riche en alcaloïdes, flavonoïdes et tanins, en plus il est soluble dans l'eau.



Figure 14: Extraction par macération

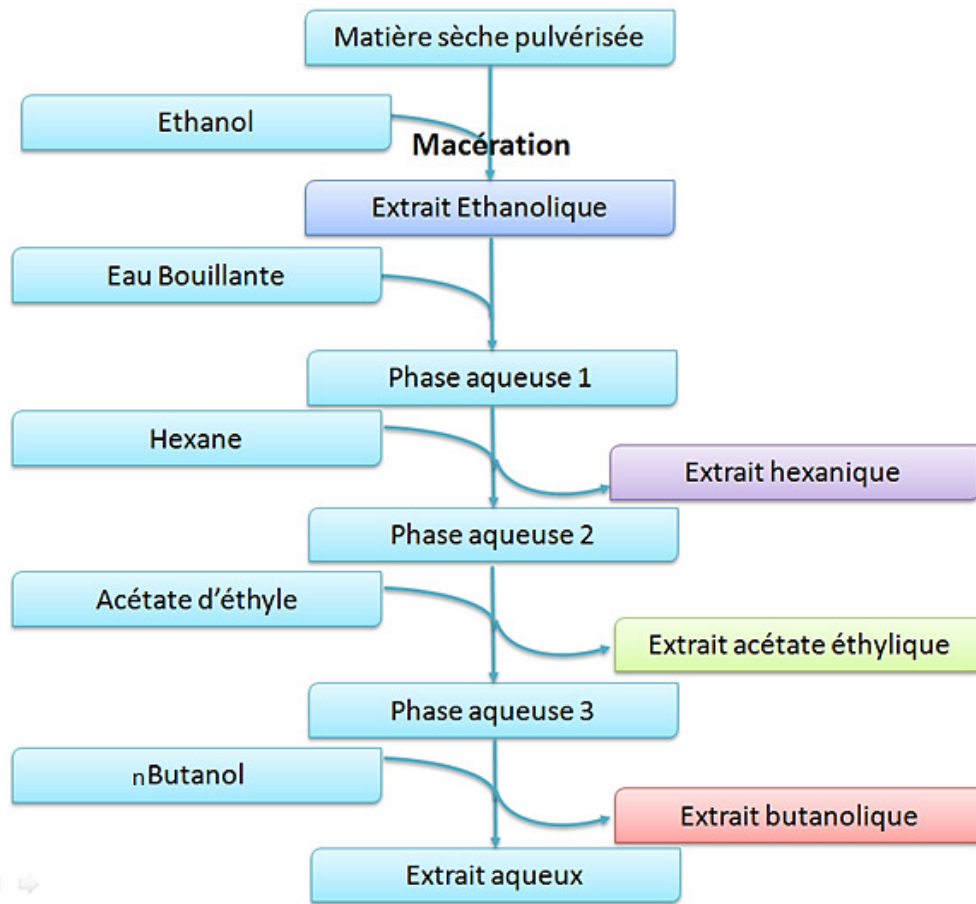


Figure 15: Schéma du protocole expérimental d'extraction de la matière sèche

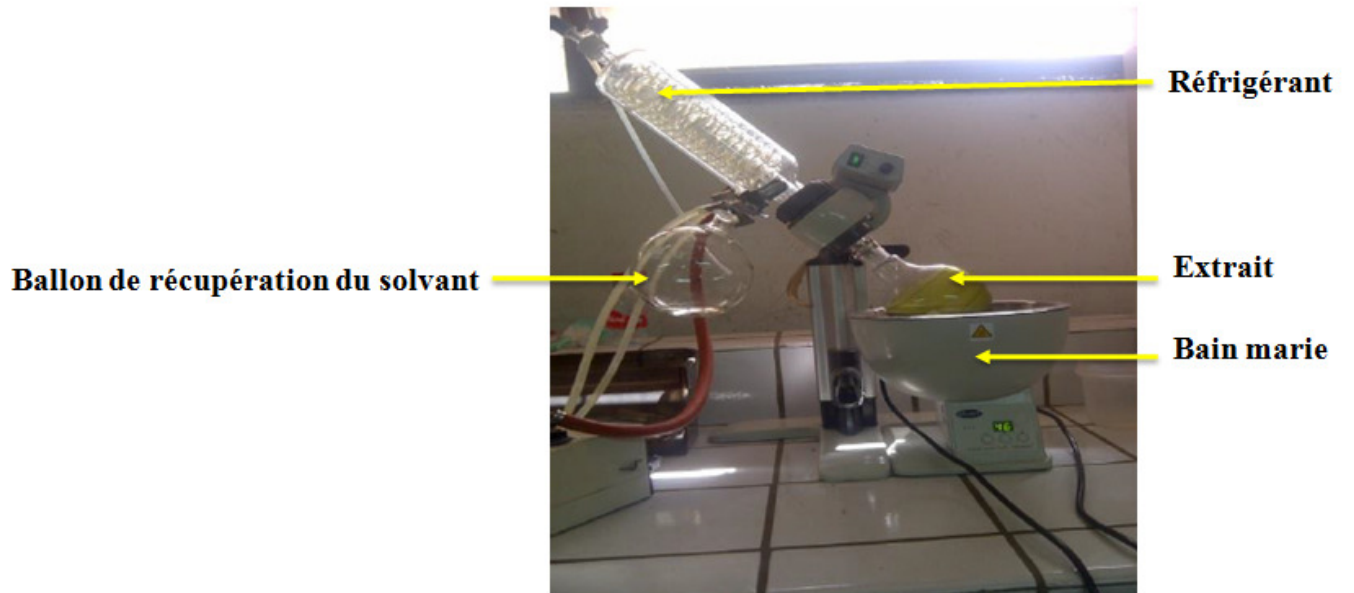


Figure 16: Montage de récupération de l'extrait sec par l'évaporateur rotatif

IV. Dosage des composés phénoliques

L'étude bibliographique de quelques plantes du genre *Caralluma* a montré qu'elles sont riches en composés phénoliques et afin d'établir la composition phytochimique des extraits de notre plante, on a réalisé un dosage spectrophotométrique de ces composés phénoliques à savoir le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins.

IV.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits de la plante a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode du Folin-Ciocalteu (Catalano et al., 1999). Un volume de 200 µl de chaque extrait a été mélangé avec 3,9 ml d'eau distillée et 100µl du réactif du Folin-Ciocalteu. Le mélange est laissé reposer à température ambiante pendant 3 minutes, puis 1 ml du carbonate de sodium (200 g/l) a été ajouté. Les tubes ont été incubés en obscurité et à température ambiante, pendant 60 minutes. Après incubation, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 725 nm au biais d'un spectrophotomètre.

La lecture a été effectuée contre un blanc sans extrait. La gamme étalon de plusieurs concentrations d'acide gallique a été établie parallèlement et dans les mêmes conditions réactionnelles. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

IV.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux présents dans les extraits de *Caralluma europaea* a été effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium (ZhiShen *et al.*, 1999). Le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) en présence des flavonoïdes forme un complexe jaune dont l'intensité de coloration est mesurable par spectrophotomètre à U.V. 200 µl de chacun des échantillons dilués ont été introduits dans des tubes à essai, auxquels nous avons ajouté 800 µl d'eau distillée et 60 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5%. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 40 µl de trichlorure d'aluminium à 10% (m/v) ont été additionnés aux mélanges. Après 5 minutes d'incubation toujours à température ambiante, 400 µl de carbonate de sodium (1 M) et 500 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Ensuite, les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex et les mesures d'absorbance des différents échantillons ont été effectuées à une longueur d'onde de 510 nm contre un blanc sans extrait préparé de la même façon que les échantillons.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits étudiés a été exprimée en mg d'équivalent de catéchine par grammes de matière végétale sèche (mg EAC/g MS).

IV.3. Dosage des tanins

La teneur en tanins a été dosée selon la méthode à la vanilline en milieu acide (Broadhurst et Jones, 1978). Cette méthode repose sur la capacité de la vanilline à réagir avec les tanins condensés en milieu acide, pour produire un complexe coloré qui absorbe à 500nm. 200 µl des extraits ont été mis dans des tubes à essais et 2 ml d'une solution de la vanilline/méthanol (4%) ont été ajoutés aux mélanges. Après agitation, 1 ml d'acide chlorhydrique HCl concentré a été ajouté aux différents tubes. Après 15 min d'incubation à température ambiante, la mesure de la densité optique a été effectuée à 550 nm.

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent de la catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EAC/g MS).

V. Analyse par CLHP des polyphénols

L'analyse et la quantification des polyphénols présents dans les extraits de *Caralluma europaea* ont été effectuées sur un appareil CLHP (KNAUER, Allemagne) couplé à un détecteur UV et maintenu à une longueur d'onde de 280 nm. La colonne utilisée est de type C18 phase inverse Eurospher II 100 (250 × 4,6 mm, 5 µm). La phase mobile est un éluant binaire constitué de deux solvants en gradient : A (eau acidifiée) et B (Acétonitrile). Au départ, la chromatographie a été lancée avec 5% de la solution B, puis ce pourcentage a été augmenté linéairement en fonction du temps pour atteindre 90% au bout de 50 min et diminué au bout de 10 min pour atteindre 5% (El-Abbassi, Kiai, et Hafidi 2012). Le débit est de 1 ml/min et la température est de 25°C, alors que le volume d'injection est de 10 µl (solution de 1 mg d'extrait/ml dans le méthanol).

L'identification des composés phénoliques a été effectuée en comparant les temps de rétention et les spectres UV détectés dans les extraits avec ceux des standards.

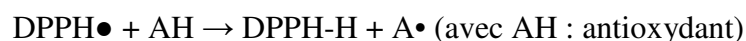
L'estimation quantitative des composés phénoliques a été faite en utilisant une courbe d'étalonnage d'acide gallique.

VI. Détermination de l'activité anti-oxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits éthanolique, hexanique, d'acetate d'éthyle et butanolique de *Caralluma europaea*, deux tests ont été utilisés : le test du piégeage des radicaux libres DPPH et le test du pouvoir réducteur.

VI.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH est un radical libre stable, présente un maximum d'absorption à 517 nm ce qui lui confère une coloration violette. En présence d'un antioxydant, le DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (de couleur violette) est réduit en diphenylpicryl hydrazine de couleur jauneselon la réaction :



L'évaluation de la capacité d'extrait éthanolique et les fractions de *Caralluma europaea* de piéger les radicaux libres du 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl (DPPH) a été déterminée par spectrophotométrie, selon la méthode décrite par Burits *et al.* (2000) et Sahin *et al.* (2004). Différentes concentrations de départ allant de 100 µg/ml à 5 mg/ml des extraits de notre plantes ont été préparées dans le méthanol. 50 µl des différentes concentrations de chaque échantillon ont été introduites dans des tubes à hémolyse, puis 2 ml de la solution méthanolique de DPPH (60 mM) ont été ajoutés aux différents tubes. Un blanc a été préparé de la même manière en remplaçant les échantillons par le méthanol. Les tubes ont été ensuite incubés à l'obscurité pendant 20 minutes. Après incubation, les absorbances ont été mesurées à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Le Butyl hydroxy toluène (BHT) et la Quercétine ont été utilisés comme antioxydants de référence. Le test a été réalisé en triplicata et les résultats ont été exprimés en moyenne ± erreur standard.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle})] \times 100$$

La concentration CI50 a été définie comme étant la concentration de l'échantillon pour réduire 50% du radical DPPH•. La CI50 a été déterminée graphiquement à partir des courbes de régression représentant les pourcentages du DPPH réduit en fonction des concentrations réelles des échantillons étudiés. La plus faible CI50 correspond à la plus haute activité (Patro *et al.*, 2005).

VI.2. Test du pouvoir réducteur du fer

Ce test est basé sur la réduction du Fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer (II). La présence du Fe^{2+} peut être évaluée en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu verte dans le milieu réactionnel à 700 nm. En effet, une augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés.

Dans cette étude, le pouvoir réducteur des échantillons a été déterminé selon le protocole décrit par Oyaizu (1986). 1 ml de différentes concentrations allant de 100 à 1000 μ g/ml des extraits ou des standards (BHT, quercétine) préparées dans le méthanol, a été mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de la solution ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les différents tubes ont été incubés à 50°C pendant 20 min. Après incubation et refroidissement des tubes, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% ont été additionnés pour stopper la réaction.

Les tubes ont été centrifugés à 3000 g pendant 10 min. Par la suite, 2,5 ml du surnageant de chaque concentration ont été mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé parallèlement, contenant le méthanol à la place des échantillons.

La CE50, qui correspond à la concentration qui donne 0,5 de densité optique, a été calculée d'après la courbe de l'absorbance correspondante à 700 nm en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence. Le test a été réalisé en triplicata et les valeurs de la CE50 ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard.

Chapitre II: Tests biologiques, pharmacologiques et comportementaux

I. Les animaux

Les animaux utilisés dans les différentes études *in vivo* de notre travail proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences Semlalia.

Ce sont des rats mâles de race *Sprague Dawley* ayant un poids compris entre 150 et 300g; utilisés dans les études de l'évaluation de l'activité anti-lithiasique et hépato-protectrice des extraits de *Caralluma europaea*.

Et des souris *Swiss Albinos* pesant de 28 à 30 g. dans les études de la toxicité aigüe, l'évaluation de l'activité anti-nociceptive, anti-inflammatoire et comportementale des extraits de *Caralluma europaea*

Lors de ces expériences, les animaux étaient placés dans des cages transparentes dans une animalerie soumise à une photopériode de 12 h de lumière (7 à 19 h) et 12 h d'obscurité (19 à 7 h), une température maintenue à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et nourris suivant un régime standard à base de protéine brute (18%) composé de céréales tourteaux de soja et en plus d'un complexe minéralo-vitaminique, avec un accès libre à l'eau *ad libitum*.

Le choix de ces animaux est justifié par :

i. Les rats et les souris sont des animaux sensibles aux phénomènes comportementaux, nociceptifs, hépatotoxiques et lithiasiques

ii. Les expériences pharmacologiques réalisées chez les rats et souris sont transposables à l'Homme.

iii. Le cout de revient des rats et des souris est abordable par rapport à d'autres espèces comme les lapins et les cobayes.

Les expérimentations sont réalisées au Laboratoire de Pharmacologie, Neurobiologie et Comportement de la Faculté des Sciences Semlalia.

II. Le matériel végétal

Dans notre travail, nous avons procédé à l'étude des propriétés pharmacologiques et comportementales des extraits de *Caralluma europaea*. En effet, l'extrait évalué dans l'activité comportementale est l'extrait total (l'extrait éthanolique), pour l'activité anti-nociceptive et anti-inflammatoire ce sont l'extrait total et l'extrait d'acétate d'éthyle qui sont utilisés, pour l'activité hépato-protectrice ce sont les extraits éthanolique, Butanolique qui sont utilisés et

enfin pour l'activité anti lithiasique ce sont extraits éthanolique, Butanolique et Hexanique qui sont utilisés.

Le protocole d'extraction, les différents rendements et la caractérisation de chaque extrait sont détaillés dans la partie phytochimie.

Le tableau ci-dessous regroupe les différents Tests biologiques, pharmacologiques et comportementaux étudiés avec respectivement le type d'animaux utilisés et les extraits de la plante évalués :

Tableau 1: Résumé des Tests pharmacologiques et comportementaux par le type d'animaux utilisés et l'extrait de plante évalué

Tests pharmacologiques et comportementaux	L'animal utilisé			L'extrait évalué(s)
Toxicité aiguë	Souris males et femelles	Swiss	Albinos	Éthanolique -Hexanique -d'Acétate d'éthyle - Butanolique
Activité comportementale	Souris males	Swiss	Albinos	Éthanolique,
Activité anti-nociceptive	Souris males	Swiss	Albinos	Éthanolique - d'Acétate d'éthyle
Activité inflammatoire anti-	Souris males	Swiss	Albinos	Éthanolique - d'Acétate d'éthyle
Activité hépatoprotectrice	Rats blancs de race Sprague Dawlley males			Éthanolique - Butanolique
Activité anti-lithiasique	Rats blancs de race Sprague Dawlley males			Éthanolique - Hexanique- Butanolique

III. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est définie comme étant l'ensemble des effets toxiques d'une substance administrée à forte dose, qui entraînent des troubles organiques évoluant rapidement et pouvant engendrer la mort. La DL 50 est la quantité d'une substance, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. La DL 50 est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë).

Les essais toxiques peuvent être réalisés sur plusieurs sortes d'animaux, mais ce sont les rongeurs en particulier les rats et les souris qui sont le plus souvent utilisés. La DL 50 peut être mesurée par diverses voies d'administration. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à tester la toxicité aiguë par voie orale des extraits de *Caralluma europaea*.

III.1. Principe

Le test consiste à administrer aux animaux en une seule prise de fortes doses de la substance testée et noter ensuite l'ensemble des signes toxiques qui surviennent après le traitement. En cas de doses létales, un pourcentage de mortalité et la DL 50 (dose provoquant 50 % de mortalité) sont calculés.

III.2. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris *swiss* mâles et femelles pesants entre 20 et 30 g provenant de l'animalerie de la Faculté des Sciences Semlalia. Lors des expériences, les animaux étaient placés dans des cages transparentes dans une animalerie soumise à une photopériode de 12 h de lumière (7 à 19 h) et 12 h d'obscurité (19 à 7 h).

III.3. Matériel végétal

Dans ce test, nous nous sommes intéressés à étudier la toxicité aiguë des extraits éthanolique, hexanique, d'acétate d'éthyle et butanolique de *Caralluma europaea*

III.4. Méthodologie

Le test de toxicité aiguë dont la méthode consiste à chercher la dose qui, après administration unique, entraîne la mort chez 50% des animaux testés dans un délai de 24 à 72 heures.

Pour ce faire nous avons traité plusieurs groupes de souris (n=6) avec différents extraits :

Groupe témoin : Souris traitées avec le sérum physiologique (9 ‰ ; po.)

Groupes de l'extrait éthanolique : groupes de souris traités avec les doses (1 ; 2,5 ; 5 g/kg)

Groupes de l'extrait acétate d'éthyle : groupes de souris traités avec les doses (1 ; 2,5 ; 5 g/kg)

Groupes de l'extrait butanolique : groupes de souris traités avec les doses (0,5; 1 ; 2 g/kg)

Groupes de l'extrait hexanique : groupes de souris traités avec les doses (0,5; 1 ; 2 g/kg).

Immédiatement après le traitement et durant les 4 heures suivantes, puis régulièrement pendant les premières 72h les animaux sont observés pour noter toute anomalie ou changement du comportement normal (Shah Ayub et *al.*, 1997 ; Bürger et *al.*, 2005).

en vue de déceler tout signe de toxicité éventuelle:

- Le comportement de l'animal et les signes de toxicité (tachycardie, vomissements, piloerection, activité motrice, crampes, ...).
- Le nombre de décès dans chaque lot en précisant le moment du décès pour déterminer le pourcentage de mortalité et calculer par la suite la DL 50.

III.5. Détermination de la DL 50

Pour la détermination de la DL 50, nous avons utilisé la méthode de Litchfield et Wilcoxon (Litchfield et Wilcoxon, 1949) qui consiste à une transformation linéaire de la courbe sigmoïde représentée par le pourcentage de mortalité en fonction de la dose. Cette méthode permet de tracer une droite de régression et de déterminer facilement la valeur des doses létales 50.

Chapitre III : Etude de l'effet de l'extrait éthanolique sur l'activité comportementale chez la souris

I. Anxiété

L'étude de l'état d'anxiété a été effectuée par l'usage de trois dispositifs, le test du labyrinthe en croix surélevé "Elevated Plus-Maze", le test de la chambre éclairée/obscur "Dark/light box test" et le test du champ ouvert (Open Field test). Pour chaque test nous avons utilisé trois lots de six souris. Chaque lot a reçu l'extrait éthanolique à des doses (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o.), le démarrage du test comportemental est initié après 40 min de l'administration orale de l'extrait. Pour le lot témoin positif le diazépam (5 mg/kg, i.p.) a été administré trente minutes avant le test.

I.1. Test du labyrinthe en croix surélevé ou Elevated Plus Maze

Principe :

C'est un test normalisé qui permet de mesurer l'anxiété chez les rongeurs. Il est fondé sur la préférence de l'animal pour les endroits sombres et clos, comparativement aux endroits éclairés et découverts (Koutseff, 2011).

Dispositif :

Le dispositif est un labyrinthe en croix surélevé à une hauteur de 70 cm du sol, placé dans une pièce éclairée homogène, constitué par quatre corridors de même dimension (35 cm × 5 cm) ouverts sur un carré central (5 cm × 5 cm). Les deux corridors ouverts sont dépourvus de murs (bras ouverts), alors que les corridors fermés sont munis de parois limitant le couloir (bras fermés) (Figure 17).

Protocole expérimental :

Chaque souris est déposée au centre du labyrinthe pour qu'elle l'explore librement pendant 5 minutes. Après le passage de chaque souris, le labyrinthe est nettoyé avec l'éthanol à 70%. Les paramètres mesurés à partir des enregistrements vidéo sont :

- Le nombre d'entrées dans les bras ouverts.
- Le nombre d'entrées dans les bras fermés.
- Le temps passé dans les bras ouverts.
- Le temps passé dans les bras fermés.

Répartition des lots d'animaux

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1: Souris (n=6) témoins négatif ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po.).

Lot 2: Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (50 mg/kg, po.).

Lot 3: Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 4: 6 Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).



Figure 17: Dispositif expérimental du labyrinthe en croix surélevée

I.2. Test chambre éclairée /obscur « Dark-Light Box test »

Il permet d'évaluer les réactions aversives des animaux vis-à-vis d'une cage fortement éclairée qui constitue une source de lumière. Dans ce cas, les animaux ont tendance à séjourner dans le compartiment obscur plus que dans l'éclairé. Le temps de séjours dans chaque compartiment nous renseigne sur l'état d'anxiété de l'animal, ainsi, les animaux anxieux ont tendance à passer plus de temps dans le compartiment obscur par rapport à l'éclairé (Miller *et al.*, 2011).

- **Description du dispositif**

Le dispositif consiste en une boîte de 44 cm de longueur, 8.5 cm de largeur et 25 cm de hauteur, répartie en 2 boîtes de tailles inégales, une éclairée par une lampe de 60 W et une fermée obscure (Figure 14). Les deux boîtes sont connectées entre elles par une ouverture de 7cm de hauteur laissant le passage libre à l'animal entre les deux chambres (Figure 18).

- **Procédure du test**

L'animal est habitué en le plaçant pendant 90 s dans la chambre obscure avec fermeture de la jonction entre les chambres, et 90 s dans l'éclairée. Le test se fait en ouvrant la jonction et les mouvements de l'animal sont filmés par une caméra de bonne résolution. Les vidéos sont

analysées ultérieurement. Le temps de séjour des animaux de chaque groupe est mesuré comme indicateur de l'état d'anxiété des animaux (Miller *et al.*, 2011).

- **Répartition des lots d'animaux**

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris (n=6) témoin négatif ayant reçu du sérum physiologique (9‰, po.).

Lot 2 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (50 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris (n=6) traitées par la Diazépam (BZP) (10 mg/kg, ip.).



Figure 18: Le dispositif de la chambre éclairée-obscur (Dark-light box).

I.3. Etude de l'activité locomotrice et l'anxiété : Test du champ ouvert "open field test"

Description du dispositif

Pour évaluer l'activité locomotrice et l'anxiété, nous avons eu recours au test du champ ouvert "open field test". Il consiste en une enceinte carrée en bois peint en blanc, la surface du fond est subdivisée en 16 ou 25 carrés de surfaces identiques (Broadhurst, 1960) (Figure 19).

- **Procédure du test**

Le test se fait en plaçant chaque animal au centre du champ ouvert (bien nettoyé à l'alcool) et éclairé par une lampe de 60 W, ensuite, les mouvements de l'animal sont librement filmés pendant 6 min par une caméra placée au haut du dispositif. L'étude est faite entre 12 h et 14 h. Les vidéos sont par la suite examinées et le nombre de cases parcourues est compté pour

chaque groupe. La case est considérée comme parcourue quand l'animal l'a traversé par toutes ses pattes y compris les postérieures) (Swain *et al.*, 1998).

- **Répartition des lots d'animaux**

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris (n=6) témoin négatif ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po.).

Lot 2 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (50 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris (n=6) traitées par la Diazépam (BZP) (10 mg/kg, ip.).



Figure 19:Le dispositif du champ ouvert "open field".

II. Dépression

II.1. Test de suspension par la queue « Tail suspension test »

Le test de suspension par la queue développée initialement par Steru et collaborateurs en 1985 (Steru *et al.*, 1985) mesure l'immobilité de l'animal.

Description du dispositif

La souris est mise en suspension sur une barre de suspension d'aluminium (60 cm de hauteur x 10 cm de largeur x 60 cm de longueur), qui sert à suspendre la queue de chaque souris, est positionnée au-dessus de la boîte (Figure 20).

Répartition des lots d'animaux

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris (n=6) témoins négatifs ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po.).

Lot 2 : Souris (n=6) traités par l'extrait éthanolique (50 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris (n=6) traitées par l'anphraline (5 mg/kg, ip.)



Figure 20:Le dispositif du test de suspension par la queue « Tail suspension test ».

II.2. Test de la nage forcée

Principe

Dans ce test, nous avons étudié l'effet des extraits de *Caralluma europaea* sur le comportement de la nage forcée.

Description du dispositif

Ce test qui a été décrit par Porsolt en 1977, consiste à mettre les animaux dans un cylindre de 30cm de hauteur et 20cm de diamètre et il est rempli d'eau jusqu'à 10cm (Figure 21). La température d'eau est maintenue à 25°C.

Protocole expérimental

L'animal est mis dans son cylindre pendant 5 minutes durant lesquelles deux paramètres sont notés : le temps de nage qui correspond au temps passé par l'animal à nager et à essayer de s'échapper du cylindre et le temps d'immobilité pendant lequel l'animal arrête ses tentatives de fuite et s'immobilise, tout en gardant son museau hors de l'eau (Chait, 1996). Lorsque les 5 minutes s'achèvent, l'animal est ressorti de l'eau, réchauffé et remis dans sa cage (Chait, 1996).

Répartition des lots d'animaux

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris (n=6) témoin négatif ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po.).

Lot 2 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (50 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris (n=6) traitées par anphraline (5 mg/kg, ip.)



Figure 21:Le dispositif du test de la nage forcée.

Chapitre IV : Evaluation des effets de quelques extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité antinociceptive chez la souris

Dans notre travail, trois tests ont été réalisés pour évaluer les effets des extraits, éthanolique et d'acétate d'éthyle, de *Caralluma europaea* sur l'activité antinociceptive chez la souris ; le test de contorsion, le test au formol et le test de la plaque chauffante.

Pour chaque test nous avons utilisé des lots constitués de six souris. Chaque lot a reçu une dose de l'extrait éthanolique ou d'acétate d'éthyle par voie orale. Le démarrage du test a été initié 30 min après le traitement. Deux doses par extrait étudié de *Caralluma europaea* ont été testées 100 et 200 mg/kg du poids corporel de l'animal.

Concernant les témoins positifs ; la morphine (10 mg/kg, ip.) et l'acide salicylique (200 mg/kg, ip) ont été administrés, par injection intra-péritonéale, 30 minutes avant le début du test.

Afin de tester une éventuelle implication des récepteurs opioïdiques dans l'activité antinociceptive centrale des extraits nous avons administré aux souris la Naloxone (1g/kg, ip.) qui est un inhibiteur non sélectif des récepteurs opioïdiques avant leur traitement par les extraits de la plante.

I. Test de contorsion ou Writhing Test

But

Ce modèle nous permet d'étudier la réponse typique de l'animal à un stimulus nociceptif chimique et les effets des extraits de *Caralluma europaea* sur cette réponse qui est sous forme de contorsion (allongement des muscles abdominaux suivi de l'extension des pattes arrière) suite à ce stimulus chimique nociceptif (Farouk et al., 2008)(Figure 22).

Méthodologie

Le traitement des souris par les extraits de *C.europaea* est fait 30 minutes avant l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique à raison de 0,6 % à 0,1 ml/10 g de poids de l'animal. (Farouk et al., 2008).

L'animal est placé dans une cage transparente, afin de procéder au comptage du nombre de contorsion pendant 30 minutes.

Le pourcentage d'inhibition (PI) de la réponse nociceptive est calculé par la relation :

$$I = [(NC - NT)/NC] \times 100$$

NC : nombre de contorsions dans le groupe témoin.

NT : nombre de contorsions d'un groupe testé.

Protocole expérimental

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris (n=6) témoins ayant reçu du sérum physiologique (9‰, po.).

Lot 2 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris (n=6) traitées par l'extrait acétate d'éthyle (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris (n=6) traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris (n=6) traitées par l'extrait acétate d'éthyle (200 mg/kg, po.).

Lot 6 : Souris (n=6) traitées par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, ip.).



Figure 22:Souris en pleine contorsion

II. Test au formol ou Formalin test

But :

Étudier l'effet de l'administration par voie orale des extraits de *Caralluma europaea* sur la sensibilité nociceptive centrale et périphérique chez la souris.

Méthodologie :

La méthode utilisée dans la présente étude est semblable à celle décrite précédemment par De Miranda et ses collaborateurs (2001) avec de légères modifications. Il consiste à injecter brièvement 20µl de formaline à 2% par voie sous-cutanée dans la patte postérieure droite des souris et elles sont placées dans une enceinte transparente. Le léchage de la patte injectée par le formol a été considéré comme une indication du comportement nociceptif.

A l'aide d'un chronomètre, le temps total passé à lécher et mordre la patte injectée est enregistré, tout en sachant que le test de formol chez les rongeurs consiste en deux phases successives (Hunskaar et Hole, 1987) (Figure 23).

- **Une phase précoce** qualifiée comme réponse nociceptive initiale de 0 à 5 minutes après l'injection de formaline.
- **Une phase tardive** de 15 à 30 minutes après l'injection,

Ces deux phases représentant respectivement les réponses tonique et inflammatoire de la douleur.

Les animaux ont été prétraités oralement avec deux doses de l'extrait éthanolique et d'extrait d'acétate d'éthyle (100 mg/kg et 200 mg/kg), 30 min avant l'injection du formol.

Protocole expérimental:

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots:

Lot 1 : Souris témoins (n=6) ayant reçu du sérum physiologique (9‰, po.).

Lot 2 : Souris traitées (n=6) par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris traitées (n=6) par l'extrait acétate d'éthyle (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris traitées (n=6) par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris traitées (n=6) par l'extrait acétate d'éthyle (200 mg/kg, po.).

Lot 6 : Souris traitées (n=6) par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, ip.).

Lot 7 : Souris traités (n=6) par l'Acide morphine (MOR) (10 mg/kg, ip.).

Lot 8: Souris traités (n=6) par le Naloxone(Nal)(1mg/kg, ip) + l'Acide morphine (MOR) (10 mg/kg, ip.).

Lot 9 : Souris traitées (n=6) par le Naloxone(Nal)(1mg/kg, ip) + l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 10 : Souris traités (n=6) par le Naloxone(Nal)(1mg/kg, ip) + l'extrait acétate d'éthyle (200 mg/kg, po.).

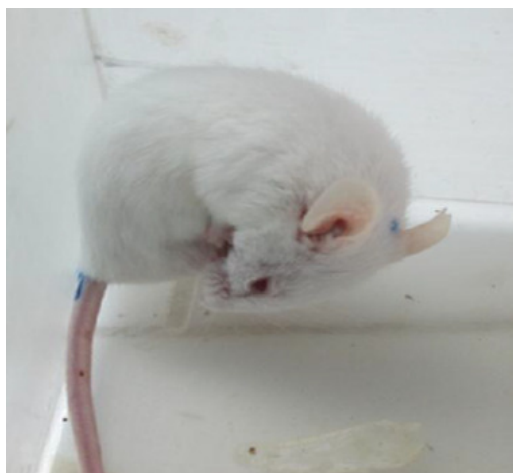


Figure 23: Souris lèche la patte injectée par le formol

III. Test de la plaque chauffante

But :

Étudier l'effet de l'administration par voie orale des extraits de *Caralluma europaea* sur la sensibilité nociceptive centrale chez la souris

Méthodologie :

La surface chauffée d'un appareil de mesure de l'analgésie à plaque chauffante a été maintenue à $55 \pm 0,4$ °C. Chaque animal était placé dans un cylindre de verre (diamètre 20 cm) sur la surface chauffée de la plaque. Les souris traitées ont reçu deux doses orales d'EE et d'EAE (100 mg/kg et 200 mg/kg). Le groupe témoin a reçu le serum physiologique par voie orale à 0,1 ml/g. La morphine a été administrée par voie intrapéritonéale à raison de 10 mg/kg. Le temps de latence pris par l'animal pour lécher une de ses pattes ou pour sauter est noté et considéré comme le temps de la réaction. La durée de ce test ne devrait pas dépasser 20 secondes pour éviter d'endommager les tissus cutanés des pattes des souris (Farouk et *al.*, 2008). Les souris ont été prétraités oralement avec deux doses de l'extrait éthanolique et d'extrait d'acétate d'éthyle (100 mg/kg et 200 mg/kg), 30 min avant le début du test. (Figure 24).

Protocole expérimental

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots :

Lot 1 : Souris témoins (n=6) ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po.).

Lot 2 : Souris traitées (n=6) par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris traitées (n=6) par l'extrait acétate d'éthyle (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris traitées (n=6) par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris traitées (n=6) par l'extrait acétate d'éthyle (200 mg/kg, po.).

Lot 6 : Souris traitées (n=6) par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, ip.).

Lot 7 : Souris traitées (n=6) par l'Acide morphine (MOR) (10 mg/kg, ip.).

Lot 8 : Souris traitées (n=6) par le Naloxone (Nal)(1mg/kg, ip) + l'Acide morphine (MOR) (10 mg/kg, ip.).

Lot 9: Souris traitées (n=6) par le Naloxone (Nal)(1mg/kg, ip) + l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 10: Souris traitées (n=6) par le Naloxone (Nal)(1mg/kg, ip) + l'extrait acétate d'ethyl (200 mg/kg, po.).



Figure 24: Souris en plein du test de la plaque chauffante

Chapitre V : Evaluation des effets des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité anti-inflammatoire chez la souris

But :

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire in vivo des extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle de *Caralluma europaea*, nous avons utilisé le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène.

Méthodologie :

L'œdème de l'oreille induit par le xylène a été fait, selon la méthode de Shang et *al.*, (2011). Pratiquement, une inflammation cutanée a été induite sur la face interne et externe de l'oreille droit de chaque souris, suite à l'application locale de 30 µl d'une solution de xylène pure. Les souris ont été réparties en six lots de 6 souris chacun, et ont été prétraitées par voie orale 30 min avant l'application de xylène. Seul le Diclofénac a été administré à l'animal par voie intra péritonéale.

Protocole expérimental:

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en plusieurs lots (de 6 souris) :

Lot 1 : Souris témoins ayant reçu du sérum physiologique (9‰, po.).

Lot 2 : Souris traitées par l'extrait éthanolique (100 mg/kg, po.).

Lot 3 : Souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle (100 mg/kg, po.).

Lot 4 : Souris traitées par l'extrait éthanolique (200 mg/kg, po.).

Lot 5 : Souris traitées par l'extrait acétate d'éthyle (200 mg/kg, po.).

Lot 6 : Souris témoins positifs traitées par Diclofénac (10 mg/kg, ip.).

Après trente minutes de traitement, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie au chloral hydrate, des disques de 6mm ont été prélevés de l'oreille droit (avec l'œdème) et ont été pesés et comparés à ceux récupérées de l'oreille gauche (sans l'œdème) (Figure 25).

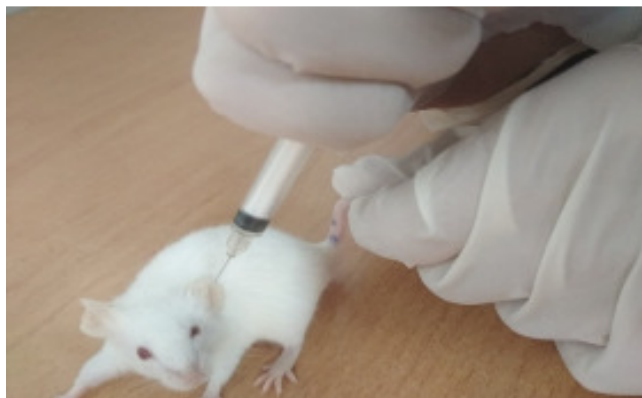


Figure 25: Application locale de xylène pure

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la détermination de pourcentage d'inhibition de l'œdème calculé par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\Delta O \text{ témoin} - \Delta O \text{ traité}) / \Delta O \text{ témoin} \times 100$$

Où : ΔO : Différence du poids de l'œdème inflammatoire.

Examen histologique:

Afin de mettre en évidence le résultat du processus inflammatoire, un examen histologique a été effectué. Six échantillons des oreilles enflammées du groupe témoin et du groupe traité ont été prélevés et fixés dans du formol (10 %). Ensuite, les tissus fixés ont été noyés dans la paraffine et coupés en sections de 3-4 μm . Les tranches ont été montées sur les lames de verre, colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) pour des études pathologiques comme décrit par Kieman (1999).

Chapitre VI : Evaluation des effets des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité hépatoprotectrice chez le rat.

I. Principe

Ce test consiste à évaluer l'effet des extraits au cours de l'induction d'une lésion hépatique par le CCl₄.

II. Protocole expérimental :

II.1. Induction de la lésion hépatique :

Les effets hépatoprotecteurs des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea* sur les lésions hépatiques causées par le CCl₄ ont été évalués comme décrit précédemment (Zeashan et al.,2008). Pour provoquer des lésions hépatiques, des injections intrapéritonéales. (i.p., 1 mL/kg) d'un mélange 1:1 (v/v) d'huile de Colza stérile et de CCl₄ toutes les 72h pendant 14 jours ont été effectuées. Simultanément, les extraits éthanolique et butanolique ont été administré quotidiennement (Figure. 26). Les rats ont été jeûnés et sacrifiés 48 h après la dernière administration de l'extrait. Des échantillons de foie ont ensuite été disséqués et du sang a été prélevé.

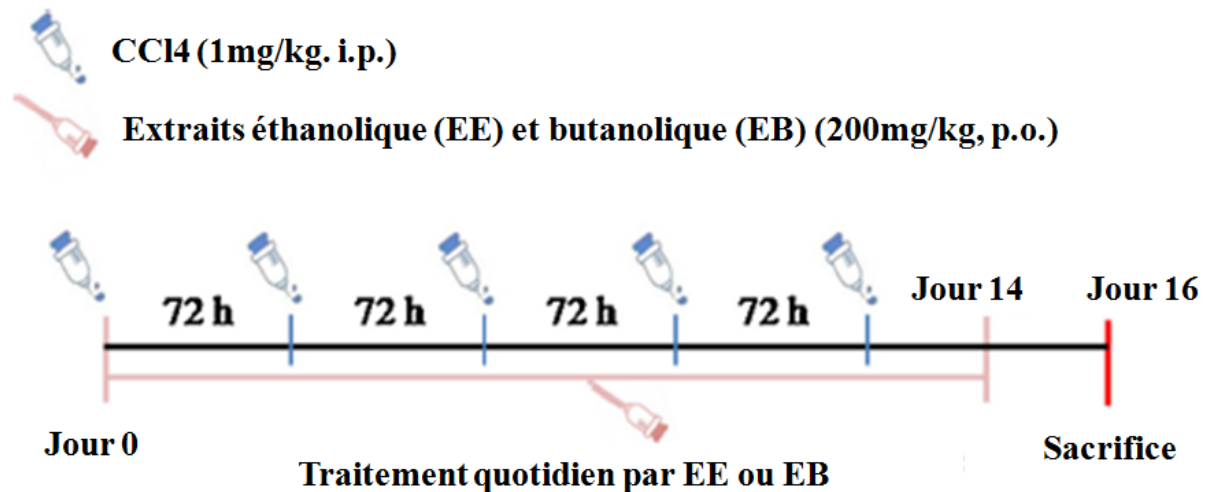


Figure 26: Schéma du protocole expérimental utilisé pour évaluer les effets des extraits de *Caralluma europaea* sur les lésions hépatiques causées par le CCl₄ chez le rat.

II.2. Répartition des animaux

Des rats *Sprague-Dawley* des deux sexes pesant 200-300 g ont été utilisés pour toutes les expériences. Quatre lots de 5 rats chacun sont constitués et chaque lot correspond à un traitement particulier :

-**Lot 1:** lot témoin normal (non intoxiqué non traité)

-**Lot 2:** lot témoin traité avec CCl₄ + l'huile de colza

-**Lot 3:** rats traités par extrait éthanolique (totale) 200 mg/kg + CCl₄

-**Lot 4 :** rats traités par extrait butanolique 200 mg/kg + CCl₄

III. Le suivi de la variation journalière du poids corporel des animaux

Pendant l'expérimentation, les rats ont été pesés régulièrement afin d'observer l'évolution du poids corporel et d'établir une corrélation avec l'administration des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea*.

IV. Etude biochimique

Le but de cette étude est de quantifier quelques paramètres biochimiques, afin de vérifier les effets observés au niveau tissulaire.

Pour cette fin, des échantillons de sang artèreoveineux ont été prélevés au cours du sacrifice des animaux, à la fin de chaque période d'étude, dans des tubes secs de 2 ml. Le sang contenu dans ces derniers est centrifugé (3000 tours/min) pour obtenir le sérum pour les dosages des marqueurs biochimiques d'exploration du fonctionnement du foie. Les dosages sont effectués conformément aux protocoles fournis avec les kits commerciaux CHRONOLAB appliqué sur BA-88A Semi-Auto Chemistry Analyzer (Mindray-China).

➤ *Les marqueurs enzymatiques :*

- **L'aspartate aminotransférase**

L'aspartate aminotransférase (AST), est un marqueur sensible lors de dommage des tissus mous, notamment lors des lésions hépatiques ou musculaires. Une augmentation de l'activité sérique de l'AST est considérée comme due à une lésion, réversible ou non, des hépatocytes ou des myocytes. Pour faire la distinction, l'interprétation de l'activité sérique de l'AST est combinée à celle de l'activité sérique de laCK.

Principe du dosage

L'ASAT catalyse la réaction de L-aspartate et α -cétoglutarate en oxalate et L-glutamate. L'oxaloacétate est converti en malate et en NADH est oxydée en NAD⁺ par le catalyste MDH.





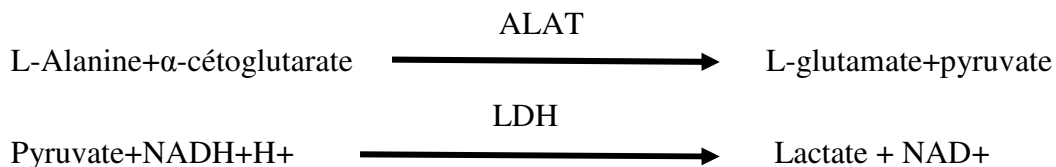
Le taux de variation d'absorbance à 340nm/405nm causé par la conversion de NADH en NAD⁺ est directement proportionnel à la quantité de l'ASAT présente dans l'échantillon.

- **L'alanine aminotransférase**

L'ALAT, est une enzyme présente essentiellement dans le foie. Son dosage peut être très utile au diagnostic de certaines affections, notamment hépatiques. Ainsi l'augmentation de l'ALAT témoigne donc d'une lésion cellulaire dans le foie.

Principe du dosage

L'ALAT catalyse le transfert d'un groupe amine de L-alanine en α -cétoglutarate afin de former du L-glutamate et du pyruvate. Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la conversion du pyruvate en lactate. En même temps, la NADH est oxydée en NAD⁺, tel qu'illustré dans le plan de réaction suivant :



Le taux de variation de la différence d'absorbance entre 340 nm et 405 nm est causé par la conversion de NADH en NAD⁺ et est directement proportionnel à la quantité d'ALAT présente dans l'échantillon.

V. Etude histopathologique

V.1. Le sacrifice et perfusion des animaux

A la fin des expérimentations les animaux sont sacrifiés afin d'en prélever le foie. Cette manipulation consiste, tout d'abord, à anesthésier les animaux par une solution de chloral hydrate (Sigma Aldrich, Allemagne). Ensuite, une thoracotomie est réalisée afin d'avoir un accès direct au cœur. Les rats sont ensuite perfusés dans le ventricule gauche du cœur par une solution de formol (10%). Le foie est, par la suite, prélevé et conservé pendant une nuit dans la même solution.

V.2. Les étapes de l'étude histologique

Pour rendre visible la structure du tissu de l'organe étudié, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques diverses. En effet, on commence toujours par une observation macroscopique puis l'observation au microscope optique (Figure 27), des coupes microscopiques issues de cet organe et qui sont le résultat de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

La figure. 27, résume les étapes suivies en histologie médicale :

V.2.1. Macroscopie

Après 24h de fixation au formol, le foie est coupé suivant un axe transversal de manière à obtenir des fragments d'une épaisseur ne dépassant pas les 3mm. Le tissu est placé dans des cassettes perforées en plastique afin de faciliter la circulation des liquides au cours des étapes d'imprégnation par la paraffine.

V.2.2. Imprégnation

Vu que le tissu reste trop malléable pour pouvoir réaliser des coupes de l'épaisseur désirée, il est nécessaire de le durcir en l'imprégnant par une matière rigide.

Cette étape repose sur la substitution de l'eau qui est dans les tissus par une substance hydrophobe : la paraffine. Cette manipulation est réalisée grâce à un appareil automatisé appelé « Histokinette » (Leica) (Figure28) pendant une durée de 17h selon les étapes suivantes :

La **post-fixation** permet le passage des fixateurs aqueux aux alcools. Elle correspond à un bain de formol pendant 5h.

La **déshydratation** consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle se fait par le passage des cassettes dans 5 bains d'éthanol de concentration croissante jusqu'à l'éthanol absolu (1h pour chacun des 4 premiers et 2h pour le dernier bain).

La **substitution** consiste à remplacer l'éthanol qui n'est pas miscible à la paraffine par le toluène qui est, lui, miscible à la fois au déshydratant et à l'agent d'inclusion. Cette manipulation consiste à faire passer les cassettes dans 3 bains successifs de toluène absolu (30min ; 1h ; 2h).

L'**imprégnation** correspond à la substitution du toluène par la paraffine. Cette étape terminale consiste à faire passer les tissus dans 3 bains successifs de paraffine à 58°C (30min ; 30min ; 1h30).

V.2.3. Inclusion

Cette étape consiste en un enrobage des pièces par de la paraffine permettant ainsi de fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe. L'inclusion se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, nous entreposons des moules en acier inoxydable adapté à la taille du prélèvement dans une enceinte chauffée à 67°C et y faisons couler un peu de paraffine. Nous saisissons, ensuite, les fragments des organes à l'aide d'une pince préchauffée et les déposons délicatement dans les moules tout en respectant la position et l'orientation des fragments.

Ensuite, nous déposons les moules sur un disque de refroidissement (-14°C) afin que la paraffine se fige puis aplatissons délicatement, à l'aide de pincés préchauffées, les fragments. Après, les moules sont recouverts par les cassettes d'identification puis déposés sur une plaque de refroidissement (-14°C) afin de figer la paraffine et de sceller la cassette au moule. Enfin, une fois durcis, les blocs de paraffine sont démoulés puis maintenus sur la plaque de refroidissement jusqu'à la microtomie.

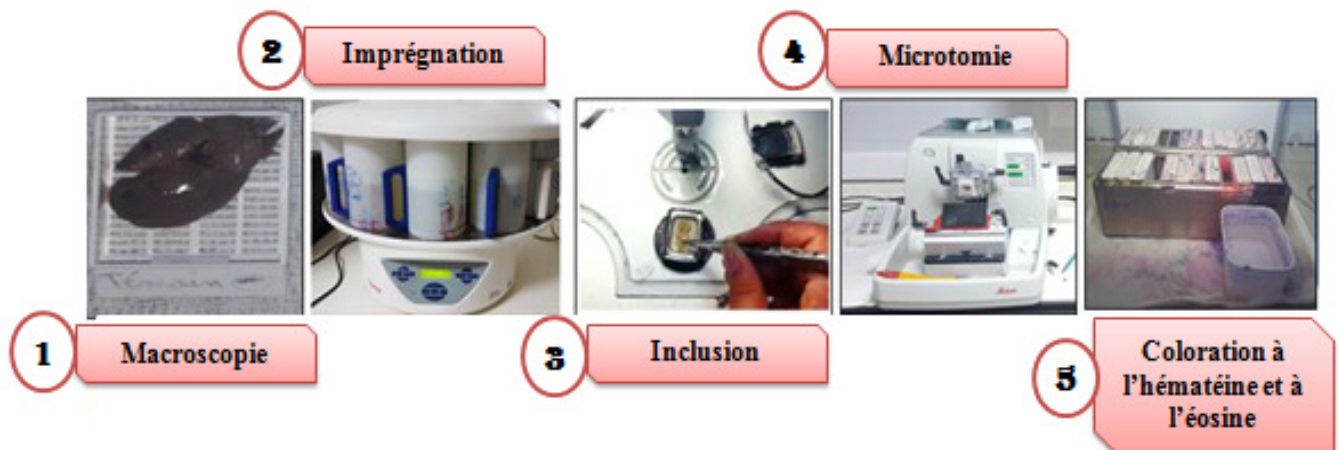


Figure 27:Etapes de la réalisation des coupes histologiques

V.2.4. Microtomie

Cette manipulation consiste à réaliser des coupes grâce à un microtome (Leica RM2245) permettant d'obtenir des rubans très fins. Les organes sont coupés à 4 µm.

Par la suite les coupes d'organes réalisées, sont étalées sur des lames dégraissées (Starfrost®, Allemagne) puis placées dans l'étuve à 56°C pendant 20 minutes.

V.2.5. Coloration classique des organes étudiés à l'hématéine et à l'éosine

Après la sortie des lames de l'étuve, nous avons procédé à une coloration de routine en utilisant deux colorants différents : l'Hématéine-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose.



Figure 28:Dispositif de micro-imagerie numérique ; pour la lecture des lames et la prise de photos

Chapitre VII : Evaluation des effets des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité antilithiasique chez le rat.

La recherche de l'activité antilithiasique de *Caralluma europaea* a été réalisée sur des rats *Sprague-Dawley* mâle. La lithiase rénale est provoquée par l'éthylène glycol (EG) (0,75%) et du chlorure d'ammonium NH₄Cl (2%), fournis aux animaux dans l'eau de boisson *ad-libitum*, pendant 10 jours.

I. Protocole expérimental

Au cours de nos expériences, la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] et la solution de l'extrait éthanolique à deux doses (100 et 200 mg/kg) et une seule dose de la solution des extraits hexanique et butanolique (200mg/kg) de *Caralluma europaea* ont été préparés quotidiennement pour éviter les problèmes de dégradation.

Préparation des lots

Trente-six rats *Sprague Dawley* mâles (200-300 g) ont été utilisés dans la présente étude expérimentale. Les rats ont été divisés en six groupes (six rats par groupe).

- **Un groupe1** utilisé comme témoins négatif recevant uniquement de l'eau de robinet comme boisson et de l'eau distillée comme produit de gavage.
- **Un groupe2** utilisé comme traités recevant de la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 100 mg/kg de l'extrait éthanolique comme produit de gavage.
- **Un groupe3** utilisé comme traités recevant de la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 200 mg/kg de l'extrait éthanolique comme produit de gavage.
- **Un groupe4** utilisé comme traités recevant de la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 200 mg/kg de l'extrait butanolique comme produit de gavage.
- **Un groupe5** utilisé comme traités recevant de la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 200 mg/kg de l'extrait hexanique comme produit de gavage.
- **Un groupe6** utilisé comme témoins positif recevant de la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et de l'eau distillée comme produit de gavage.

Les solutions ingérées par chaque animal étaient en milligramme par kilogramme de poids corporel de rat. Le gavage a été réalisé de la même façon et à la même heure du jour pour tous les animaux testés. Il a été réalisé par une sonde de gavage gastrique adaptée aux rats.

II. Suivi du poids corporel des rats au cours de l'expérience

L'évolution de la variation du poids corporel de chaque animal a été notée durant les 10 jours de l'expérience avant le gavage de l'extrait et à la même heure du jour pour tous les animaux testés.

III. Dosage sérique de quelques éléments

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon le même protocole expérimental décrit dans la partie précédente. Des dosages sériques de l'urée et de la créatinine ont été effectués sur les échantillons sanguins prélevés.

La créatinine

La créatinine filtre librement à travers le glomérule. Une augmentation de la créatininémie est le signe d'une atteinte rénale glomérulaire. Plus rarement elle s'interprète comme une lyse massive de myocytes.

Principe du dosage

Il est basé sur la mesure de la formation d'un complexe coloré entre la créatinine et le picrate alcalin. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans l'échantillon. Cette technique a l'avantage d'être automatisable. Par ailleurs, au cours de la méthode cinétique, les effets des substances interférentes sont réduits ce qui rend cette méthode plus sensible et plus précise que la technique en point final.

L'urée

L'augmentation de l'urée plasmatique peut provenir d'une augmentation du catabolisme protéique ou d'une diminution de l'excrétion urinaire. C'est donc potentiellement un indicateur d'atteinte rénale. L'interprétation de l'urémie ne se fait donc pas seule, mais combinée à celle de la créatininémie.

Phosphatase alcaline

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des enzymes qui se trouvent dans la plupart des tissus de l'organisme, en particulier les os, le foie, l'intestin, les reins, etc. Les taux de phosphatases alcalines augmentent naturellement pendant la croissance et pendant la grossesse. Une augmentation en dehors de ces périodes peut refléter une atteinte hépatique ou osseuse.

Principe de la méthode

Conformément à l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC). La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1-propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé^{1,2}

IV. Etude histologique du rein

L'examen histologique des reins a été réalisé selon la même méthode décrite dans la partie précédente. Afin de mettre en évidence la présence des lithiases au niveau tissulaire, l'observation et la prise des photos sont faites par un microscope optique sous lumière polarisée.

V. Etudes statistiques

Le traitement statistique des données est effectué par un logiciel spécialisé dans l'analyse statistique SigmaPlot. Les résultats sont analysés par l'ANOVA à une voie, La comparaison des groupes est réalisée en utilisant le test de Student-Newman-Keul (SNK).

Les données sont exprimées en moyennes plus au moins écart types (S.E.) ou plus au moins les erreurs standard moyenne (S.E.M.) selon le test. Le degré de significativité est représenté sur chaque graphique par des étoiles quand la comparaison est effectuée avec le lot témoin.

*** $p < 0.001$ (très significatif)

** $p < 0.01$ (significatif)

* $p < 0.05$ (légèrement significatif)

ns : $p > 0.05$ non significatif.

Partie III : RESULTATS

I. Résultats de l'étude phytochimique des extraits de *Caralluma europaea*

I.1. Résultat de l'extraction

Le rendement de l'extraction par macération avec l'éthanol de la matière sèche de *Caralluma europaea* est de 9.2 %. Presque les deux tiers des composés contenus dans cet extrait éthanolique sont entraînés par l'acétate d'éthyle soit 66.30% et 22.8% sont entraînés par le butanol. Par ailleurs, seulement 8.69 % des composés sont solubles dans l'hexane (Tableau 2).

Tableau 2: Rendements de l'extraction par macération de la matière sèche de *Caralluma europaea*

Rendements par rapport à		
Extrait	La matière sèche (%)	L'extrait éthanolique (%)
Ethanolique	9.2	100
Acétate d'éthyle	6.1	66.30
Butanolique	2.1	22.83
Hexanique	0.8	8.69

I.2. Dosage colorimétrique des composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés dans les extraits de la plante ont été déterminées par spectrophotométrie en utilisant, respectivement, les méthodes de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de la vanilline en milieu acide. Les résultats sont représentés dans le tableau 3. La teneur en polyphénols totaux diffère d'un extrait à un autre. La teneur la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait butanolique ($31,34 \pm 0,66$ mg EAG/g MS) suivie par l'extrait éthanolique. Toutefois, la plus faible quantité a été enregistrée chez l'extrait hexanique ($5,46 \pm 0,12$ mgEAG/g MS). Les concentrations

estimatives en flavonoïdes mesurées en mg EAC/g MS a montré que l'extrait butanolique est le plus riche en flavonoïdes (18.67 ± 0.52 mg EAC/gMS). Toutefois, l'extrait éthanolique et d'acétate d'éthyle ont des concentrations plus faibles de l'ordre de 12 mgEAC/gMS. D'après le tableau 3, nous avons constaté que l'extrait butanolique est très riche en tanins condensés. Alors que ces composés sont présents en trace chez l'extrait hexanique. D'après les résultats des dosages des composés phénoliques, l'extrait butanolique de *Caralluma europaea* est l'extrait le plus riche en composés phénoliques.

Tableau 3: Teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins des extraits de *Caralluma europaea* (moyenne \pm SEM).

	Extrait Ethanolique	Extrait Hexanique	Extrait Acétate d'éthyle	Extrait Butanolique
Les teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	20.93 ± 0.3	5.46 ± 0.12	14.84 ± 0.58	$\pm 31.34 \pm 0.66$
Les teneurs en flavonoïdes (mg EAG/g MS)	10.19 ± 0.63	4.75 ± 0.76	13.93 ± 0.3	18.67 ± 0.52
Les teneurs en tanins condensés (mg CE/g DW)	2.28 ± 0.03	1.25 ± 0.12	2.47 ± 0.01	3.91 ± 0.63

I.3. Profil CLHP des composés phénoliques des extraits de *C. europaea*

L'analyse chromatographique des extraits de *Caralluma europaea* a révélé :

- Pour l'extrait éthanolique (Figure. 29, Tableau.4), la présence de 13 composés phénoliques dans l'extrait éthanolique à savoir la catechine, la quercétine, le p-Coumarique, la Quinique, l'acide hydroxycinamique, l'acide sinapique, l'acide catechique, l'acide caféique, l'acide ferrique, l'acide ferrulique, l'acide vanillique, l'acide ascorbique et la vanilline.
- Pour l'extrait hexanique (Figure.30, Tableau.5), deux composés nouveaux ont été identifiés l'acide gallique et l'epicotechnin.
- Tandis qu'un seul composé nouveau, la rutine, a été identifié dans l'extrait d'acétate d'éthyle (Figure 31, Tableau.6).

- Et pour l'extrait butanolique (Figure.32, Tableau.7), nous avons identifié 2 composés nouveaux à savoir l'acide tannique et l'acide coumarique.

Les concentrations ont été calculées et exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (Tableaux ; 4,5,6 et 7)

Tableau 4: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea* allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.

N°	Composés phénoliques	Concentrations (mg EGA/100 g DM)
1	Acide Ascorbique	12,488368
2	Acide Catechique	13,109768
3	Acide Vanillique	12,657408
4	Acide ferrique	12,698512
5	-	12,852716
6	Acide Caféique	13,05358
7	Acide Ferrulique	12,743524
8	Quinique	15,993152
9	Vanilline	12,387564
10	Acide hydroxycinnamique	15,305224
11	Acide Sinapique	14,48956
12	-	12,427556
13	Catechine	24,797668
14	P-Coumarique	16,477832
15	Quercitine	18,719
16	-	13,4742
17	-	14,870576
18	-	16,632268

Tableau 5: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait Hexanique de *Caralluma europaea* allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.

N°	Composés phénoliques	Concentrations (mg EGA/100 g DM)
1	Acide Ascorbique	3,15
2	Acide gallique	3,567
3	Epicotechin	29,8
4	Acide Sinapique	33,967
5	Acide Ferrique	36,8
6	-	38,133
7	Quercetine	45,117
8	Catechine	45,317
9	-	46,367
10	-	47,267
11	-	49,067
12	-	49,833
13	-	50,333
14	-	52,017
15	-	52,3
16	-	54,25
17	-	55,417
18	-	58,467

Tableau 6: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait d'Acétate d'éthyle de *Caralluma europaea* allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.

N°	Composés phénoliques	Concentrations (mg EGA/100 g DM)
1	Rutine	12,970116
2	Acide ferrulique	13,908516
3	Acide Caféique	15,544544
4	-	12,926676
5	2-hydroxycinnamique	25,174728
6	Acide Sinapique	18,29694
7	-	13,098056
8	P-Coumarique	30,671688
9	Quercitine	36,186772
10	-	17,293024
11	-	22,890632
12	-	12,59166
13	-	14,212988
14	-	14,14862
15	-	15,434832

Tableau 7: Les quantités de phénols trouvées dans l'extrait Butanolique de *Caralluma europaea* allaient de 1 à 24 mg d'EGA / 100 g de MS.

N°	Composés phénoliques	Concentrations (mg EGA/100 g DM)
1	Acide Ascorbique	2,9
2	Acide Tanique	11,9
3	Acide chlorogénique	13,733
4	Acide Vanilique	15,633
5	Acide Coumarique	22,867
6	P-Coumarique	25,1
7	Acide Ferrulique	26,033
8	Acide Sorbique	27,283
9	Quercetine	44,233

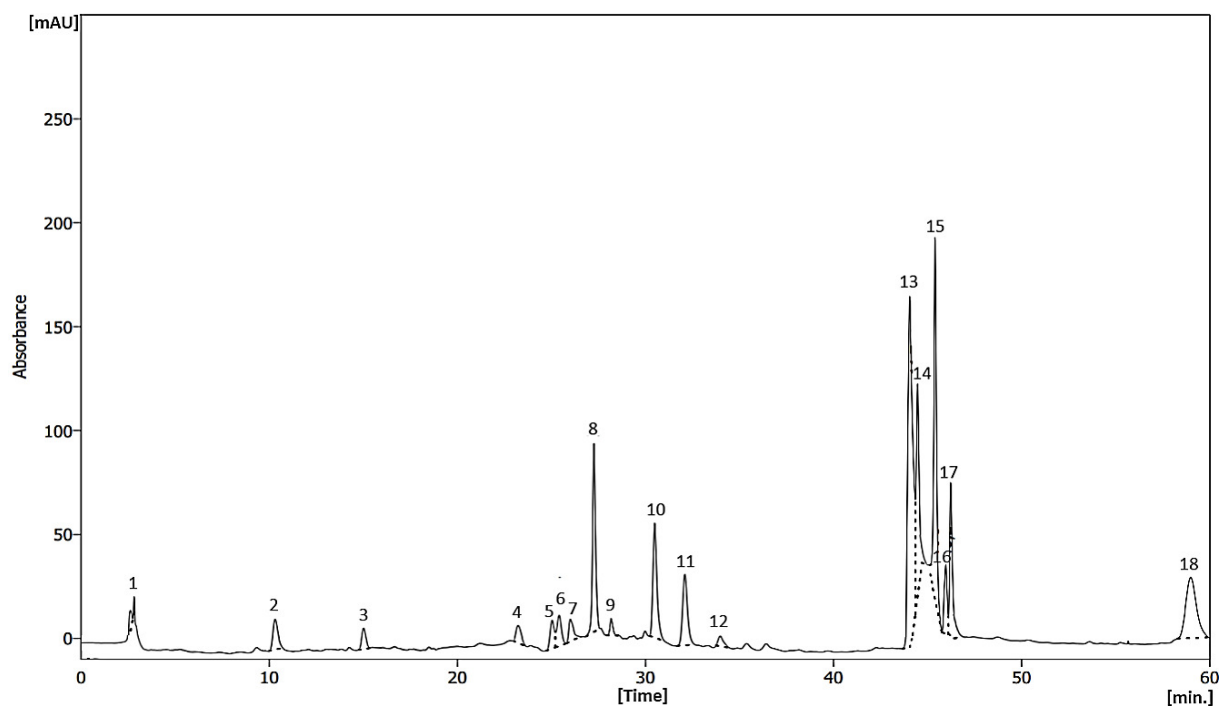


Figure 29:Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea*.

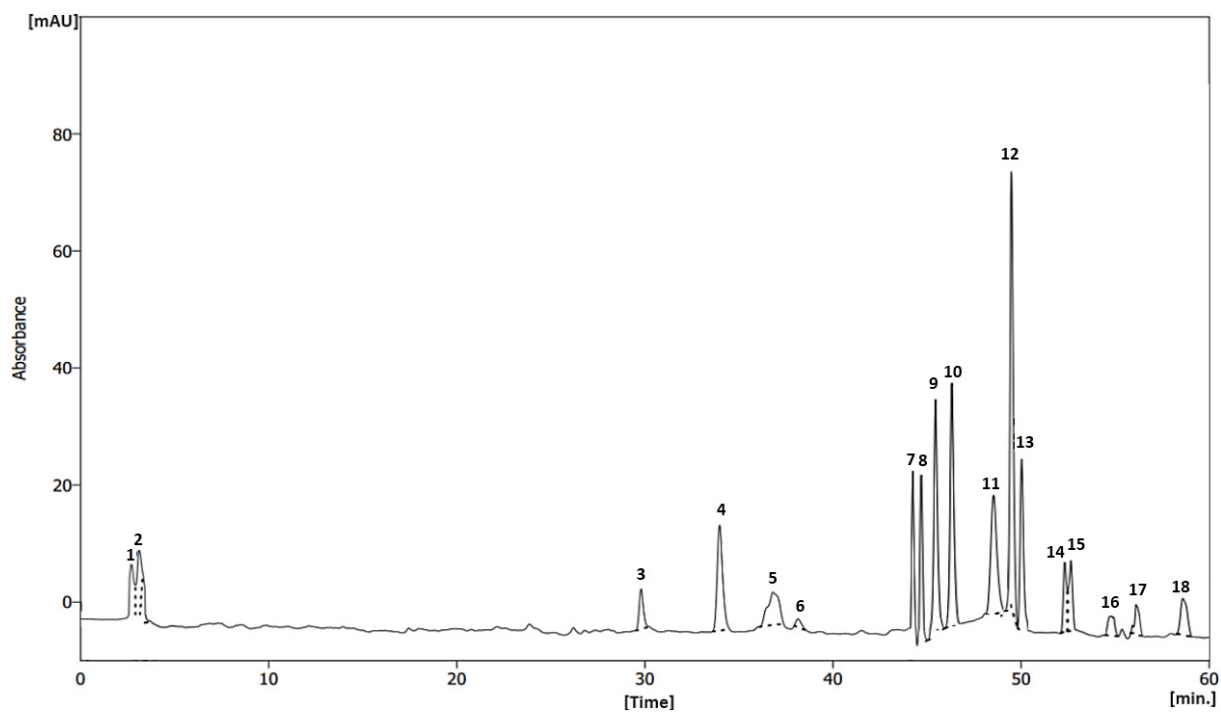


Figure 30:Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait Hexanique de *Caralluma europaea*.

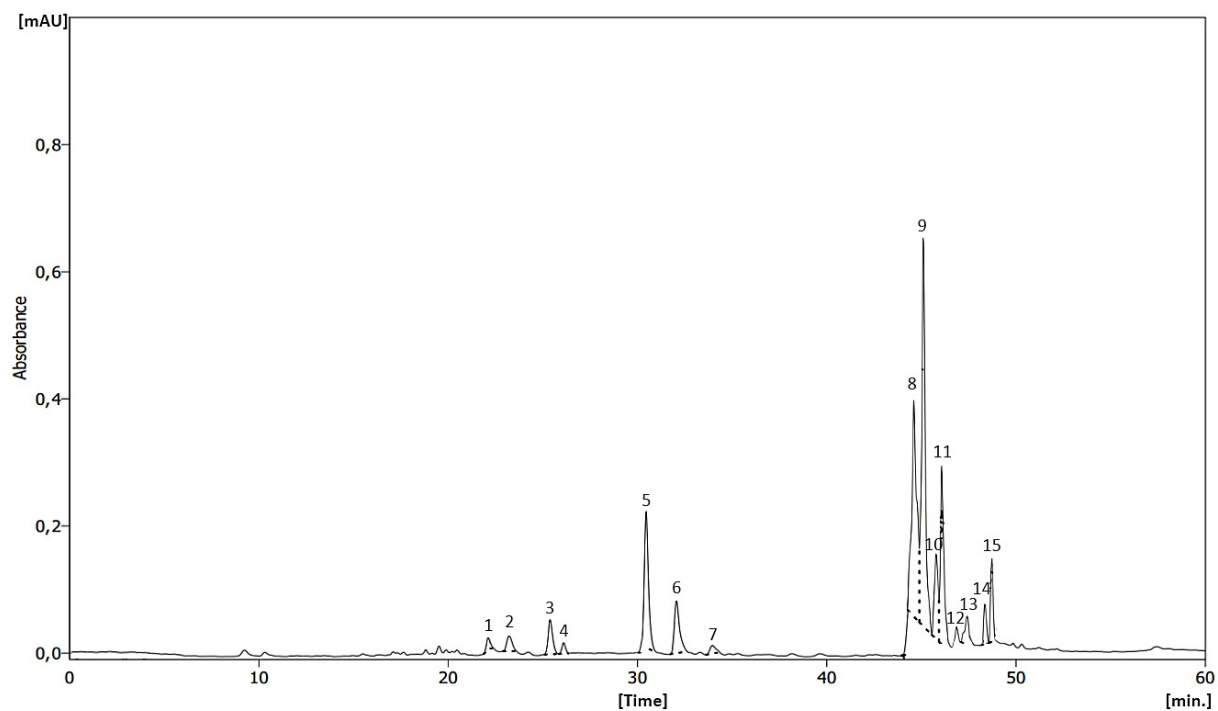


Figure 31: Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait d'Acétate d'éthyle de *Caralluma europaea*.

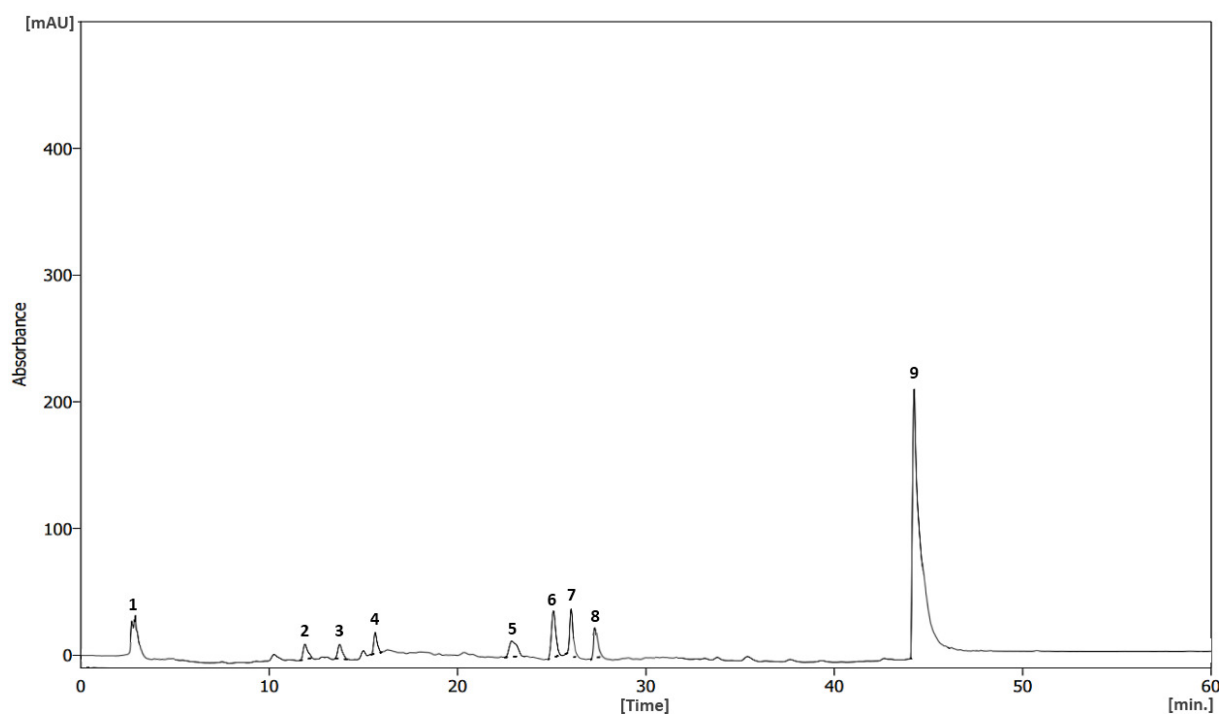


Figure 32: Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait Butanolique de *Caralluma europaea*.

I.4. Etude de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est un processus très complexe qui se fait généralement par plusieurs mécanismes. De ce fait, la détermination *in vitro* de la capacité antioxydante d'un composé doit être faite par plusieurs tests (Aruoma, 2003). Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de *Caralluma europaea* deux tests complémentaires ont été utilisés : le test du piégeage des radicaux libres de DPPH et le test du pouvoir réducteur. Les résultats obtenus ont été exprimés en CI50 qui représente 50% d'inhibition. Une CI50 faible correspond à une activité antioxydante élevée.

I.4.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le test DPPH a été utilisé pour déterminer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres. D'après le tableau 8, l'extrait d'acétate d'éthyle (CI50=20.60 ± 0.12) possède une activité antioxydante plus élevée que celle de l'extrait de butanolique (CI50=30.21 ± 0.44). En général, les deux extraits d'acétate d'éthyle et butanolique possèdent une activité antioxydante très intéressante, mais reste dix fois plus faible que celle des antioxydants de référence (BHT et quercétine). Les valeurs des CI50 des extraits éthanoliques et hexaniques sont situées entre 34.60 ± 0.30 et 83.16 ± 4.20 µg/ml pour le test de DPPH, ce qui montre que ces extraits possèdent également une capacité importante de piéger les radicaux, mais cette activité reste faible par rapport à celle des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique ainsi que celle des antioxydants de référence.

I.4.2. Test du pouvoir réducteur du fer

La capacité des extraits de *Caralluma europaea* de donner un électron ou un hydrogène pour réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ a été aussi étudiée. Comme le montre le tableau 8, l'extrait d'acétate d'éthyle (CI50=54.95 ± 1.04) et celui de butanol (CI50=67.15 ± 0.84) ont représenté une capacité de réduire Fe³⁺ très puissante, alors que les extraits éthanolique et hexanique possèdent une capacité moins importante (CI50 comprise entre 79.15 ± 2.11 et 112.46 ± 6.88 µg/ml). Cependant, tous les extraits étudiés ont montré une activité plus faible que celle du BHT, la quercétine et l'acide ascorbique (2.31 ± 0.016, 2.66 ± 0.054 et 4.05 ± 0.001, respectivement).

Tableau 8: Les valeurs de CI50($\mu\text{g} / \text{ml}$) des extraits de *Caralluma europaea* comparées aux antioxydants synthétiques (acide ascorbique, quercétine et BHT).

	DPPH	Pouvoir réducteur
BHT	2.39 ± 0.015	2.31 ± 0.016
Quercetin	1.91 ± 0.023	2.66 ± 0.054
Acide Ascorbique	1.81 ± 0.015	4.05 ± 0.001
Extrait Ethanolique	34.60 ± 0.30	79.15 ± 2.11
Extrait Hexanique	83.16 ± 4.20	112.46 ± 6.88
Extrait Acetate d'éthyle	20.60 ± 0.12	54.95 ± 1.04
Extrait Butanolique	30.21 ± 0.44	67.15 ± 0.84

I.5. La toxicité aigüe

Les résultats de la toxicité aigüe des différents groupes de souris traités par les extraits de *C. europaea* n'ont montré aucun signe de toxicité, à savoir les changements physiques ou comportementaux (Hypersalivation, convulsions, faiblesse, hérissément du poil, toilettage excessif et tachycardie).

Ainsi, les groupes d'animaux ayant reçus une dose maximale de chaque extrait, n'ont montré aucun cas de mortalité.

Les valeurs des DL 50 sont présentées dans le tableau.9

Tableau 9: Les valeurs des DL 50 (g / kg) des extraits de *Caralluma europaea*

Groupes	DL 50
Extrait éthanolique	> à 5g/kg
Extrait acétate d'éthyle	> à 5g /kg
Extrait hexanique	> à 2g /kg
Extrait butanolique	> à 2g /kg

II. Etude des effets neurocomportementaux de l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea* chez la souris.

II.1. Effet de l'extrait éthanolique de *C. europaea* sur l'anxiété

II.1.1. Test du champ ouvert « Open Field »

Dans ce test, les paramètres comportementaux relevés sont : Le temps d'immobilité, le nombre total des lignes centrales traversées (Lignes CT) par l'animal le nombre total des lignes périphériques traversées (Lignes PT) et le nombre total des redressements effectués.

Les résultats obtenus (Figure 33 A et B) montrent que les trois doses de l'extrait éthanolique provoquent une diminution non significative du nombre total de lignes centrales et périphériques traversées par l'animal. La réponse enregistrée chez le témoin positif (Diazépam) est statistiquement significative ($***p \leq 0.001$) par rapport au témoin négatif.

La figure (Figure 33 C) montre que les doses 50 et 100 mg/kg induisent une augmentation significative ($###p \leq 0.001$; $##p \leq 0.01$) du temps d'immobilité de l'animal.

Concernant le nombre total de redressement (Figure 33 D), seule la dose EE D1 (50mg/kg p.o) a présenté une réponse significative par rapport au témoin négatif ($**p \leq 0.01$).

Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre le comportement des souris témoins et celui des souris traitées par l'extrait éthanolique au test de l'exploration libre à l'exception de la dose EED1(50mg/kg p.o) qui a engendré l'augmentation du nombre de redressements effectués par les souris traitées.

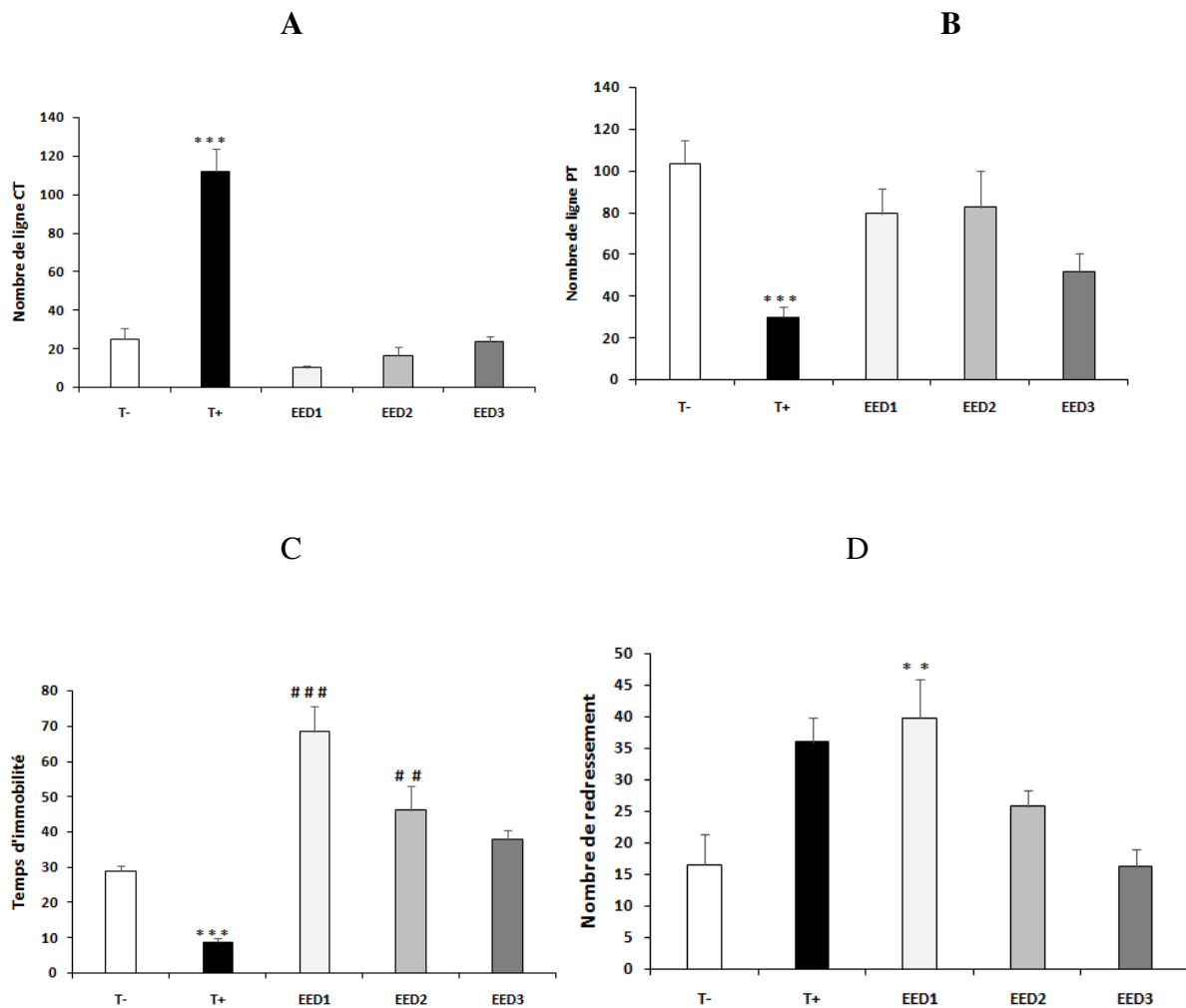


Figure 33: Effet de l'extrait éthanolique de *C. europaea* sur le comportement de la souris (A). Le nombre total de lignes centrales traversées (LCT), B. Le nombre total de lignes périphériques traversées (LPT), C. Le Temps d'immobilité et D. le nombre de redressements) dans le test de l'exploration champs libre. Les extraits ont été administrés par voie orale 30 min avant le test à raison de : [50 (EED1), 100 (EED2), 200 (EED3) mg de l'extrait éthanolique] /kg du poids de l'animal et intra-péritonéal pour Diazépam. Résultats présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ Vs. Témoin, ### $p \leq 0.001$, ## $p \leq 0.01$ Vs. Témoin positif.

II.1.2. Test chambre éclairée /obscur « Dark-Light Box »

Les paramètres comportementaux relevés dans ce test sont ; le temps passé par l'animal dans le compartiment obscur et le nombre de transitions effectuées entre les deux compartiments.

Les résultats obtenus dans la Figure 34 ont montré que l'administration des trois doses 50, 100, et 200 mg/kg (o.p) de l'extrait éthanolique de *C. europaea* a augmenté significativement le nombre de transitions effectuées par l'animal par rapport aux témoins positif (### $p \leq 0.001$) et négatif (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$). Aucune différence significative n'a été observée entre le temps passé dans le compartiment clair des souris témoins et celui des souris traitées par

l'extrait éthanolique dans ce test a l'exception de la dose EED1(50mg/kg p.o) qui a engendré l'augmentation le temps passé dans le compartiment clair(**p< 0,01).

L'administration du Diazepam (témoin positif) provoque une augmentation statistiquement significative du temps passé par l'animal dans le compartiment obscur (p < 0.05) (figure 34. B).

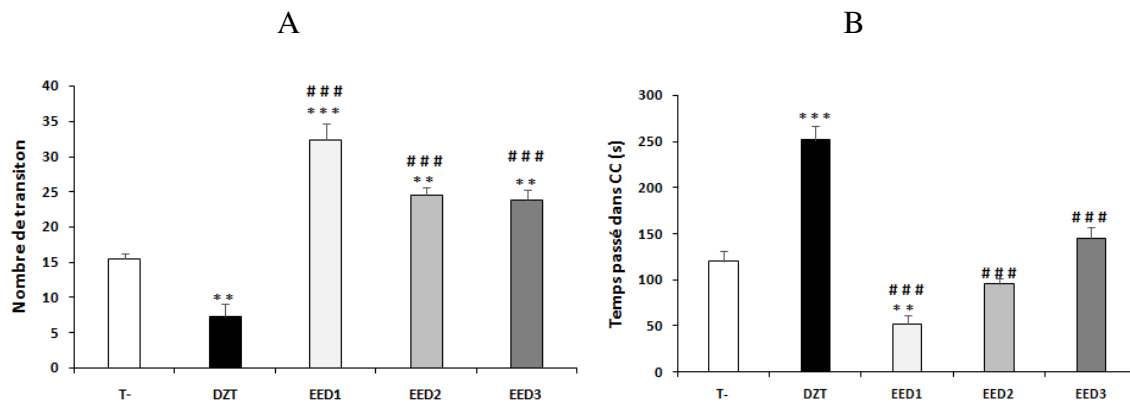


Figure 34: Effet de l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea* sur les paramètres comportementaux relevés au test de la chambre claire /obscur : (A).le nombre de transition. B. temps passé dans la chambre. Les extraits ont été administrés par voie orale 30 min avant le test à raison de [50 (EED1), 100 (EED2), 200 (EED3) mg /kg de l'extrait éthanolique et intrapéritonéal pour Diazepam à raison (10mg/kg). Résultats présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. ***p<0.001, **p<0.01 Vs. Témoin, ###p<0.001Vs.Témoin positif

II.1.3. Test labyrinthe en croix surélevé

L'évaluation de l'anxiété par le test du labyrinthe en croix surélevé, montre que l'administration de l'extrait éthanolique à une dose de 200 mg/kg induit une diminution significative du temps passé dans les bras fermés, alors que le traitement par une dose de 50 mg/kg provoque une augmentation du nombre de transition, par rapport au témoin (Figure 35).

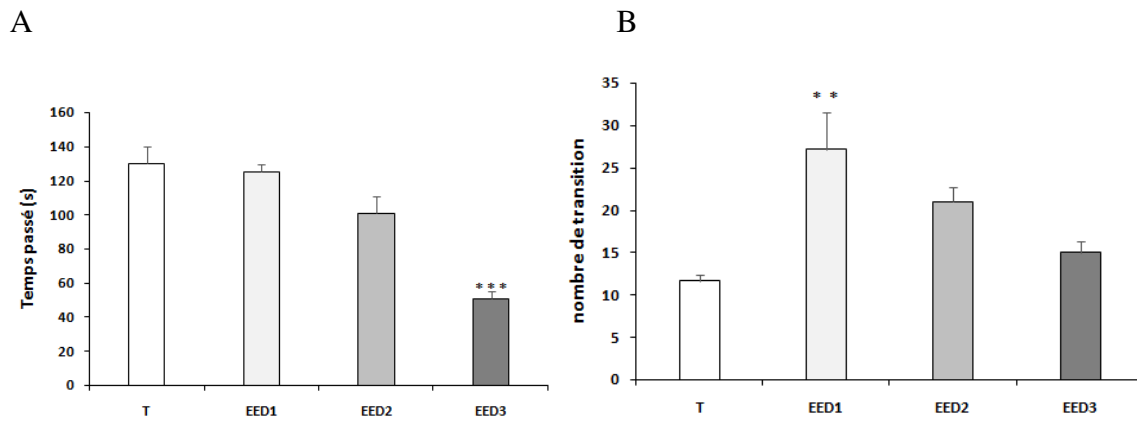


Figure 35: Effet de l'extrait éthanolique de *C.europaeasur* le comportement de la souris (**A.** Le temps passé dans les bras fermés, **B.** Le nombre total de transition) dans Test labyrinthe en croix surélevé. Les extraits ont été administrés par voie orale 30 min avant le test à raison de : [50 (EED1), 100 (EED2), 200 (EED3) mg de l'extrait éthanolique] /kg du poids de l'animal. Résultats présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ Vs. Témoin.

II.2. Effet de l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea* sur la dépression

Le Test de la nage forcée et le test de la suspension par la queue représentent deux expériences de référence pour l'étude de la dépression. La durée d'immobilité observée chez l'animal est considérée comme une mesure de l'état de désespoir de l'animal.

II.2.1. Test suspension par la queue

Les résultats de ce test montrent que l'administration de l'extrait éthanolique provoque une augmentation du temps d'immobilité principalement pour les plus grandes doses (100 et 200 mg/kg) alors que le traitement par une molécule antidépressive de référence l'anaphraline (ANF) (5 mg/kg, ip.) induit une diminution du temps d'immobilisation et par conséquent la dépression chez l'animal (Figure 36 B).

II.2.2. Test de la nage forcée

Les résultats de ce test confirment l'augmentation du temps d'immobilité après l'administration de l'extrait éthanolique à différentes doses alors que le traitement par une molécule antidépressive de référence l'anaphraline (5 mg/kg, ip.) induit une diminution du temps d'immobilisation (Figure 36 A).

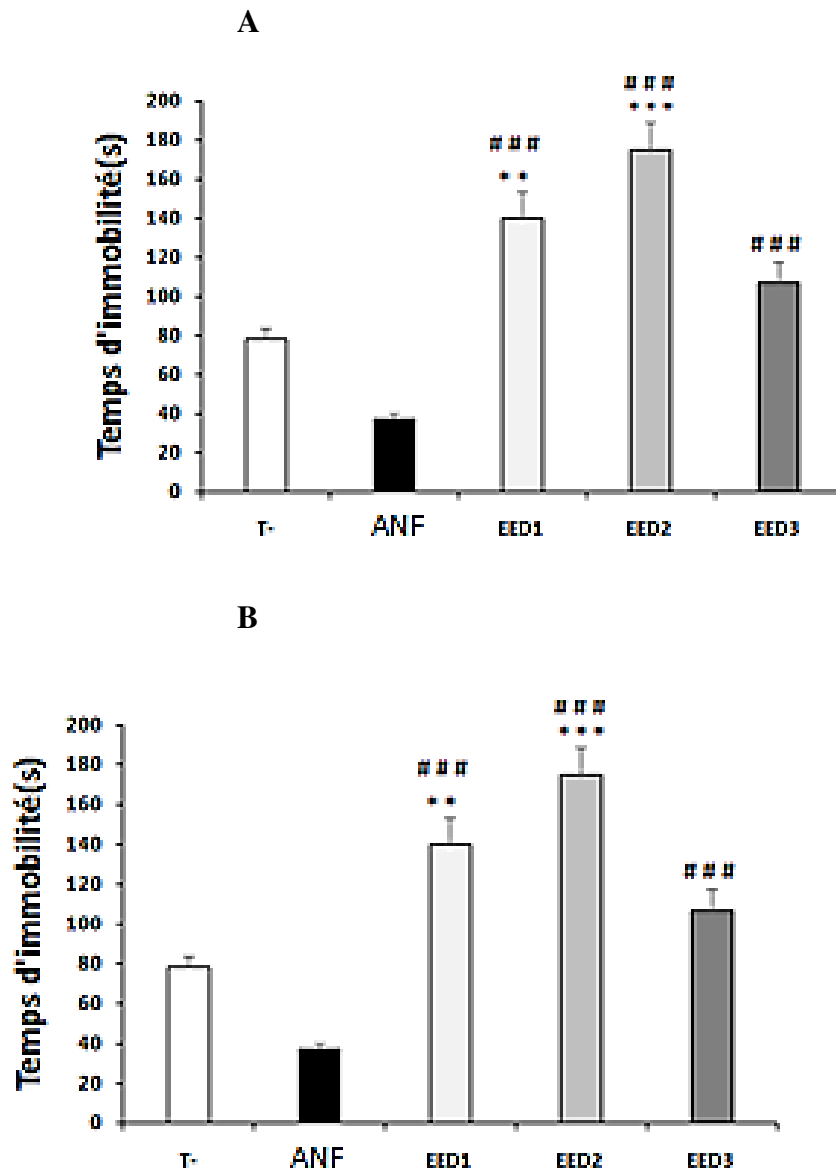


Figure 36: Effet de l'administration par voie orale de l'extrait éthanolique de *C. europaea* sur le temps d'immobilité au A. test de la nage forcée et B. test de suspension par la queue chez les souris. Temps d'immobilité pendant les 5 minutes. L'anaphraline(ANF)(5 mg/kg, ip.)administré par voie intra-péritonéale à raison de 60 µg/souris avant le test. Résultats présentés sous forme de moyenne ± S.E.M. ***p≤0.001, **p≤0.01 Vs. Témoin, ###p≤0.001, ##p≤0.01 Vs. Témoin positif.

III. Étude de l'activité anti-nociceptive des extraits de *C. europaea*.

III.1. Test de contorsion induite par l'acide acétique

Les résultats de ce test sont représentés par le nombre de contorsions effectuées par l'animal suite à l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique. Ces résultats montrent que l'extrait éthanolique et d'acétate d'éthyle (100 et 200 mg/kg, p.o.) réduisent significativement le nombre de contorsions induites par l'acide acétique ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif. En effet le pourcentage d'inhibition est de 63% pour les extraits éthanoliques (200 mg/kg, p.o.) et de 65% pour les extraits d'acétate d'éthyle (200 mg/kg, p.o.) qui se rapproche du pourcentage d'inhibition de l'aspirine (AAS) (66,8 %).

Tableau 10 : Résultats de la réponse nociceptive au test de contorsions en nombre contorsion et en Pourcentage d'inhibition. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM
*** $p < 0,001$ Vs. Contrôle.

Groups	Nombre de contorsion	Pourcentage d'inhibition (%)
Contrôle	145.0 \pm 17.78	0 \pm 0
ASA (200 mg/kg)	48.2 \pm 6.46 ***	66.86 \pm 2.84
EE (100 mg/kg)	53.0 \pm 2.58 ***	62.04 \pm 4.60
EE (200 mg/kg)	51.0 \pm 1.76 ***	63.00 \pm 4.24
EAE (100 mg/kg)	59.2 \pm 2.87 ***	57.05 \pm 4.92
EAE (200 mg/kg)	48.6 \pm 3.14 ***	65.00 \pm 3.27

III.2. Test au formol

La réponse nociceptive de ce test est représentée par le cumul du temps de léchage de la patte lésée par l'injection intra plantaire de formol à 2 %. Les résultats obtenus sont traités selon deux phases: phase précoce qui s'étend de 0 à 5 min et phase tardive qui s'étend de 15 à 30 min.

RESULTATS

Le traitement par EE et EAE (100 et 200 mg/kg, p.o.) a réduit significativement le temps de léchage de la patte lésée pendant les deux phases précoce et tardive par rapport au témoin ($p < 0,01$; $p < 0,001$). Cette diminution est proportionnelle à la dose de l'extrait administré. (Tableau.11).

En effet pour la phase précoce, les résultats montrent que l'extrait éthanolique réduit significativement le temps de léchage de la patte lésée à (90.54 ± 7.93 ** s) pour la dose 100mg/Kg et à (86.83 ± 4.37 **s) pour la dose 200mg/kg de même pour l'extrait acétate d'éthyle à (93.34 ± 4.33 **s) pour la dose 100mg/Kg et (72.26 ± 5.34 ***s) pour la dose 200mg/Kg par rapport au témoin qui est de (122.47 ± 8.84 s).

Pour la phase tardive, les résultats montrent aussi que l'extrait éthanolique réduit significativement le temps de léchage de la patte lésée à ($65.77 \pm 0,06$ ***s) pour la dose 100mg/Kg et à (42.16 ± 6.7 ***s) pour la dose 200mg/kg de même pour l'extrait acétate d'éthyle à (51.974 ± 0.13 ***s) pour la dose 100mg/Kg et (47.33 ± 0.52 ***s) pour la dose 200mg/Kg par rapport au témoin qui est de (179.51 ± 5.15)

Les résultats ont également montré que durant les deux phases, c'est la morphine qui présente l'inhibition maximale de la réponse nociceptive à (49.91 ± 3.47 ***s) pour la phase précoce, et à (30.01 ± 3.21 ***s) pour la phase tardive.

En plus, une comparaison de la réponse nociceptive des différents extraits testés durant les deux phases, c'est dans la phase tardive qu'on a noté une inhibition maximale de la réponse nociceptive de nos extraits qui se rapprochent du résultat de la morphine.

Tableau 11: Effet des extraits de *Caralluma europaea* sur la sensibilité nociceptive au test au formol. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM *** $p < 0,001$ par rapport au témoin (test ANOVA)

Groupe	Temps total de léchage	
	1 st phase	2 nd phase
Contrôle	122.47 \pm 8.84	179.51 \pm 5.15
EE (100 mg/kg)	90.54 \pm 7.93 **	65.77 \pm 0,06 ***
EE (200 mg/kg)	86.83 \pm 4.37 **	42.16 \pm 6.7 ***
EE (200 mg/kg) + Nalx	87.23 \pm 9.50 **	44.81 \pm 8.87 ***
EAE (100 mg/kg)	93.34 \pm 4.33 **	51.974 \pm 0.13 ***
EAE (200mg/kg)	72.26 \pm 5.34 ***	47.33 \pm 0.52 ***
EAE (200mg/kg) +Nalx	73.81 \pm 3.43 ***	57.53 \pm 0.53 ***
MOR (10 mg/kg)	49.91 \pm 3.47 ***	30.01 \pm 3.21 ***
MOR (10mg/kg) +Nalx	134.01 \pm 8.40	195.18 \pm 10.42
ASA (200mg/kg)	113.83 \pm 4.90	39.09 \pm 1.61 ***

III.3. Test de la plaque chauffante

Les résultats de ce test montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle a un effet significatif sur la sensibilité nociceptive de l'animal, par contre l'extrait éthanolique ne présente pas d'effet significatif par rapport au témoin négatif. Ainsi, l'administration orale de l'extrait acétate d'éthyle augmente significativement le temps de réaction de l'animal face au stimulus nociceptif de plus en plus qu'on augmente la dose 100 ($p < 0.001$), 200 ($p < 0.001$) mg/Kg. Cet effet n'atteint pas l'effet de la morphine utilisée dans cette expérience comme un analgésique central et qui augmente très significativement le temps de latence au stimulus nociceptif (Figure37).

Les résultats ont également montré que le prétraitement par la naloxone (1 g/kg, sc.) a réduit de façon significative l'effet analgésique de la morphine, sans modifier l'effet analgésique de l'EAE. (Figure38).

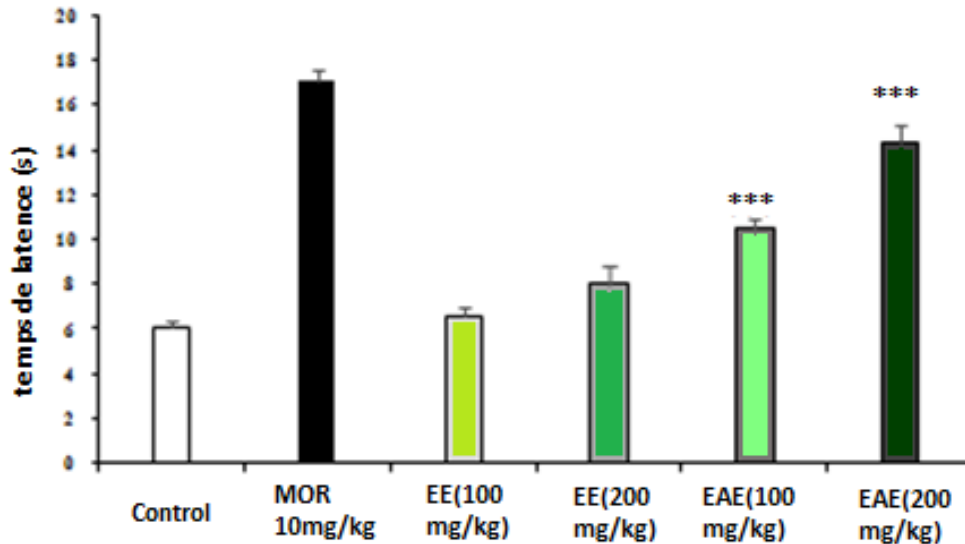


Figure 37 :Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de *Caralluma europaea* sur la réponse nociceptive des souris dans le test de la plaque chauffante. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM ***p< 0,001 par rapport au témoin (test ANOVA)

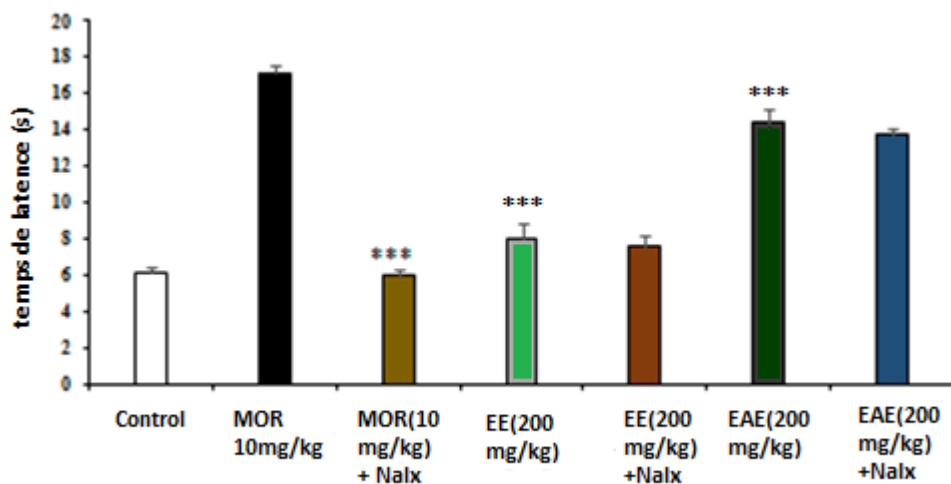


Figure 38:Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de *Caralluma europaea* sur la réponse nociceptive des souris prétraités par le Naloxone dans le test de la plaque chauffante. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM ***p< 0,001 par rapport au témoin (test ANOVA)

IV. Étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Caralluma europaea*.

Les résultats du test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène sont présentés dans les figures 39 et 40.

La figure 39 montre l'effet des extraits de *Caralluma europaea* sur le test d'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Après l'induction par xylène, on a observé une augmentation significative de la formation d'œdème chez les témoins. Les données sur l'activité anti-inflammatoire ont indiqué que toutes les concentrations testées des extraits de *Caralluma europaea* (EE et EAE (100 et 200 mg/kg)) ont réduit significativement et à doses dépendante l'œdème induit par le xylène par rapport au témoin ($p < 0,001$), en effet, le taux d'inhibition était 35%,42%, pour EE et 30 % et 47 % pour EAE à dose respectives 100mg/Kg et 200 mg/kg. Cette diminution reste inférieure à celle induite par le Diclofénac 49 %.

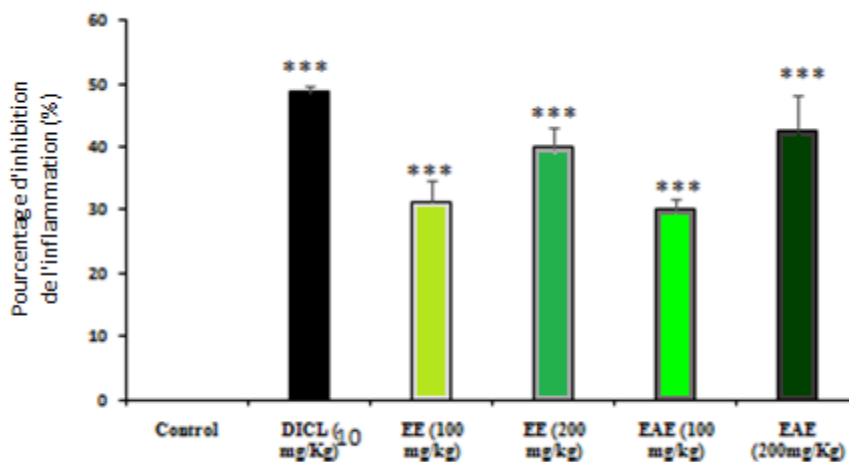


Figure 39: Effet des extraits éthanolique (EE) et acétate d'éthyle (EAE) de *Caralluma europaea* sur la réponse nociceptive des souris dans le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM *** $p < 0,001$ par rapport au témoin (test ANOVA)

La figure 40, illustre l'étude histologique des tissus de l'oreille ayant montré que l'application de xylène entraîne un œdème caractérisé par une augmentation marquée de l'épaisseur de l'épiderme, et une infiltration de leucocytes polymorphe nucléaire (PMN). L'administration orale d'extraits de *Caralluma europaea* (100 et 200 mg/kg) et de Diclofénac (10 mg/kg i.p) a considérablement réduit les changements indiqués.

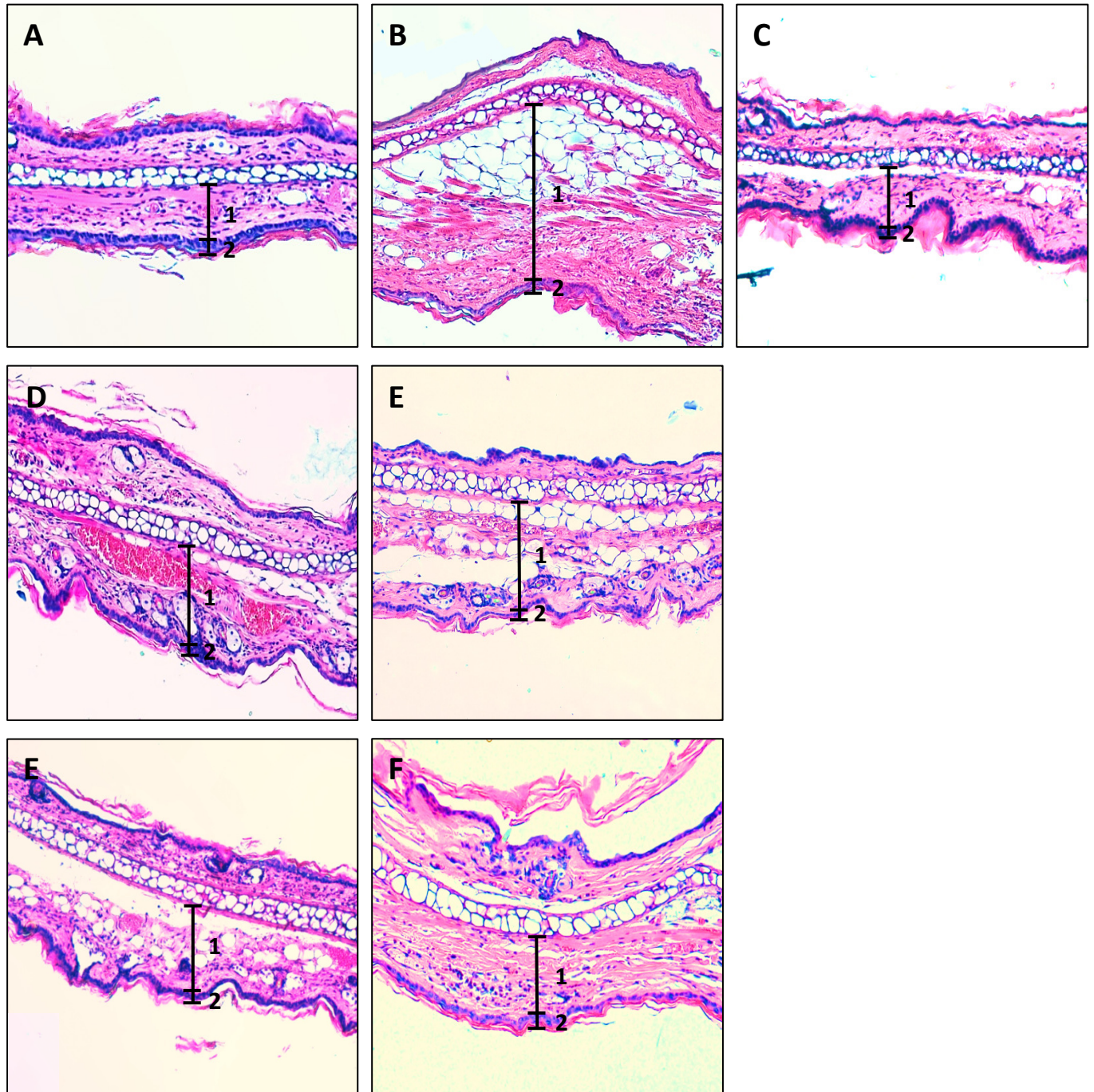


Figure 40: Coupes histopathologiques montrant l'œdème de l'oreille induit par le traitement au xylène. (A) Oreille normale ; (B) groupe témoin modèle induit par le xylène ; (C) traitement au Diclofénac (10 mg/kg) ; (D) traitement à l'Extrait éthanolique (100 mg/kg) ; (E) traitement à l'Extrait d'acétate d'éthyle (100 mg/kg) ; (F) traitement à l'Extrait éthanolique (200 mg/kg) ; et (G) traitement à l'Extrait d'acétate d'éthyle (200 mg/kg). 1 : épaisseur du derme ; 2 : épaisseur de l'épiderme. (HE × 100)

V. Effet hépato protecteur de *Caralluma europaea*

Les résultats de l'évaluation de l'effet hépato protecteur des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea* ont montré leurs capacités à réduire chez les rats les symptômes d'hépatotoxicité induite par CCl₄.

V.1. Les effets Morphologiques de l'induction de l'hépatotoxicité chez les rats.

Chez les rats traités avec CCl₄, nous avons observé une décoloration importante des muqueuses des oreilles qui a commencé une semaine après le début du traitement (Figure 41). Par ailleurs, les urines ont également changé de couleur à partir de la 3ème injection et sont devenues jaune foncée (Figure 42) et une asthénie qui s'installe de plus en plus qu'on injecte la CCl₄

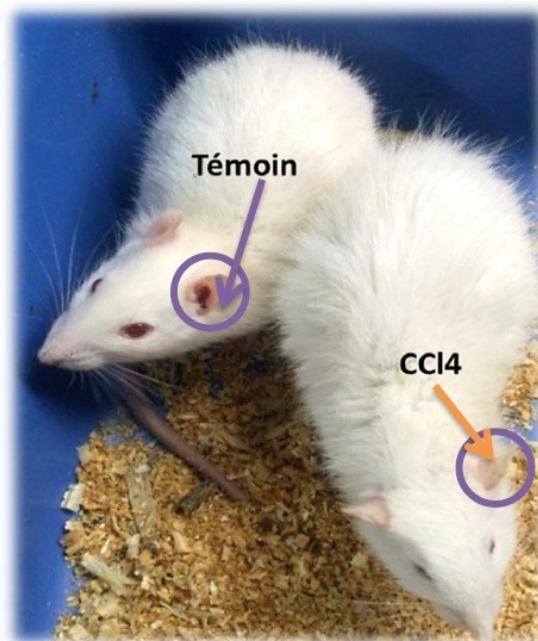


Figure 41:Image des rats témoins (positif et négatif)
: Oreille normale : Oreille décolorée

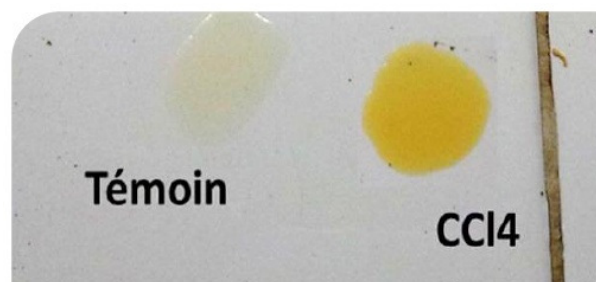


Figure 42:Image illustre la différence des urines entre le témoin positif et négatif.

V.2. Variation journalière du poids corporel chez les animaux traités par le CCl4 et les extraits de *Caralluma europaea* :

Pendant l'expérimentation, les rats ont été pesés régulièrement pour observer l'évolution de leur poids corporel et établir une corrélation avec l'administration des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea*. et l'injection du CCl4(Figure 43)

On note que l'injection du CCl4 inuit une diminution drastique du poids par rapport au témoin négatif dont le poids n'a presque pas changé tout le long de l'expérience. Le traitement par les extraits de *Caralluma europaea* a permis une amélioration de la prise du poids par rapport aux animaux traités seulement par le CCl4.

En effet les animaux dont on a co-administré l'extrait butanolique avec le CCl4 ont gardé leur poids presque constant tout au long du traitement. Au contraire, le poids des rats auxquels nous avons administré le CCl4 avec l'extrait éthanolique nous avons constaté une diminution progressive du poids mais sans atteindre les valeurs obtenues chez le groupe témoin positif.

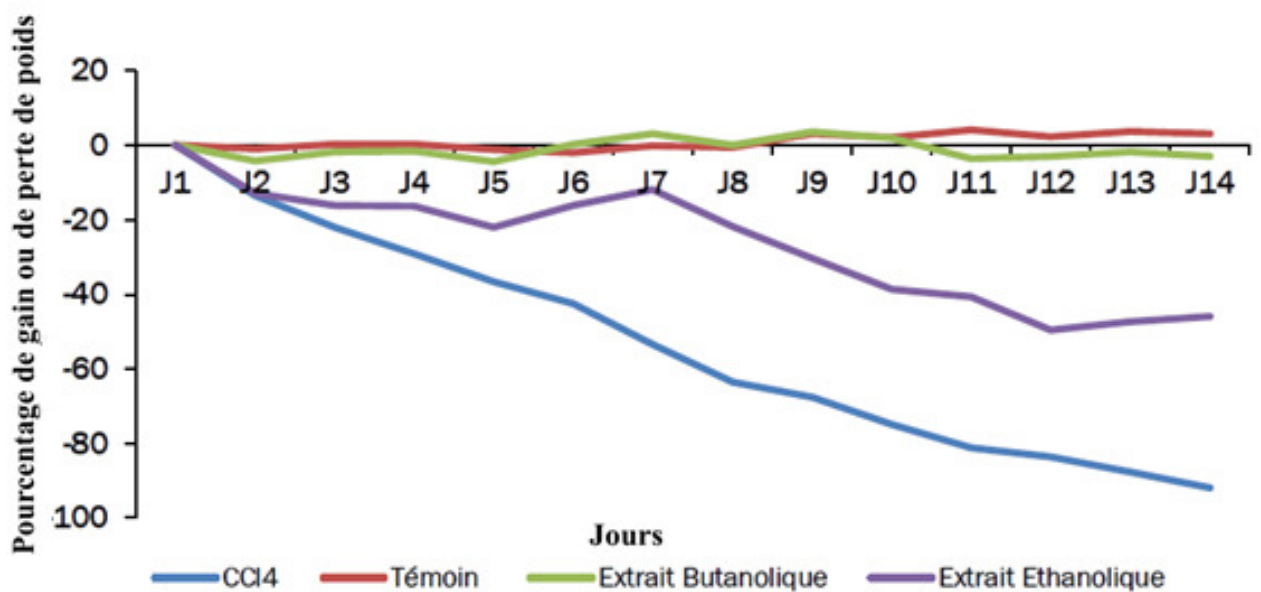


Figure 43: Variation de différence du poids corporel après administration de CCl4 et les extraits de *Caralluma europaea* chez les rats.

V.3. Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques

Le dosage des transaminases hépatiques ASAT et ALAT sont des biomarqueurs de la fonction hépatique et leur augmentation peut refléter un dysfonctionnement du foie.

Les résultats de notre étude (Figure 44) ont montré que chez les rats du lot témoin négatif les taux sériques des ALAT et ASAT sont respectivement de l'ordre de $47,383 \pm 1,949$ U/L et $125,2 \pm 1,243$ U/L.

L'administration du CCl₄ (1 ml/kg) chaque 72h a provoqué une augmentation de ce taux à des valeurs de 93,55±4,578U/L et 345,033±9,116 U/L respectivement, ce qui représente presque le double du taux de ces enzymes par rapport au le groupe témoin négatif.

Cependant, le traitement par les extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea* pendant 15 jours a conduit à une réduction significative (P<0,001) des taux sériques des transaminases par rapport au lot intoxiqué par le CCL4. Ainsi, chez les rats traités par l'extrait éthanolique les taux sériques ont diminué à des valeurs de 64,117± 1,757 U/L pour l'ALAT et 200,483± 9,533 U/L pour l'ASAT. Et pour l'autre lot traité par l'extrait butanolique ce taux est de l'ordre de à 56,45± 1,145U/L pour l'ALAT et de 175,783 ±3,291 U/L pour l'ASAT, qui se rapproche des valeurs obtenues chez le lot témoin négatif.

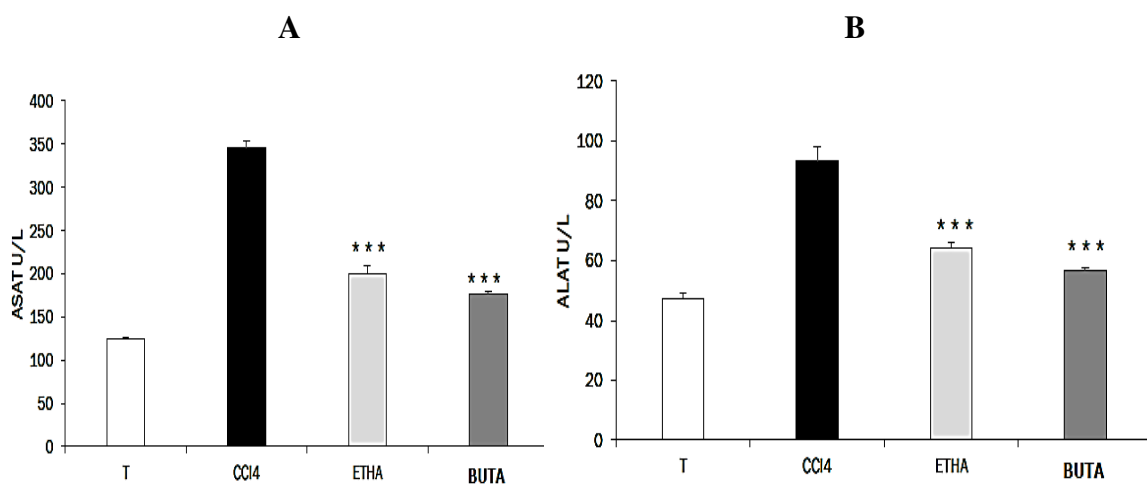


Figure 44:Effets de l'administration de CCl₄ et des extraits éthanolique et butanolique de la plante sur le taux des transaminases hépatiques. (A : ASAT, B : ALAT)

V.4. Résultats de l'étude histologique :

Observation macroscopique du foie : (Figure. 45)

Elle consiste en une observation de foies entiers des animaux expérimentés. Elle est qualitative et se limite aux caractéristiques externes du foie (couleur, volume et texture).

Les résultats de notre étude montrent que le foie des rats intoxiqués avec CCl₄ a changé de couleur. En effet, il est devenu pâle et brun clair avec la présence des ponctuations rougeâtres à sa surface donnant un aspect bigarré. Alors que, les foies des rats traités par les extraits de plante présentent moins de lésions par rapport aux rats intoxiqués et surtout les foies des rats auxquels nous avons administré l'extrait butanolique de *Caralluma europaea*.

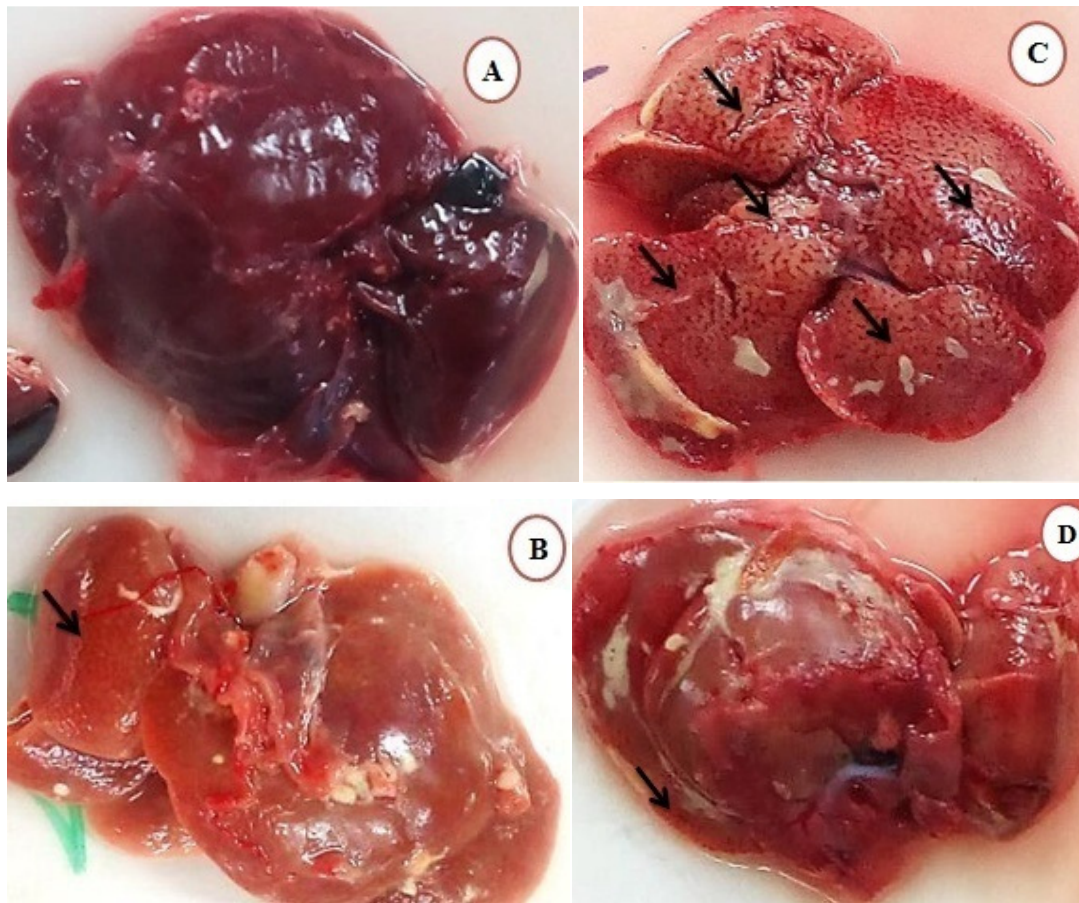


Figure 45: Images du foie entier des rats : les lésions hépatiques, A : rat témoin négatif, B : rat traité par l'extrait éthanolique, C : rat témoin positif, D : rat traité par l'extrait butanolique

Analyse microscopique du tissu hépatique :

L'analyse histologique du foie prélevé des rats témoins non intoxiqués a montré une organisation normale (Figure 46 A), alors que les rats intoxiqués avec CCl₄ présentent plusieurs lésions hépatiques importantes entre autres : dégénérescences vacuolaires, infiltration inflammatoire mononuclée, en plus de la présence de vastes zones de nécrose péricentrale étendue avec perte de l'architecture hépatique, hémorragie, et gonflement cellulaire (Figure 46 C).

L'analyse du tissu hépatique des animaux intoxiqués par le CCl₄ et traités par l'extrait éthanolique, montre l'apparition des dégénérescences hépatocytaires et des hémorragies moins intenses (Tableau 12) que celles observées chez les rats traités par CCl₄ (Figure 46 B). En plus, nous n'avons observé aucune atteinte hépatique chez les rats traités par l'extrait butanolique de la plante à l'exception de quelques hémorragies minimales (Figure 46D).

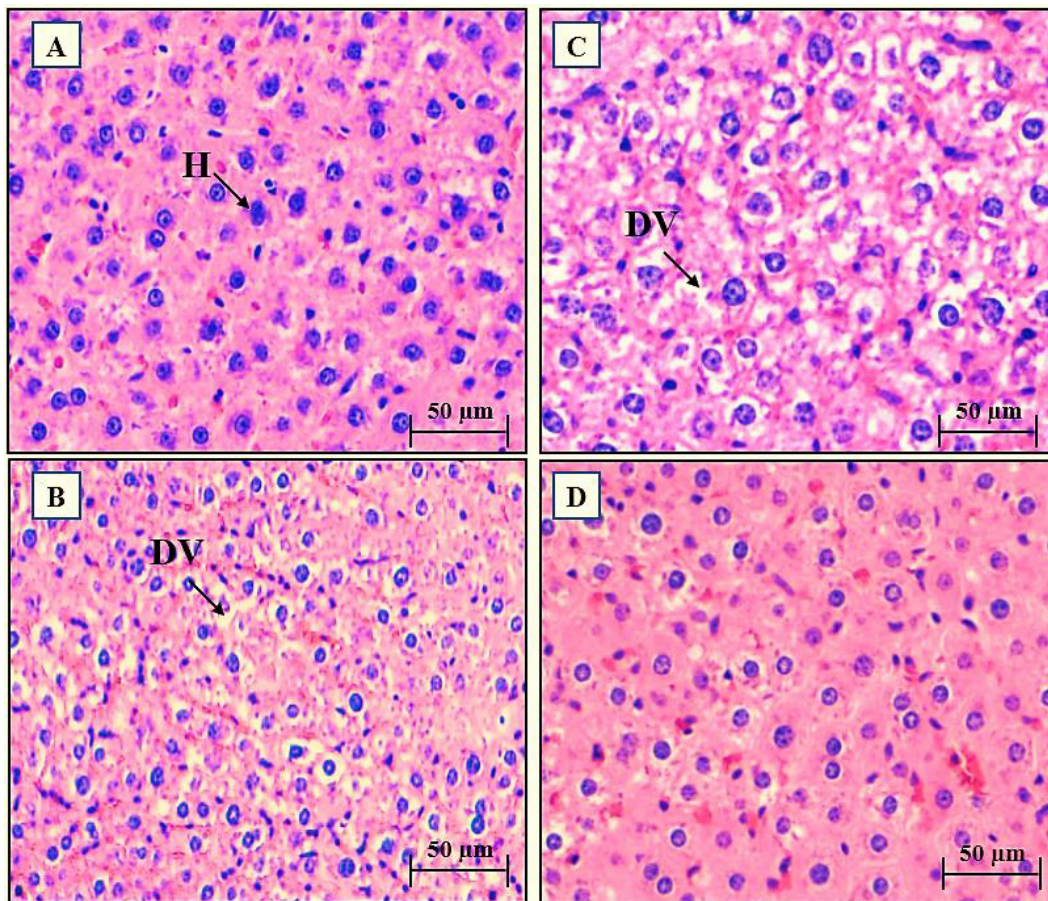


Figure 46: Lésions tissulaires du foie des rats A : Témoin négatif, B : Rat traité par l'extrait éthanolique, C : Témoin positif, D : Rat traité par l'extrait butanolique. H : Hépatocyte ; DV : Dégénérescence vacuolaire

Tableau 12 : Les intensités des lésions hépatiques présentes chez les rats (-):nulle (+):peu modéré (++) :modéré (+++) :élevé

Lésions hépatiques	Groupes			
	Témoin	CCl4	Extrait éthanolique	Extrait butanolique
Dilatation des capillaires sinusoïdaux	-	+++	+	-
Infiltration inflammatoire mononuclée	-	+++	+	-
Dégénérescence hépatocyttaire	-	+++	+	-
Hémorragies	-	+++	++	+

VI. Etude de l'activité anti-lithiasique de *Caralluma europaea*

VI.1. Variation du poids corporel des rats

La figure 47 représente la variation du pourcentage de gain ou de perte de poids en fonction du temps. L'analyse des courbes montre que l'éthylène glycol provoque une chute très significative du poids corporel. En effet, les rats perdent plus de 40 g au bout des 10 jours de l'expérience, ce qui est très important par rapport au témoin négatif. Cette diminution du poids est moins prononcée, principalement lors de l'administration des extraits Butanolique (-5,5 g/10j) et hénanique (-7 g/10j) de *C. europaea*.

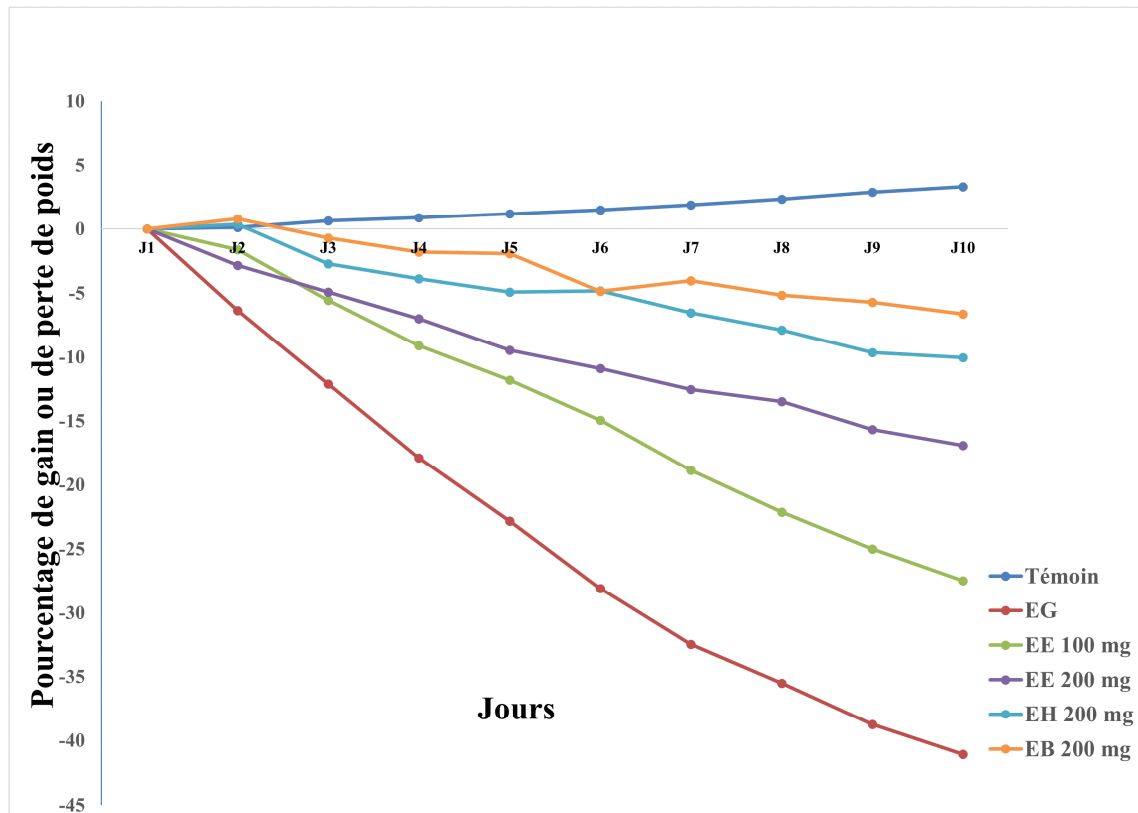


Figure 47: Variation du poids corporel des rats après administration de l'éthylène glycol et traitement par les extraits de *C. europaea*.

VI.2. Analyse biochimique des marqueurs de la fonction rénale

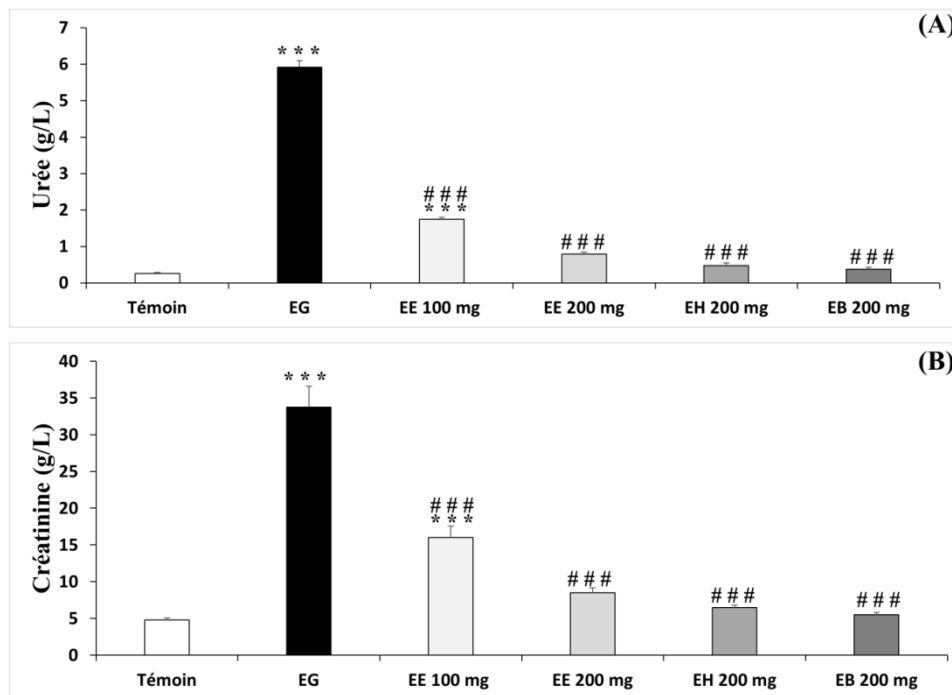


Figure 48: Taux sériques d'urée (A) et de la créatinine (B) Valeurs exprimées en Moyenne \pm écart type pour 6 animaux dans chaque groupe (n=6). Les valeurs sont significativement différentes comparées aux témoins négatifs quand *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

Les résultats de l'analyse des taux sériques des marqueurs biochimiques de la fonction rénale montrent que l'administration de l'éthylène glycol provoque une augmentation significative du taux de l'urée et de la créatinine sériques. Par contre, l'administration de l'extrait éthanolique entraîne une diminution dose dépendante du taux de l'urée et de la créatinine. En plus l'utilisation des extraits héxanique et butanolique à une dose de 200 mg/kg, le taux de ces deux éléments diminue significativement et devient comparable à celui du témoin (Figure 48).

VI.3. Analyse histologique du rein

Chez les témoins positifs, l'examen des coupes histologiques des reins droits a montré des lésions tissulaires très marquées caractérisées essentiellement par désorganisation morphologique des glomérules et de tubules, hémorragies, congestions et infiltrations de cellules mononuclées (Figure49, Tableau13).

Chez les rats traités et surtout ceux ayant reçu l'extrait éthanolique avec les deux doses (Figure 49, Tableau 13), nous avons noté la présence de quelques lésions tissulaires

désorganisation morphologique des glomérules et de tubules, hémorragies, congestions et infiltrations de cellules mononuclées (Figure 49).

Cependant, lors de l'administration de l'extrait hexanique, seul quelques lésions tissulaires persistent, mais pas autant que celles observées chez les témoins positifs. Lors du traitement par l'extrait butanolique nous avons noté l'absence d'altérations histologiques (Figure 45, Tableau13).

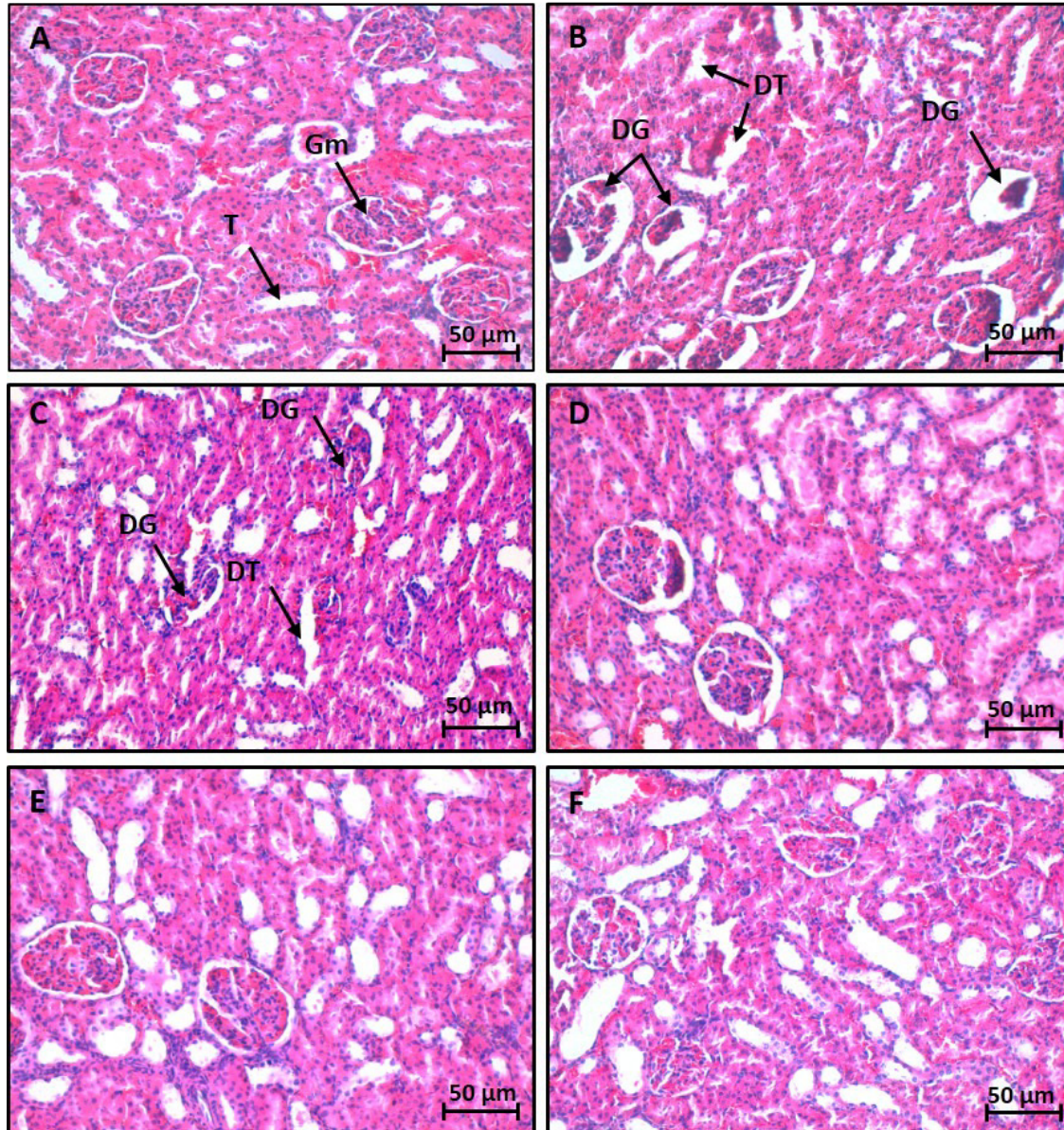


Figure 49: Coupes histologiques du rein observées au microscope optique. **A** : témoin négatif, **B** : témoin positif, **C** : traité par l'extrait éthanolique 100 mg/kg, **D** : traité par l'extrait éthanolique 200 mg/kg, **E** : traité par l'extrait hexanique 200 mg/kg, **F** ; traité par l'extrait Butanolique 200 mg/kg. Les flèches indiquent les altérations histologiques présentées sur le tableau.

Tableau 13 :Taux des altérations histologiques observées au niveau des reins des groupes témoins et des groupes traités par les extraits éthanolique, hexanique et butanolique de *C. europaea*.

	Groupes					
	Témoin	EG	EE 100 mg	EE 200 mg	EH 200 mg	EB 200 mg
Désorganisation morphologique de glomérule	-	+++	+++	++	-	-
Désorganisation morphologique de tubule	-	+++	++	+	-	-
Hémorragies	-	++	+	+	-	-
Congestions	-	++	+	+	+	-
Infiltrations de cellules mononuclées	-	++	++	+	+	-

Tableau 14:Taux des cristaux d’oxalate de calcium observées au niveau des reins des groupes témoins et des groupes traités par les extraits éthanolique, hexanique et butanolique de *C. europaea*.

	Témoin	EG	EE 100 mg	EE 200 mg	EH200 mg	EB 200 mg
Cristaux d’oxalate de calcium	-	+++	+	+	-	-

L’observation des coupes histologiques des reins par le microscope polarisant a permis de mettre en évidence la présence des cristaux d’oxalate de calcium. Le taux le plus élevé des cristaux d’oxalate de calcium a été observés dans les reins des rats témoins positifs. Suite à l’administration de l’éthylène glycol, tous les rats témoins positifs ont développé la lithiase, les cristaux d’oxalate de calcium se déposent aux différents niveaux des reins (Figures 50).

Lorsqu’on administre en supplément l’extrait éthanolique à une dose de l’ordre de 100 mg/kg du poids corporel, il n’exerce aucun effet sur le dépôt des cristaux dans les reins (Figure50).

RESULTATS

Nous remarquons également qu'en présence des extraits éthanolique et hexanique (200mg/kg), seul quelques rats ont développé quelques cristaux d'oxalate de calcium et quelques amas au niveau du rein (Tableau14).

En parallèle, une inhibition très marquée de la cristallisation a été observée lors de l'administration de l'extrait butanolique à une dose de l'ordre de 200 mg/kg du poids corporel (Figure 50), D'autre part, nous n'avons pas constaté de dépôt cristallin chez les témoins négatifs (Figure 50).

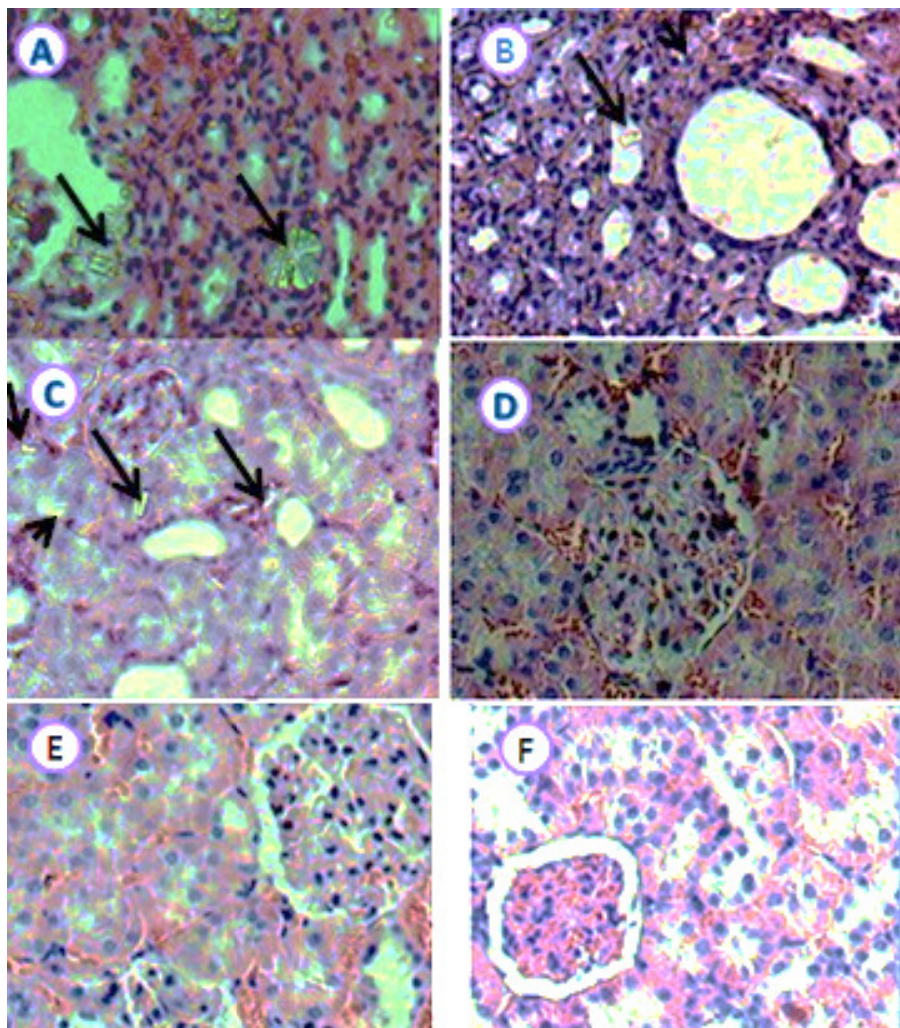


Figure 50: Coupes histologiques du rein observées au microscope optique ($\times 100$). **A** : témoin positif **B** : traité par l'extrait éthanolique 100 mg/kg, **C** : traité par l'extrait éthanolique 200 mg/kg, **D** : traité par l'extrait hexanique 200 mg/kg, **E** : traité par l'extrait Butanolique 200 mg/kg, **F** ; témoin négatif. Les flèches indiquent les formations cristallines implantées dans le rein.

Partie IV : DISCUSSION

La phytochimie de notre plante *Caralluma europaea*

Dans notre travail et après avoir identifié botaniquement et pesé notre plante nous avons procédé une extraction par macération à l'éthanol des parties aériennes de *Caralluma europaea* après avoir séchée et pulvérisée cette dernière.

L'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction présente plusieurs avantages ; sa polarité faible par rapport au méthanol, ce dernier exerce un effet méthanolyse sur les tanins pouvant perturber la teneur réelle des extraits en ces composés, d'autant plus que l'éthanol est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. (Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001).

Le rendement de l'extraction à l'éthanol est de 9,2%, ce résultat coïncide avec les résultats des travaux de Sagou et al.,(2016) qui stipule que le rendement de *Caralluma europaea* est supérieur à 7%.L'extrait total a été sujet d'un fractionnement successif par des solvants apolaire ; l'hexane, l'acétate d'éthyle en plus le n-butanol solvant polaire. Cette partie nous a permis de récupérer trois extraits : l'extrait hexanique (8,69%), l'extrait d'acétate d'éthyle (66,30 %) et l'extrait butanolique (22,83%) soit 97,82 % de 100 % de l'extrait éthanolique.

Nous avons procédé par la suite aux dosages des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés) par spectrophotométrie, nos résultats sur les composés phytochimiques de la plante, sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs (Ait Dra et al. (2017) et Sagou et al. (2016). En effet, les extraits éthanolique et butanolique issus des deux solvants polaires ont montré un taux très élevé des polyphénols par contre ce taux a été faible pour l'extrait d'acétate d'éthyle issu d'un solvant apolaire. Ce résultat ne peut être expliqué que par le fait que l'extrait éthanolique présente des polyphénols à caractère lipophile extraits par solvants apolaires et des polyphénols de nature polaire extraites par les alcools.

La teneur des flavonoïdes dans les extraits issus des solvants apolaires sont faibles (hexane), alors qu'elle est plus importante dans l'extrait d'acétate d'éthyle et plus forte pour l'extraits butanolique (polaire).

De même pour les tanins, les teneurs sont faibles dans les extraits par des solvants apolaires et plus faibles dans les extraits par des solvants polaires, avec des teneurs faibles dans l'ensemble.

Il ressort clairement des résultats que les extraits étudiés de notre plante, contiennent des quantités variables de substances phytochimiques et que cette diversité est affectée d'une part par la polarité des solvants utilisés, c'est-à-dire que les solvants polaires et leurs affinités (éthanol et butanol) et d'autre part par la nature chimique de ces composés secondaires qui varie en fonction de leurs polymérisations

L'analyse par HPLC nous a permis la quantification et l'identification des composés phénoliques pour les quatre extraits de *Caralluma europaea*.

Ainsi, dans l'extrait éthanolique, nous avons trouvé la quercétine, la catechine, le p-Coumarique, l'acide rutique, l'acide synapique, le 2-hydroxysinomique, l'acide sorbique, l'acide furrulique, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide vanilique, l'acide catechique et l'acide ascorbique.

Pour l'extrait hexanique, trois composés nouveaux ont été identifiés l'acide gallique, l'epicotechin et l'acide ferrique. Tandis qu'un seul composé nouveau, la rutine, a été identifié dans l'extrait d'acétate d'éthyle. Et pour l'extrait butanolique nous avons identifié 2 composés nouveaux à savoir l'acide tanique et acide coumarique

Ces métabolites identifiés dans nos extraits ont été sujets de plusieurs études phytochimiques et pharmacologiques. En effet, la quercétine, présente une activité antioxydante et une activité anti-inflammatoire importante. D'après Valério et al. (2009) l'effet anti-inflammatoire serait attribué à l'inhibition du stress oxydatif et à l'inhibition de la production de cytokines. Tandis que l'acide Ferrulique est qualifié comme nutriment acide présentant des activités antioxydantes et anti-inflammatoires, (Wu et al., 2015) et impliqué dans l'effet antidépresseur (Chen, et al., 2015) effets antinociceptifs (Xu et al., 2016), dans l'effet antiallergique (Lee et al., 2015) et dans l'activité anti-apoptotique (Lin et al., 2015 ; Shen et al., 2016). D'après plusieurs auteurs, le rutin ou la quercétine-3-rutinoside, ou la sophorine possède un certain nombre d'activités pharmacologiques, notamment antioxydante, cytoprotectrice, vasoprotectrice, anticancérogène, neuroprotectrice et cardioprotectrice (Javed et al., 2012 ; Richetti et al., 2011 ; Nassiri-Asl et al., 2010 ; Mellou et al., 2006 ; Trumbeckaite et al., 2006 ; Schwedhelm et al., 2003 ; Janbaz et al., 2002 ; La Casa et al., 2000).

La présence de ces métabolites en grande quantité dans nos extraits présume que ces extraits peuvent avoir des propriétés pharmacologiques importantes et principalement l'activité

antioxydante. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de nos extraits par deux méthodes ; le test du piégeage des radicaux libres DPPH et le test du pouvoir réducteur du fer. Les résultats de cette étude montrent que les extraits de *C. europaea* et principalement l'extrait butanolique, possède une activité antioxydante très importante même si cette activité reste inférieure à celle des antioxydants de référence (BHT et Quercétine). Ces résultats sont en accord avec une étude précédente rapportant que les composés phénoliques ont une activité antioxydante élevée (Villano et al., 2007). Ces composés exercent une activité antioxydante et sont capables de neutraliser les radicaux libres en formant des radicaux phénoxyles stabilisés par résonance (Soobrattee et al., 2005). Nos résultats corroborent d'autres travaux, en effet, Ait Dra et al., (2019) ont rapportés que l'extrait total de *C. europaea* possède une capacité très élevée à piéger les radicaux libres par le test de DPPH.

En général, les extraits de notre plante possèdent une activité antioxydante très importante, mais reste dix fois plus faible que celle des antioxydants de référence (BHT et Quercétine). Ce constat rejoint les travaux de Ait Dra et al., 2017.

L'étude de la toxicité aigüe de notre plante a montré que les extraits de *Caralluma europaea*, n'ont causé aucun signe de toxicité, avec des DL50 supérieurs à 5g/kg. Ces résultats rejoignent ceux effectués par Ait Dra et al., 2019 et ceux de Saygou et al., 2016. Ce résultat prouve que notre plante n'est pas toxique d'un point de vue de toxicité aigüe. Cependant, le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM), a relevé 7 cas d'intoxication après l'utilisation de *C. europaea* (CAPM, 2013). Ce constat contradictoire à nos travaux peut être expliqué par le fait que deux plantes présentent les mêmes noms vernaculaires ADDAGHMOUSS et ZAKKUM attribuée à notre plante et *Euphorbia resinifera* une espèce appartenant à la famille des Euphorbiacées reconnue comme une plante toxique (Bellakhdar, 1997). Ces appellations différentes prêtent à confusion et peuvent induire en erreurs et seraient probablement à l'origine des intoxications rapportées mais qui seraient probablement dues à des intoxications par l'euphorbia, plante dont le latex est très toxique.

Afin d'évaluer l'état d'anxiété après administration des extraits de *C. europaea*, nous avons utilisé trois tests comportementaux : test de l'exploration libre ou champs ouvert, test de la chambre claire/obscur et le test labyrinthe en croix surélevé. Le modèle du champ ouvert examine en plus de l'activité locomotrice des animaux, les comportements liés à l'anxiété. Ce comportement est caractérisé par l'aversion normale de l'animal aux zones ouvertes et fortement éclairées (Whimbey et Denenberg, 1967 ; Asano, 1986). En effet, les animaux ont

peur du centre aversif et passent ainsi plus de temps dans les coins protégés. Les substances anxiolytiques réduisent cette aversion naturelle et favorisent l'exploration de telle sorte que le temps passé dans les coins soit considérablement réduit et que le temps passé au centre soit augmenté. Alors que les substances anxiogènes augmentent l'aversion naturelle de l'animal et augmentent ainsi le temps passé par les animaux dans les parties périphériques par rapport au centre. Dans notre étude, les animaux traités par l'extrait éthanolique de *C. europaea* explorent moins le centre (les zones les plus aversives) du dispositif par rapport au témoin positif. Ce ci ne peut être expliqué que par la teneur de l'extrait éthanolique de notre plante des substances à effet anxiogénique. Pour confirmer cette constatation nous avons procédé à deux tests spécifiques à l'évaluation de l'anxiété ; le test de la chambre claire/obscur et le labyrinthe en croix surélevé.

Dans le test de la chambre claire/obscur, l'animal est introduit de force dans un milieu nouveau dépourvu de ses repères familiers. Ceci constitue une situation très aversive et anxiogène (situation contraignante) pour lui. Cette situation a pour effet d'entraîner une inhibition du comportement général de l'animal dans ce compartiment non familier. Les deux paramètres comportementaux relevés dans ce test sont le temps passé dans le compartiment clair et le nombre de transitions effectuées entre les deux compartiments. D'après la littérature, c'est surtout l'augmentation du temps passé dans le compartiment clair associé à une augmentation du nombre de transitions qui est considéré comme un indice d'une diminution de l'état anxieux de l'animal (Young et Johnson, 1991). Ces deux paramètres sont largement utilisés pour étudier le profil anxiolytique des psychotropes (Flausino et al., 2002). Au vu de ces données, nous pouvons supposer que l'extrait éthanolique augmente le niveau de l'anxiété de l'animal, cette augmentation est marquée par une diminution du temps passé dans la chambre claire.

Dans le test du labyrinthe en croix-surélevé (Plus-Maze), l'extrait éthanolique de *C. europaea* a réduit l'exploration dans les bras ouverts, résultat semblable à celui trouvé après traitement par des substances anxiogènes. Ce test est conçu pour déterminer les substances à activité anxiolytiques (Hogg, 1996). L'extrait éthanolique a induit une augmentation du temps passé dans les bras fermés, cette préférence semble refléter une aversion pour les bras ouverts, générée par la peur et l'anxiété ou par la présence d'un effet sédatif.

Ainsi, à partir des résultats obtenus, nous pourrions confirmer d'une part que l'extrait éthanolique de *Caralluma europaea* aurait un effet anxiogénique et sédatif. Des effets

similaires ont été observés lors du traitement par d'autres plantes. En effet, Molina - Hernandez et al., (2000) ont rapporté que l'administration de l'extrait aqueux de *Agastache mexicana* peut induire un effet anxiogène. Une autre étude des effets de l'extrait méthanolique d'*Artocarpus lacucha* sur les activités neurocomportementales a démontré que cet extrait provoque une augmentation de l'état de l'anxiété chez les animaux traités (Mokarram et al., 2010).

Concernant l'étude de l'activité anti dépressive, le stress est généralement considéré comme un modèle idéal pour étudier la dépression, car il imite plusieurs symptômes dépressifs humains et convient mieux à l'étude des bases neurobiologiques de la dépression (Willner et al., 1992). Par conséquent, dans la présente étude, nous avons étudié les effets de l'extrait éthanolique sur la dépression en utilisant deux tests mettant l'animal en situation de stress à savoir le test de suspension par la queue et le test de la nage forcée. En effet, ces deux tests sont largement utilisés pour détecter et caractériser l'efficacité de nouveaux médicaments antidépresseurs ainsi que leurs mécanismes neurobiologiques (Bourin et al., 2005). Ces modèles animaux étaient basés sur le comportement de désespoir ou d'impuissance dans certains espaces inévitables et confinés chez les animaux. La présente étude a montré que l'administration de l'extrait éthanolique provoque une augmentation du temps d'immobilité principalement pour les plus grandes doses (100 et 200 mg/kg) alors que le traitement par une molécule antidépressive de référence (anphraline (5 mg/kg, ip.) induit une diminution du temps d'immobilisation.

D'après l'analyse des effets comportementaux de l'administration de l'extrait éthanolique de *C. europaea* et la comparaison avec l'étude sur l'anxiété, il ressort que cette plante renferme des molécules à caractère anxiogène et sédatif, alors l'utilisation de cette plante dans les traitements traditionnels doit être effectuée avec précaution.

L'effet de l'administration des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité anti nociceptive et inflammatoire chez la souris

Pour évaluer l'effet analgésique et anti-inflammatoire des extraits éthanoliques et d'acétate d'éthyle (EE et EAE) de *Caralluma europaea*, quatre expériences ont été menées. L'effet analgésique périphérique des extraits a été étudié à l'aide du test de contorsion. L'implication des mécanismes centraux a été étudiée à l'aide du test de la plaque chauffante, connu pour activer les voies vertébrales supra spinales et nociceptives (Paulino et al., 2003, Arslan et Bektas, 2010). Le test de formol a été utilisé pour explorer les mécanismes périphériques et

centraux (Tjølsen et *al.*, 1992). En outre, pour différencier l'effet anti nociceptif central et périphérique de l'EE et de l'EAE, la naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes qui bloque l'effet anti nociceptif central des analgésiques/opioïdes, a été coadministrée avec les deux extraits.

Habituellement, le test de contorsion induit par l'acide acétique est principalement utilisé pour examiner l'activité antinociceptive des composants naturels (Khan et *al.*, 2010 ; Ibrar et *al.*, 2012). La libération de plusieurs médiateurs endogènes tels que la sérotonine, la bradykinine, l'histamine et la substance P est produite par l'acide acétique. La contraction des muscles abdominaux est associée à l'allongement du corps et à l'extension des membres postérieurs qui caractérisent la douleur causée par l'acide acétique (Ibrar et *al.*, 2012). On suppose que les récepteurs péritonéaux locaux ainsi que les voies prostaglandines sont impliqués dans la contraction abdominale (Al-Harrasi et *al.*, 2014). Dans cette étude, le prétraitement des souris par l'EE et l'EAE a produit un effet analgésique significatif lié à la dose dans le test de contorsion induit par l'acide acétique, cet effet est particulièrement élevé lorsque l'EAE a été administré à la dose de 200mg/kg. L'activité anti nociceptive observée après l'administration orale de *Caralluma europaea* EE et EAE peut survenir en raison du blocage des voies prostaglandines ou de l'inhibition des médiateurs endogènes.

Le test de la plaque chauffante est un test de la douleur dans lequel des analgésiques opioïdes ou centraux appliquent leurs effets analgésiques par l'intermédiaire de récepteurs supra spinaux et spinaux (Abbott et Melzack, 1982). Les résultats de ce test montrent que le groupe Morphine présente un effet anti nociceptif significatif. L'administration orale d'extraits d'EAE a également un fort effet analgésique dans ce modèle. Toutefois, l'utilisation de la naloxone a complètement inversé l'effet anti nociceptif de la Morphine, tandis que l'action anti nociceptive de l'EAE n'a pas été inversée par la naloxone. Ainsi, le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à l'action antinociceptive de l'extrait dans les tests de la plaque chauffante et du formol semble(nt) n'avoir aucun rapport avec le système opioïde.

Afin de confirmer l'activité antinociceptive de nos extraits, le test de formol a été sélectionné. Les résultats ont montré que le temps passé à lécher la patte blessée a été considérablement réduit pour les deux phases suite à l'administration orale d'EE et d'EAE. L'extrait acétate d'éthyle a été très efficace à la dose de 200 mg/kg que l'extrait éthanolique. Nos résultats montrent également que les médicaments à action périphérique, l'acide acétylsalicylique, ne réduisent la nociception que tardivement en inhibant le processus inflammatoire (Hunskar et

Hole, 1987 ; Rosland et *al.*, 1990). Ces résultats suggèrent que l'EE et l'EAE exercent leur action analgésique aux niveaux central et périphérique.

L'activité antinociceptive potentielle pourrait être liée à la forte teneur en polyphénols des plantes, en particulier les flavonoïdes et les tanins (Orhan et *al.*, 2007). Il est bien établi que les flavonoïdes ont un effet analgésique puissant sur le test de contorsion induit par l'acide acétique (Calixto et *al.*, 2000 ; Ahmed et *al.*, 2007). Le mécanisme de l'effet analgésique des extraits polyphénoliques peut être lié au processus impliqué dans l'inhibition de la sensibilisation des nocicepteurs, la régulation des nocicepteurs sensibilisés et/ou le blocage des nocicepteurs au niveau périphérique et/ou central (Ferreira et *al.*, 1990). Les flavonoïdes sont connus pour arrêter la synthèse des prostaglandines. Des études biochimiques sur le mécanisme d'action des flavonoïdes ont révélé que ces composés peuvent inhiber un large éventail d'enzymes. Les polyphénols présents dans cette plante peuvent être responsables des activités analgésiques observées.

L'inflammation aiguë induite par le xylène chez la souris a généralement été utilisée comme l'une des méthodes classiques de détection de l'efficacité des agents anti-inflammatoires (Hosseinzadeh et *al.*, 2002 ; Kou et *al.*, 2005). Dans le cadre de ces travaux, les effets des extraits EE et EAE de *Caralluma europaea* sur l'inflammation aiguë induite par le xylène ont été étudiés. Après l'application topique de xylène, des augmentations marquées du poids de l'oreille ont été détectées en raison de la réponse inflammatoire aiguë ; ces augmentations du poids de l'oreille ont été utilisées comme marqueurs de valeur pour les effets anti-inflammatoires (Al-Majed et *al.*, 2003 ; Ojewole, 2005). Dans la présente étude, l'augmentation du poids de l'oreille a été inhibée en fonction de la dose par le prétraitement par les deux extraits et le Diclofénac (médicament anti-inflammatoire non stéroïdien). Histopathologiquement, une vasodilatation sévère, une infiltration de cellules inflammatoires et des modifications œdémateuses de la peau ont été détectées comme signes d'inflammation aiguë après application de xylène (De La Puerta et *al.*, 1996 ; Kou et *al.*, 2003 ; Rotelli et *al.*, 2003) ; en raison de ces altérations histopathologiques, l'épaisseur des tissus des oreilles était également nettement accrue. Cependant, ces changements histopathologiques et l'épaisseur des tissus de l'oreille ont diminué d'une manière dose-dépendante après le prétraitement avec les extraits EE et EAE de *Caralluma europaea*. Cette inhibition peut être considérée comme une preuve directe que les deux extraits utilisés dans cette étude ont un effet sur la réduction de la réponse inflammatoire aiguë, qui est similaire à celle observée suite à l'injection du

Diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien). Il est bien connu que les anti-inflammatoires non stéroïdien exercent leur activité anti-inflammatoire en inhibant l'activité de la cyclooxygénase (Miura et *al.*,1991 ; El-Banhawy et *al.*, 1993; Mc Cafferty et *al.*, 1995 ; Waterbury et *al.*, 2006). L'activité anti-inflammatoire des extraits pourrait être associée à la présence des composés phytochimiques et principalement les polyphénols. En effet, plusieurs études ont repportés que les espèces végétales riches en polyphénols, en particulier les flavonoïdes, possédaient d'importantes activités pharmacologiques, telles que des actions antioxydantes, anti-inflammatoires, relaxants musculaires et antinociceptives (Meotti et *al.*, 2006 ; Fernandez et *al.*, 2009).De plus, plusieurs études sur les flavonoïdes telle que la rutine, la quercétine, l'acide P-coumarique, l'acide sinapique, le 2-hydroxycinnamique et la catéchine ont montré d'importantes activités antinociceptives et anti-inflammatoires (Nagasaka et *al.*,2007 ; Nakanishi et *al.*, 2010 ; Ramesh et *al.*, 1998 ; Bittar et *al.*, 2009 ; Farahpour, 2014). Par ailleurs, la technique HPLC a montré la présence des quantités élevées de ces composants phénoliques, en particulier dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Caralluma europaea*.

De nombreux travaux indiquent que les antioxydants sont capables de réduire la douleur et l'inflammation produites par excitation chimique et thermique (Hacimuftuoglu et *al.*, 2006). Dans des conditions normales, il y a un équilibre du système antioxydant-antioxydant libre. Cependant, la diminution du profil antioxydant-antioxydant libre induit des dommages cellulaires et tissulaires appelés dommages oxydatifs (Karaca et *al.*, 2006). Dans cette étude, le rôle protecteur de EAE et EE de *Caralluma europaea* contre le stress oxydatif a été évalué par la méthode de piégeage des radicaux libres de la DPPH et par la méthode du pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur est une propriété importante des substances dites antioxydantes et peut servir d'indicateur important de l'activité antioxydante potentielle de nouveaux médicaments antioxydants (Jayaprakasha et *al.*, 2001). Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant est lié aux capacités réductrices(Yen et Duh, 1993). Ainsi, dans cette étude, l'activité antioxydante des extraits de *Caralluma europaea* peut être associée à son pouvoir réducteur.

Alors que l'élimination du radical DPPH est liée à l'inhibition de la peroxydation des lipides (Rekka et Kourounakis, 1991). Le radical DPPH implique un processus de transfert d'atomes d'hydrogène (Kaviarasan et *al.*, 2007). Dans ce test, la bonne activité antioxydante sur le radical DPPH de l'EAE et de l'EE peut être attribuée à un rôle direct dans le piégeage des radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène.

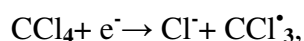
L'effet de l'administration des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité hépatoprotectrice chez le rat.

L'efficacité de toute substance (médicament, extrait de plante ou aliment) hépato-protectrice dépend essentiellement de sa capacité à réduire les effets nocifs ou à maintenir la fonction physiologique normale qui a été perturbée par des agents hépatotoxiques connus.

Dans notre travail on s'est basé sur le model d'induction de l'hépatotoxicité par le CCl₄ (Ha et al., 2005) afin d'évaluer l'effet hépato-protecteur de nos extraits de *Caralluma europaea* chez le rat. Cette évaluation repose sur les résultats du bilan hépatique, la variation journalière du poids corporel des animaux et sur l'étude histologique comparative.

En effet, le CCl₄ est un composé hépatotoxique causant des lésions hépatiques graves. Il est métabolisé par l'action du cytochrome p450 présent dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et conduit à la production de métabolites instables et complexes du CCl₄ (Knockaert et al., 2012) qui peuvent provoquer une hépatotoxicité caractéristique d'une hépatite chimique.

La toxicité du tétrachlorure de carbone (CCl₄) s'exerce par l'intermédiaire des radicaux CCl₃[•]. La production du CCl₃[•] se fait à partir de la réduction de CCl₄ sous l'action du cytochrome P450 hépatique :



Par ailleurs le CCl₃[•] est capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés et une production importante des hydro-péroxydes lipidiques (Knecht et Mason, 1988).

La réactivité de ces radicaux libres altère l'équilibre de l'organisme, en altérant l'intégrité ou la perméabilité de la membrane cellulaire en raison de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et aussi perturbe l'homéostasie du Ca²⁺ qui conduit à une lésion hépatocellulaire (Pham-Huy et al., 2008). Cela provoque la diffusion des enzymes hépatiques (ALT et l'AST) dans la circulation sanguine (Hernandez-Muñoz et al., 1997). Par conséquent, l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ augmente le taux des enzymes hépatiques comme l'ALT et l'AST dans la circulation sanguine (Hann et al., 2012).

Les résultats obtenus dans notre travail après l'administration de CCl₄ (1 ml/kg) chaque 72h a provoqué une augmentation du taux d'ALAT soit 93,55±4,578 U/L qui représente presque le double du taux de cet enzyme chez le groupe témoin négatif qui est de l'ordre de 47,383 ± 1,949 U/L et une augmentation du taux d'ASAT soit 345,033±9,116 U/L qui représente

presque le triple du taux de cet enzyme chez le groupe témoin négatif qui est de l'ordre de $125,2 \pm 1,243$ U/L. Ces résultats confirment l'effet de l'induction de l'hépatotoxicité chez le rat. Cette élévation significative de l'activité des transaminases sériques explique une nécrose hépatocytaire sévère (Ganzina, 1983 ; Dobbs et al., 2003). Traduisant une augmentation de la lipoperoxydation et par conséquent des dommages tissulaires par la formation excessive des radicaux libres (Sanmugapriya et Venkataraman, 2006). Ce constat est susceptible d'expliquer la fuite des transaminases hépatiques et leur passage dans le sang. Ces symptômes ont été observés dans la plupart des travaux ayant le même objectif qui est l'évaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ (Guo et al., 2017, Fahad et al., 2017, Meejung et al., 2014).

En plus de la perturbation du bilan biologique hépatique s'ajoute la dégradation journalière du poids corporelle des rats ayant été traité seulement par la CCl₄. En effet l'hépatotoxicité devient significative lorsque s'accompagne de manifestations cliniques (asthénie, anorexie, nausée, douleur de l'hypochondre droit, urines foncées, encéphalopathie) (Mégarbane et al., 2007) ces manifestations ont été observés durant l'expérimentation.

L'administration par voie orale des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea* pendant ces 12 jours a entraîné un redressement significatif ($P < 0,001$) de taux sérique des transaminases par rapport au lot de rats intoxiqué. Les rats traités par l'extrait éthanolique on a $64,117 \pm 1,757$ U/L pour l'ALAT et $200,483 \pm 9,533$ U/L pour l'ASAT, et pour l'autre lot traité par l'extrait butanolique ce taux est de l'ordre de à $56,45 \pm 1,145$ U/L pour l'ALAT et de $175,783 \pm 3,291$ U/L pour l'ASAT qui se rapproche des valeurs obtenues chez le lot témoin négatif.

En effet L'administration des extraits de *Caralluma europaea* permis de prévenir de façon significative les lésions hépatocytaires induites par CCl₄. La réduction du niveau d'AST et d'ALAT est une indication de l'hépatoprotection et même d'autre travaux la qualifient de processus de régénération des cellules hépatiques (Zhang et al., 2014). A cet effet hépatoprotecteur s'associe le redressement de la variation du poids journalier des rats traités par la CCl₄ et par les extraits de notre plante.

L'effethépatoprotecteur observé ne peut être interprété que par la composition de ces extraits et leur activités antioxydantes. En effet Les résultats de notre analyse phytochimique suggèrent que Les extraits étudiés de *Caralluma europaea* sont riches en métabolite secondaires telle que les polyphénols totaux, en flavonoïdes et en quantité modérée en tanins condensés. Ces métabolites ont la capacité de neutraliser les radicaux issus de la réduction de

CCI4 et ainsi d'éviter des dommages tissulaires potentiels. En effet, de nombreux extraits de plantes riches en flavonoïdes ont montré des effets hépato-protecteurs et antioxydants contre des lésions hépatiques induites par l'hépatotoxine (Yabe et al., 2001).

L'effet de l'administration des extraits de *Caralluma europaea* sur l'activité antilithiasique chez le rat.

La néphrolithiase ou formation de calculs rénaux est le troisième problème le plus fréquent des voies urinaires dans le monde (Munjal, 2012). Les calculs rénaux sont des agrégats minéraux dans les calices rénaux que l'on trouve libres ou attachés aux papilles rénales (Khan, 2010). Les calculs rénaux contiennent des composants cristallins et organiques et se forment lorsque l'urine devient sursaturée en minéraux, entraînant la formation de cristaux (Finlayson, 1978). Environ 80% des calculs sont composés d'oxalate de calcium (CaOx) mélangé à du phosphate de calcium (CaP) appelé plaques de Randall, présents sur la surface papillaire rénale (Evan, 2010). L'analyse des données épidémiologiques de sept pays a révélé des taux de prévalence des calculs rénaux de 1,7 à 14,8% et, dans presque tous les pays, ces taux semblent être en augmentation (Romero et al., 2010). Les causes principales de cette maladie sont multifactorielles (Ahmed et al., 2013).

Le traitement des calculs rénaux se fait généralement par l'administration de médicaments symptomatiques (diurétiques, anti-inflammatoires), une néphrolithotomie percutanée et une lithotripsie (Moe, 2009 ; Semins, 2010). Cependant, ces procédures sont associées à des complications graves telles qu'une hémorragie, une hypertension artérielle, une nécrose tubulaire suivie d'une fibrose rénale ultérieure entraînant une lésion cellulaire (Terlecki et Triest, 2007). De plus, ils sont très coûteux et il n'existe aucun médicament prometteur pour le traitement et la prévention des récurrences (Butterweck et Khan, 2009).

Afin d'évaluer les effets de divers agents thérapeutiques sur le développement et la progression de cette maladie lithiasique, plusieurs modèles *in vivo* ont été développés (Atmani et al., 2004 ; Boevé et al., 1993, Fan et al., 1999, Khan., 1991, Khan et Glenton., 1995). Le rat est l'animal le plus utilisé dans les modèles du dépôt des cristaux d'oxalate de calcium dans les reins, un processus imitant la formation des calculs rénaux chez l'Homme (Atmani et al., 2004). Ces modèles *in vivo* ont utilisé soit l'éthylène glycol seul, soit combiné avec d'autres produits, comme le chlorure d'ammonium, la vitamine D3, la gentamycine, ou une diète pauvre en magnésium. Le chlorure d'ammonium étant le plus utilisé (Fan et al., 1999). Nous avons choisi le modèle accéléré (Khan et Glenton., 1995), d'une part pour sa simplicité et par la reproductibilité des résultats obtenus et d'autre part car il provoque une cristallisation dans

les reins (Gokhale et *al.*,1996 ; Grases et *al.*, 1998). Dans la présente expérience, des rats Wistar mâles ont été choisis pour induire une lithiase urinaire avec 1% d'éthylène glycol (poids / volume) avec 1% de chlorure d'ammonium (poids / volume). Le système urinaire des rats mâles ressemble à celui de l'homme et des études antérieures ont montré que la formation de calculs chez les rats femelles était considérablement moins importante que chez les rats mâles (Magnusson et *al.*, 1971).

Afin d'évaluer le pouvoir thérapeutique de trois extraits (éthanolique, hexanique et butanolique) de *C. europaea* sur la formation des cristaux CaOx au niveau des reins des rats, nous avons étudié le poids corporel, les concentrations sériques en urée, et en créatinine en plus de l'analyse des coupes histologiques des reins droits. Initialement, nos résultats ont montré que les rats du témoin négatif ont gagné du poids, alors que les rats traités par l'éthylène glycol perdaient du poids au cours des 10 jours du traitement. Cette diminution de poids serait probablement en relation avec une anorexie provoquée par l'ingestion de ce produit chimique comme il a été rapporté par Sokar en 2003. Par ailleurs, L'examen microscopique avec lumière polarisée des coupes histologiques rénales des rats néphrolithiasiques a montré des dépôts cristallins intra tubulaires et interstitiels, en concordance avec les résultats d'autres auteurs (Grases et *al.*, 1998). Ces cristaux étaient biréfringents, polycristallins, et sont disposés sous forme d'une rosette caractéristique de cristaux CaOx. Ces dépôts cristallins ont été observés dans les reins de tous les rats du groupe témoin positif. En revanche, aucun des rats traités avec l'extrait butanolique (200mg/kg, po) n'a montré ces dépôts cristallins. Ces résultats démontrent clairement la capacité du *C. europaea* de prévenir le développement des calcifications, prévenant par conséquent le développement des calculs rénaux.

Le taux de filtration glomérulaire chez les rats lithiasiques diminue en raison de l'obstruction de l'écoulement urinaire à cause de la formation des calculs dans le système urinaire. Par conséquent, les déchets, en particulier les substances azotées telles que l'urée, la créatinine et l'acide urique, s'accumulent dans le sang (Thangarathinam *etal.*, 2013). En accord avec des études antérieures (Khadgi *etal.*, 2017), les taux de l'urée et de la créatinine dans le sérum étaient significativement ($p < 0,001$) plus élevés dans le groupe lithiasique par rapport au témoin. Ce qui indique une atteinte rénale. En plus, l'analyse histopathologique du tissu rénal, corrobore les résultats de l'étude biochimiques. En effet nous avons observé au niveau histologique des altérations histologiques importantes, notamment des lésions sévères des glomérules, une dilatation tubulaire et une inflammation interstitielle (infiltration de cellules

mononuclées) chez les animaux lithiasiques. Des atteintes histopathologiques comparables ont été notées par Patel et *al.*,(2012).

Plusieurs études ont montré que certains extraits de plantes peuvent avoir une activité antilithiasique (Farooq et *al.*, 2005 et Grases et *al.*, 2009). Dans la présente étude, le traitement avec des extraits de *C. europaea* a permis d'inverser de manière significative les modifications induites par l'administration de l'éthylène glycol.

L'inhibition, très marquée de la cristallisation, observée chez les rats traités par les trois extraits et principalement l'extrait butanolique (200mg/kg, po) de *C. europaea*, pourrait s'expliquer par la présence, dans cette plante, de composés dotés d'activité anti-oxydante et/ou anti-inflammatoire.

L'inhibition, très marquée de la cristallisation, observée chez les rats traités par l'extrait butanolique (200mg/kg, po) de *C. europaea*, pourrait s'expliquer par la présence, dans cette plante, de quelques composés doués de propriétés préventives des calcifications. Le dosage des principaux composés des trois extraits a révélé la présence des flavonoides, des saponines et surtout des polyphénols, principalement au niveau de l'extrait butanolique. La propriété antilithiasique de cette plante serait le résultat de l'action unique ou combinée de l'un ou de plusieurs familles de ces composés.

Cependant, plusieurs études (Sivagnanam et Menon, 2005, Huang et *al.*, 2000) ont associé les dommages per oxydatifs des tubules rénaux, induits par l'hyperoxalurie suite à l'ingestion de l'éthylène glycol, au déséquilibre d'antioxydants- oxydants et qui a comme conséquence l'attachement des cristaux, suivant leur agrégation et par la suite la croissance des calculs rénaux d'oxalate de calcium. Ainsi, l'effet protecteur des extraits de *C. europaea* sur la fonction rénale peut être dû aussi aux propriétés antioxydantes des extraits de *C. europaea*. En fait, les extraits éthanolique, hexanique et butanolique de notre plante, se sont avérés avoir une activité antioxydante marquée révélée par le test DPPH. De plus, nos extraits contiennent une grande quantité de composés phénoliques connus pour posséder des actions pharmacologiques importantes, telles que des actions antioxydantes (Meotti et *al.*, 2016). En effet, des améliorations biochimiques et histopathologiques comparables chez les animaux lithiasiques ont été observées après traitement avec d'autres extraits de plantes ayant des capacités anti-oxydantes importantes (Patel et *al.*, 2012; Khadgi et *al.*, 2017). En plus l'analyse de la composition chimique des différents extraits par HPLC a permis d'identifier la présence de certains composés phénoliques connus pour leur pouvoir antioxydant. Parmi ces principes actifs, la quercetine et la catechine ont été retrouvés à des concentrations élevées

dans les trois extraits étudiés. Dans une étude antérieure, sur les effets protecteurs de plusieurs composés antioxydants, contre le stress oxydatif associé à l'insuffisance rénale, il a été constaté que le prétraitement par la catéchine renforçait le système de défense antioxydant et permet de réduire significativement les dommages oxydatifs (Amengual-cladera *et al.*, 2011). Une étude récente a démontré que la quercétine bloque de manière significative l'élargissement du kyste rénal *in vitro* et *in vivo* (Zhu *et al.*, 2018). De plus (Sahreem *et al.*, 2010) ont observé une corrélation positive entre la teneur en composés phénoliques d'un extrait de plante et ses propriétés antioxydantes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les études sur les plantes médicinales se sont accentuées ces dernières années annonçant le retour à l'usage de ces dernières comme base de recherche de traitements thérapeutiques. En effet, la découverte de principes actifs d'origine biologique, efficace, protecteur, biodégradable, et sans effet néfaste sur l'organisme fait d'elle un créneau important et prometteur dans la recherche médicamenteuse.

Ainsi, l'objectif de notre étude a été de mettre en évidence des propriétés prétendantes en thérapie traditionnelle de *Caralluma europaea* et de lui attribuer un caractère scientifique pouvant atteindre un usage rationnel en médecine moderne en prospective. Dans ce sens, nous avons procédé en préambule au présent travail, à identifier au préalable le matériel végétal étudié. En conséquence, l'identification botanique précise des espèces étudiées s'avère essentielle voire indispensable car une identification basée seulement sur le nom vernaculaire, peut conduire à des informations fausses sur le matériel végétal testé. Après l'identification botanique de notre plante, nous avons procédé à une autre étape aussi importante que la première ; l'analyse phytochimique de *Caralluma europaea*. Il est en effet, nécessaire de caractériser l'extrait qui sera utilisé pour l'expérimentation. Les travaux de chimie étant indispensables lors des premières phases d'évaluation de l'activité pharmacologique. Cette étude phytochimique comprend une phase d'extraction par macération, dosage des polyphénols, l'analyse des extraits par HPLC et aussi l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de chaque extrait de *Caralluma europaea*. Les résultats de cette caractérisation préliminaire des extraits de *Caralluma europaea* ont révélé la richesse de nos extraits en polyphénol totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés. En addition, l'analyse par HPLC a permis l'identification de plusieurs métabolites secondaires réputés avoir des activités pharmacologiques importantes comme la quercétine, l'acide ferrulique, la sophorine et d'autres, connues pour leur activités antioxydante, anti-inflammatoire, cytoprotectrice, vasoprotectrice et antinociceptives. Les tests de l'activité antioxydantes montrent que les extraits de *C. europaea* et principalement l'extrait butanolique, possède une activité antioxydante très importante. La présence de ces métabolites en grande quantité, ainsi que le pouvoir antioxydant marqué de nos extraits nous donnent une idée sur le potentiel de notre plante pouvant lui conférer des pouvoirs thérapeutiques importants.

Cependant, avant d'entamer les études pharmacologiques sur les extraits de notre plante, une étude de toxicité s'avère primordiale. Il s'agit de déterminer la toxicité de l'extrait ainsi que la marge thérapeutique c'est-à-dire le rapport entre la dose active et la dose toxique. C'est une étape indispensable à l'utilisation de toute substance destinée à des finstherapeutiques. Nos

résultats ont montré que tous les extraits testés sont dépourvus de tout effet toxique chez l'animal à la dose maximale de 5 g/kg, pour les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle et 2g/kg pour les extraits hexanique et butanolique.

Après avoir écarté l'handicape de la toxicité aigüe, nous avons procédé à l'études des activités pharmacologiques et comportementales et plus spécifiquement : les activités analgésique, anti-inflammatoire, hépato protectrice et antilithiasique et l'effet sur la dépression et l'anxiété.

Nos résultats prouvent, par des tests pharmacologiques spécifiques à l'étude de la douleur que les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle présentent un effet analgésique important. En effet, le prétraitement des souris par l'EE et l'EAE a produit un effet analgésique significatif lié à la dose dans les tests de contorsion, de la plaque chauffante et le test de formol, induit par l'acide acétique, cet effet est particulièrement élevé lorsque l'EAE a été administré à la dose de 200mg/kg. En outre, les résultats de cette présente étude nous ont permis de démontrer que, le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à l'action antinociceptive de l'extrait de *C. europaea* dans les tests de la plaque chauffante et du formol semble(nt) n'avoir aucun rapport avec le système opioïde, puisque leurs effets antalgiques persistent même après l'utilisation de la naloxone.

D'un autre côté, nos résultats ont montré que les extraits de *C. europaea* présentent une activité anti-inflammatoire importante. En effet, les résultats du test de l'inflammation aiguë induite par le xylène ont montré que les deux extraits EE et EAE présentent un effet anti-inflammatoire similaire à celui du Diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien).

L'investigation des propriétés hépato protectrices des extraits de *C. europaea* par l'utilisation de la CCL4 (molécule hépatotoxique) a montré que l'administration par voie orale des extraits éthanolique et butanolique de *Caralluma europaea* a entraîné un redressement significatif ($P < 0,001$) de taux sérique des transaminases, ainsi que la prévention de façon significative des lésions hépatocytaires par rapport au lot de rats intoxiqués par le CCL4.

Un autre objectif de ce travail était de chercher une éventuelle activité antilithiasique des extraits éthanolique, hexanique et butanolique de *C. europaea*. Pour cela, nous avons étudié l'effet de ces extraits sur le dépôt des cristaux d'oxalate de calcium (CaOx) dans les reins des rats. Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré clairement la capacité du *C. europaea* de prévenir le développement des calcifications et principalement l'extrait butanolique à 200 mg/kg, prévenant par conséquent le développement des calculs rénaux. Ce résultat est en corrélation avec l'inhibition très marquée de la cristallisation observée directement par microscope optique sous lumière polarisée sur les coupes histologiques des reins. L'effet

inhibiteur de l'extrait total de *C. europaea* pourrait être expliqué par une action des antioxydants et/ou anti-inflammatoire de *C. europaea*.

Enfin, il était question de savoir si l'administration de l'extrait total (extrait éthanolique) de *C. europaea* avait des incidences sur le comportement général de l'animal. Pour cela, nous avons testé l'effet de cet extrait dans trois modèles comportementaux spécifiques : deux considérés contraignant pour l'animal 'test de la chambre claire/obscurité et le test labyrinthe en croix surélevé. Le troisième non contraignant test de l'exploration libre ou champs ouvert. L'analyse des résultats de ces trois tests révèle que le l'extrait total induit à la fois un effet anxiogène ou sédatif et dépressif. Les résultats de ces tests soulignent l'importance d'une utilisation rationnelle des plantes médicinales en général dans les traitements traditionnels. Ainsi malgré que *C. europaea* possède des activités biologiques importantes, son utilisation d'une façon excessive peut entraîner des effets secondaires, entre autres la dépression et l'anxiété.

Pour conclure, notre travail est considéré comme une première contribution à la valorisation de *Caralluma europaea*, il s'est avéré que notre plante a des capacités thérapeutiques importantes dépassant de loin son usage traditionnel connu.

Le présent travail que nous avons effectué ne pourra être complet que par la contribution d'autres études pouvant renforcer d'avantage nos données recueillies jusqu'à présent. Ainsi, il serait encore souhaitable de :

- L'ensemble des données neurocomportementales, recueillies quant à l'effet de l'extrait de *C. europaea*, nous poussent à chercher profondément les bases neurologiques de tels troubles et par conséquent, quantifier le degré de fonctionnement neuronal par évaluation neurochimique des taux de certains neurotransmetteurs impliqués tels que la dopamine, la sérotonine et le GABA ainsi que leurs métabolites.
- Purifier les principes actifs qui composent chacun des extraits de *C. europaea* afin de déterminer les effets pharmacologiques propres à chaque molécule à l'instar des études que nous avons effectuées sur les activités anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, antilithiasiques et antalgiques.
- Chercher les mécanismes d'action mis en jeu pour les activités pharmacologiques anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, antilithiasique et antalgique.

Références bibliographiques

- Abbott, F.V. and R. Melzack. 1982. Brainstem lesions dissociate neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. *Brain Research*. 251(1):149-155. DOI:10.1016/0006-8993(82)91282
- Aboufatima R., (1999). Effets de la calcitonine injectée dans la substance grise periacquédurale et dans le ventricule latéral, sur les comportements de conditionnements et d'exploration, sur sommeil et sur la sensibilité nociceptive. Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences Semlalia Marrakech
- Aboufatima R., Chait A., Dalal A., Zyad A., De Beaurepaire R., (2002). Antinociceptive effects of single and repeated intracerebroventricularly and intraperitoneally injections of CT evaluated by tail flick test in rats and writhing test in mice. *Reviews in biology and biotechnology*, 2:38-43.
- Adnan, Muhammad, Saleem Jan, Sakina Mussarat, Akash Tariq, Shaheen Begum, Anila Afroz, et Zabta Khan Shinwari. 2014. A Review on Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology of Plant Genus *Caralluma* R. Br: Medicinal Properties of Genus *Caralluma*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66 (10): 1351-68. <https://doi.org/10.1111/jphp.12265>.
- Ahmed A., Wadud A., Jahan N., Bilal A., Hajera S. 2013. Efficacy of *Adiantum capillus veneris* Linn in chemically induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*.146(1):411–416. doi: 10.1016/j.jep.2013.01.011.
- Ahmed, A., N. Ilyas, H. Ibrahim, K.Y. Musa and A.H. Yaro. 2007. Analgesic effects of *Tacazzea apiculata oliv*. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2:134–138.
- Ait Dra Loubna, Souad Sellami, Hanane Rais, Faissal Aziz, Abdallah Aghraz, Khalid Bekkouche, Mohamed Markouk, et Mustapha Larhsini. 2017. Antidiabetic Potential of *Caralluma europaea* against Alloxan-Induced Diabetes in Mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (6): 1171-78. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.028>.
- Ait Dra Loubna. 2019. Etude phytochimique et pharmacologique de deux Asclépiadaceae marocaines : *Caralluma europaea* et *Periploca laevigata*. Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences Semlalia Marrakech
- Albers F, Meve U. eds. 2002. Illustrated handbook of succulent plants. *Asclepiadaceae*. Heidelberg: Springer.
- Al-Harrasi, A., L. Ali, J. Hussain, N.U. Rehman, Mehjabeen, M. Ahmed and A. Al-Rawahi. 2014. Analgesic effects of crude extracts and fractions of Omani frankincense obtained from traditional medicinal plant *Boswellia sacra* on animal models. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(1):S485-S490 DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60279-0
- Al-Majed, A.A., M. Khattab, M. Raza, O.A. Al-Shabanah, and A.M. Mostafa. 2003. Potentiation of diclofenac-induced anti-inflammatory response by aminoguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in rats: the role of nitric oxide. *Res*. 52(9):378-82. DOI: 10.1007/s00011-003-1189-1
- Al-Massarani, Shaza M., Samuel Bertrand, Andreas Nievergelt, Azza M. El-Shafae, Tawfeq A. Al-Howiriny, Nawal M. Al-Musayeib, Muriel Cuendet, et Jean-Luc Wolfender. 2012.

- Acylated Pregnane Glycosides from *Caralluma Sinaica*. *Phytochemistry* 79 (juillet): 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.003>.
- Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S., (2004). Afferent pathways: a neuroanatomical review. *Brain research*, 1000:40-56.
- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed.). Washington, DC: Author.
- American Psychiatric Association (APA, 2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Health Disorders* 5th ed. (DSM-5).
- Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M., Nemeroff C.B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *Journal of Endocrinology*, 161, 1-12.
- Arslan, R. and N. Bektas. 2010. Antinociceptive effect of methanol extract of *Capparis ovata* in mice. *Pharm Biol.*48(10):1185-90. DOI: 10.3109/13880201003629323
- Aruoma, O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant food. *Mutation Research. Fundamental Molecular Mechanisms Mutagenesis*. 9, 523-524.
- Asberg M., Thoren P., Traskaman L. Bertilsson L. Ringberg V., (1976). "Serotonin depression" -A biochemical subgroup within the affective disorders. *Science.*, 191:478-480.
- Atmani F., Slimani Y., Mimouni M., Aziz M., Hacht B et Ziyat A., (2004). Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *Journal of ethnopharmacology.*, 95(1): 87-93.
- Atmani F., Slimani Y., Mimouni M., Hacht B., (2003). Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsuta* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU International*, 92:137-140.
- Audissou, J. (2005). Moroccan Stapeliads. *Asklepios*, 94, 18-27.
- Austin M.P., Mitchell P., Goodwin G.M., (2001). Cognitive deficits in depression :Possible implications for functional neuropathology. *The British Journal of Psychiatry*, 78: 200-206.
- Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., 1989. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J.Biol. Chem.* , 2 : 15850-15855.
- Ayub SM, Garg S K, Garg K M. Sub-acute toxicity studies on pendimethalin in rats. *Indian J Pharmacol* 1997;29:322-324
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., Canbay, A. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of hepatology*. 56(4), 952-64
- Besson J.M., (1997). The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs*, 2:1-9.
- Bittar, M., M.M. De Souza, R.A. Yunes, R. Lento, F. Delle Monache and V. Cechinel Filho. 2009. Antinociceptive activity of I3, II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of

- the Guttiferae. *Planta Medica*. 66:84–86. DOI: 10.1055/s-0029-1243118
- Boevé E.R., Ketelaars G.A.M., Vermeij M., Cao LC., Schroder F.H. et De Bruijn W.C., (1993). An ultrastructural study of experimentally induced microliths in rat proximal and distal tubules, *J Urol.*, 149(4): 893-899.
- Borg J.M., Reeber A., 2008. *Biochimie métabolique*, Ellipses, France, pp: 257-269.
- Brambilla F., Smeraldi E., Sachetti E., Negri F., Cochi D., Muller E.F., (1978). Deranged anterior pituitary responsiveness to hypothalamic hormones in depressed patients. *Arch. Gen. Psychiat.*, 35: 1231-1238.
- Brasseur L., (1997). *Traitement de la douleur*, Collection Conduites. Editions Doin, Cedex, p. 9-10.
- Broadhurst, R.B., Jones, W.T., 1978. Analysis of condensed tannins using acified vanillin. *Science of Food Agriculture*. 29, 788-794.
- Brooks J., Tracy I., (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J. Anat.*, 207:19-33.
- Browning, J.D., Horton, J.D. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of clinical investigations*. 114(2), 147-52.
- Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. La Voisier TEC et DOC, Paris. 5ème édition. p.250-270
- Brunner L.S., Smeltzer S.C., Bare B., Suddarth D.S., (2006). *Soins infirmiers en médecine et en chirurgie: 4. Fonctions rénale et reproductrice* Volume 4 de *Soins infirmiers en médecine et en chirurgie*. Lillian S Brunner. Ed 2, De Boeck Université, p. 5-6 ; 108.
- Bruyns P.V. 2005. *Stapeliads of Southern Africa and Madagascar Vol II*. <https://epdf.pub/queue/stapeliads-of-southern-africa-and-madagascar-vol-2.html>.
- Bruyns, Peter V., Amina al Farsi, et Terry Hedderson. 2010. Phylogenetic Relationships of *Caralluma R. Br.* (Apocynaceae). *TAXON* 59 (4): 1031-43. <https://doi.org/10.1002/tax.594004>.
- Buchweitz J.P., Ganey P.E., Bursian S.J., Roth R.A., (2002). Underlying endotoxemia augments toxic responses to chlorpromazine: is there a relationship to drug idiosyncrasy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:460–467.
- Burits, M., Asres, K., Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*. 15,103-108.
- Butterweck, V., & Khan, S. R. (2009). Herbal medicines in the management of urolithiasis: alternative or complementary?. *Planta medica*, 75(10), 1095-1103.
- Calixto, J.B., A. Beirith, J. Ferreira, A.R. Santos, V.C. Filho and R.A. Yunes. 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plant. *Phytotherapy Research*. 14:401–418. DOI: 10.1002/1099-1573(200009)14:6<401::AID-PTR762>3.0.CO;2-h
- Carasco G.A., Van de Kar L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European*

- Journal of Pharmacology, 463:235-272.
- Carroll B.J., (1975). Neuroendocrine function in psychiatric disorders. In Psychopharmacology: A generation of Progress, Lipton M.A., Di Mascio A. and Killam K.F. edit. Raven Press, New-York, 487-497.
- Catalano, L., Franco, I., De Nobili, M., Leita, L., 1999. Polyphenols in olive mill wastewaters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*, 43, 193-205.
- Chait A. (1996). Effets comportementaux de la calcitonine et du ketoprofène implication possible de la calcitonine dans la dépression?. Thèse de Doctorat d'état. Université Cadi Ayyad Marrakech. p. 50.
- Channouf A., Rouan G., (2004) : Emotions et cognitions, 1er édition, Bruxelles, Boeck Université, 102 p. ISBN 2-8041-3990-5
- Charles A.C., Hales T.G., (2004). From inhibition to excitation: functional effects of interaction between opioid receptors. *Life Sciences*, 76:479-85.
- Chen, J.; Lin, D.; Zhang, C.; Li, G.; Zhang, N.; Ruan, L.; Yan, Q.; Li, J.; Yu, X.; Xie, X.; et al. Antidepressant-like effects of ferulic acid: Involvement of serotonergic and norepinephrine systems. *Metab. Brain Dis.* 2015, 30, 129–136.
- Ciacio, O., Castaing, D. 2015. Anatomie du Foie et des Voies biliaires. Centre hépatobiliaire Hôpital Paul Brousse Villejuif. <http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html>
- Civan, J.M. 2018. Trouble hépatique et biliaires, fibrose et cirrhose, fibrose hépatique. MSD manuals.
- Clement Y., Chapouthier G. (1998). Biological bases of anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 22, 623-633.
- Collège Enseignants Neurologie, (2005). Neurologie, Abrégés. Connaissances et pratique. Elsevier Masson, Paris, p. 304.
- Cox B.M., (1982). Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology. *Life Sciences*, 31:1645-1658.
- Cristiani Bürger, Doris Raquel Fischer, Dórys Angela Cordenunzi, Anna Paula de Borba Batschauer, Valdir Cechinel Filho, Adair Roberto dos Santos Soares. 2005. Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspsCanada.org) 8(2):370-373.
- Cubero F.J., Zoubek M.E., Hu W., Peng J., Zhao G., Nevzorova Y.A, Masaoudi M. Al., Bechmann L.P., Boekschoten M.V, Muller M., Preisinger C., Gassler N., Canbay A.E., Luedde T., Davis R.J., Liedtke C., Trautwein C., (2016). Combined activities of JNK1 and JNK2 in hepatocytes protect against toxic liver injury, *Gastroenterology* 150:968–981, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.019>.

- Dallel R., Villanueva L., Woda A., Voisin, D., (2003). Neurobiology of trigeminal pain. *Med. Sci.*, 19:567-574.
- Daniel A. Valério, Sandra R. Georgetti, Danilo A. Magro, Rubia Casagrande, Thiago M. Cunha, Fabiana T. M. C. Vicentini, Silvio M. Vieira, Maria J. V. Fonseca, Sergio H. Ferreira, Fernando Q. Cunha, and Waldiceu A. Verri, Jr. 2009. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975–1979
- Danziger N., Weil-Fugazza J., Le Bars D., Bouhassira D., (1999). Alteration of descending modulation of nociception during the course of monoarthritis in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 19:2394-2400.
- de Miranda G.F.B., Vilar J. C., Nunes Alves I.A., Cavalcanti S.C.H., Antonioli A.R., (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuiaavellendae* lor.Ex griseb.inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*, 1, 6.
- DePuerta, D.L., R.E. Martinez, L. Bravo and M.C. Ahumada. 1996. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 48:968-70. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1996.tb06014.x
- Dickes R., Schenker V., Deutsch L., (1957). Serial liver-function and blood studies in patients receiving chlorpromazine, *N. Engl. J. Med.* 256 1–7, <https://doi.org/10.1056/NEJM195701032560101>.
- Dobbs, N.A., Twelves, C.J., Gregory, W., Cruikshanka, C., Richards, M.A., Rubens, R.D., 2003. Epirubicin in patients with liver dysfunction: development and evaluation of a novel dose modification scheme. *European Journal of Cancer* 39, 580-586.
- Dorshkind K., Horseman N.D. (2001). Anterior pituitary hormones, stress and immune system homeostasis. *BioEssays*, 23:288-294.
- Dossing M., Sonne J. (1993). Drug-induced hepatic disorders. Incidence, management, and avoidance. *Drug Saf*;9:441-9.]
- Dutt, Harish Chander, Surjeet Singh, Bharathi Avula, Ikhlas A. Khan, et Yashbir S. Bedi. 2011. Pharmacological Review of *Caralluma R.Br.* with Special Reference to Appetite Suppression and Anti-Obesity . *Journal of Medicinal Food* 15 (2): 108-19. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1555>.
- El-Abbassi, A., Kiai H., Hafidi, A., 2012. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*. 132, 406-412.
- El-Banhawy, M.A., S.M. Sanad, S.A. Sakr, I.A. El-Elaimy and H.A. Mahran. 1993. Histopathological studies on the effect of the anticoagulant rodenticide “Brodifacoum” on the liver of rat. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.*12: 185-227.
- Emilia Amengual-Cladera, Antònia Nadal-Casellas, Yolanda Gómez-Pérez, Isabel Gomila, Rafael M Prieto, Ana María Proenza, Isabel Lladó. 2011. Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation. *Experimental Biology and Medicine*: 236 : 10: 1133-1138.

<https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011090>

- Endress, Mary E., Sigrid Liede-Schumann, et Ulrich Meve. 2014. An Updated Classification for Apocynaceae. *Phytotaxa* 159 (3): 175-94. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.159.3.2>.
- Evan, A.P. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. 2010. *Pediatr Nephrol* 25, 831–841. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1116-y>
- Fahad Hussain¹, Arif Malik¹, Ujala Ayyaz, Hassan Shafique, Zohaib Rana, Zahid Hussain. Efficient hepatoprotective activity of cranberry extract against CCl₄-induced hepatotoxicity in Wistar albino rat model: Down-regulation of liver enzymes and strong antioxidant activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2017; 10(11): 1054–1058.
- Fan J., Chandhoke P.S., (1999). Examination of crystalluria in freshly voided urines of recurrent calcium stone formers and normal individuals using a new filter technique. *JUrol.*, 161(5):1685-1688.
- Farahpour, M.R. 2014. Antioxidant activity, antinociceptive and anti-inflammatory effects of pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals. *International Journal of Pharmacological Technical Research*. 6 (5):1640–1646.
- Farouk, L., A. Laroubi, A. Aboufatima, A. Benharref and A. Chait. 2008. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology*.12;115(3):449-54. DOI:10.1016/j.jep.2007.10.014
- Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique* novembre, pp: 108-115.
- Féline A., Hardy P., de Bonis M., (1991). *La Dépression: études*. Elsevier Masson, Paris, p.5.
- Fernandez, S.P., M. Nguyen, T.T. Yow, C. Chu, G.A. Johnston, J.R. Hanrahan and M. Chebib. 2009. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochemical Research*.34(10):1867–1875. DOI: 10.1007/s11064-009-9969-9
- Ferreira, A., C. Proenc, M.L.M. Serralheiro and M.E.M. Ara'ujo. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*.108(1):31–37. DOI:10.1016/j.jep.2006.04.010
- Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Investigative Urology*. 1978 May;15(6):442-448.
- Formisano, Carmen, Felice Senatore, Giovanna Della Porta, Mariarosa Scognamiglio, Maurizio Bruno, Antonella Maggio, Sergio Rosselli, Pietro Zito, et Maurizio Sajeve. 2009. Headspace Volatile Composition of the Flowers of *Caralluma europaea* N.E.Br. (Apocynaceae). *Molecules* (Basel, Switzerland) 14 (11): 4597-4613. <https://doi.org/10.3390/molecules14114597>.
- Fossati P., Allilaire J.F., (2001). *Processus mnésiques et troubles des fonctions exécutives dans la dépression*. Thèse doctorat. Université de Paris, France. 2001.

- Fuller R.W., (1990). Therapy of osteoporosis in Japan. In: Christiansen, C. Overgaard, K. Eds. Osteoporosis. Copenhagen: Osteopress., 2107-2112.
- Fundytus M.E., (2001). Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS drugs*, 15: 29-58.
- Ganzina, F., 1983. 4-Epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treat Rev* 10: 1-22.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, novembre-décembre: 91-96.
- Garver DL., Pandey GN., Dekirmenjian H., De Leon-Jones F., (1975). Growth hormone and catecholamines in affective disease. *Am. J. Psychiat.*, 132:1149-1154.
- Gayet, C. 2013. Diététicienne-phytothérapeute. Guide de poche de phytothérapie. Quotidien malin, édition leduc.
- Gokhale J. A., Mckee M. D., Khan S. R., (1996). Immunocytochemical localization of Tamm-Horsfall protein in the kidneys of normal and nephrolithic rats. *Urological research*, 24:201-209.
- Gold P.W., Extein I., Pickar D., Rebar R., Ross R., and Goodwin F.K., (1980). Suppression of plasma cortisol in depressed patients by acute intravenous methadone infusion. *Am. J. Psychiat.*, 137(7):862-863.
- Golinkoff M. et Sweeney J.A., (1989). Cognitive impairment in depression. *Journal of Affective Disorders*, 17:105-112.
- Gougoux A., (2005). Physiologie des reins et des liquides corporels. Multimondes, Quebec, p.72-73 .
- Gram L.F., Christensen P. (1986). Benzodiazepine suppression of cortisol secretion: a measure of anxiolytic activity. *Pharmacopsychiatry*, 1, 19-22.
- Grases F., Conte A., March J.G., Garcia-Ferragut L., (1998). Evolution of lithogenic urinary parameters with a low dose potassium citrate treatment. *Int Urol Nephrol.*, 30:1-8.
- Guirimand F., Le Bars D., (1996). Physiology of nociception. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 15:10481079
- GUO Qing, ZHANG Qian-Qian, CHEN Jia-Qing, ZHANG Wei, QIU Hong-Cong, ZHANG Zun-Jian, LIU Bu-Ming, XU Feng-Guo. Liver metabolomics study reveals protective function of *Phyllanthus urinaria* against CCl₄-induced liver injury [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(7): 525-533.
- Hacimuftuoglu, A., C.R. Handy, V.M. Goettl, C.G. Lin, S. Dane and R.L.J. Stephens. 2006. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behavioural Brain Research*. 173(2):211–216. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.06.030
- Hajji, Hadda, Ahmed Talbaoui, Fatima Ezzahrae Faris Elalaoui, Elhassane Abdennebi, Youssef Bakri, M'hamed Aneb, et Aicha Elaïssami. 2016. In Vitro Evaluation of

- Antibacterial Action of *Caralluma europaea* Extracts on *Rhodococcus Equi*, 10.
- Halbreich U., Grunhaus L., Ben David M., (1979). Twenty four hour rythme of prolactin in depressive patients. *Arch. Gen. Psychiat.*, 36(11):1183-1186.
- Haliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3 th ed. Oxford; Clarendone press; 22.
- Han, H.S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.H. 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental and molecular medicine*. e218, 48.
- Handa, S. S., Chawla, A. S., & Sharma, A. K. (1992). Plants with antiinflammatory activity. *Fitoterapia*, 63(3), 192.
- Hann HW, Wan S, Myers RE, Hann RS, Xing J, Chen B, et al. 2012. Comprehensive analysis of common serum liver enzymes as prospective predictors of hepatocellular carcinoma in HBV patients. *PLoS One*; 7(10). e47687.
- Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, López V, López-Barrera F, Yáñez L, Vidrio S, et al. 1997. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl4-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology*; 26(5): 1100-1110.
- Herpfer I, Lieb K., (2003). Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J. Biol. Psychiatry*, 2:56-63.
- Hirszowski F., Boureau F., Diez F., (2001). *La douleur, le réseau et le médecin généraliste*. John Libbey Eurotext, Paris, p.8.
- Hossein zadeh, H. and H.M. Younesi. 2002. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Crocus sativus L. stigma* and petal extracts in mice. *B. M. C. Pharmacology*. 15: 2-7. <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/2/7>
- Hunskar, S. and K. Hole. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 30:103-114. DOI: 10.1016/0304-3959(87)90088-1
- Ibrar, M., N. Muhammad, Barkatullah., H. Khan, F. Jahan, N. Ashraf, 2012. Antinociceptive and anticonvulsant activities of essential oils of *Zanthoxylum armatum*. *Phytopharmacology*. 3(1):191-198.
- Inou T., Izumi T., Li X.B., Huang J.Z., Kitaichi Y., Nakagawa S., Koyama T., (2004). Biological basis of anxiety disorders and serotonergic anxiolytics. *Nihon Shinkei Yakurigaku Zasshi*, 24:125-31.
- Iny L.J., Pecknold J., Suranyi-cadotte B.E., Bernier B., Luthe L., Nair N.P. (1994). Studies of neurochemical link between depression, anxiety and stress from [3H] imipramine and [3H] paroxetine binding on human platelets. *Biological Psychiatry*, 5:281-91
- Jaeschke H., Xie Y., Mc Gill M.R. (2014) , Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans, *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2:153–161, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00014>.

- Janbaz, K.H., Saeed, S.A., Gilani, A.H., 2002. Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 73, 557–563.
- Javed, H., Khan, M.M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M.E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2012. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 17, 340–352.
- Jayaprakash, G.K., R.P. Singh and K.K. Sakariah. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in-vitro. *J. Agric. Food Chem.* 73(3):285-290. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00298-3
- Karaca, S., M. Kulac, E. Uz, H. Mollaoglu and R. Yılmaz. 2006. Erythrocyte oxidant/antioxidant status in essential hyperhidrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 290(1.2):131–135. DOI: 10.1007/s11010-006-9177-8
- Kaviarasan, S., G.H. Naik, R. Gangabhairathi, C.V. Anuradha and K.I. Priyadarsini. 2007. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry.* 103(1):31-37. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.05.064
- Kessler, R.C., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Chatterji, S., Lee, S., Ormel., Ustun, T.S. and Wang, P.S. (2009). The Global Burden of Mental Disorders: An Update from WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Epidemiol. Psychiatric Society* 18(1): 23-33.
- Khadgi, S., Shrestha, B., Ibrahim, H., Shrestha, S., ElSheemy, M. S., & Al-Kandari, A. M. (2017). Mini-percutaneous nephrolithotomy for stones in anomalous-kidneys: a prospective study. *Urolithiasis*, 45(4), 407-414.
- Khamis Al-Jadidi, Hoda Salim, et Mohammad Amzad Hossain. 2015. Studies on Total Phenolics, Total Flavonoids and Antimicrobial Activity from the Leaves Crude Extracts of Neem Traditionally Used for the Treatment of Cough and Nausea. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 4 (2): 93-98.
- Khan S.R., (1991). Pathogenesis of oxalate urolithiasis: Lessons from experimental studies with rats. *Am J Kid Dis.*, 17(4):398-401.
- Khan S.R., Glenton P. (1995). Deposition of Calcium phosphate and Calcium oxalate crystals in the kidneys. *Journal of urology.*, 153(3 pt 1): 811- 817.
- Khan, H., M. Saeed, A.U. Gilani, M.A. Khan, A. Dar and I. Khan. 2010. The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models. *Journal of Ethnopharmacology.* 127(2):521–527. DOI: 10.1016/j.jep.2009.10.003
- Khan, S.R. Nephrocalcinosis in animal models with and without stones. 2010. *Urol Res* 38, 429–438. <https://doi.org/10.1007/s00240-010-0303-4>
- Kiernan J A. 1999, *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, 3rd Edn (Oxford, UK: Butterworth Heinemann,).
- Kleftaras G., (2004). *La dépression: approche cognitive et comportementale*. Editions L'Harmattan, p.19-20
- Knecht K.T., Mason R.P., 1988. In vivo Radical trapping and biliary secretion of Radical

- adducts of carbon tetrachloride-derived free Radical metabolites. *Drug Metab.Dispos.* 813-817.
- Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, et al. 2012. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab Invest*; 92(3): 396-410.
- Koolman J., Rohm K.M., 1999. Atlas de poche de biochimie. Edition Medecine Science Flammarion, pp. 189-221.
- Kou, J., Y. Ni, N. Li, J. Wang, L. Liu and Z.H. Jiang. 2005. Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(1): 176-180. DOI: 10.1248/bpb.28.176.
- Kou, J.m., R.m. Ma, D.m. Zhu and Y. Yan. 2003. Blood-activating anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. *Zhong Yao Cai. Europ PMC.* 26(4):268-71. PMID:14528694.
- Koutseff A., (2011). Étude de l'interaction entre stress chronique dans les processus émotionnels et cognitifs. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 287p.
- Kuriyan, Rebecca, Tony Raj, S. K. Srinivas, Mario Vaz, R. Rajendran, et Anura V. Kurpad. 2007. Effect of *Caralluma Fimbriata* Extract on Appetite, Food Intake and Anthropometry in Adult Indian Men and Women. *Appetite* 48 (3): 338-44. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2006.09.013>.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., Martí'n Calero, M.J., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* 71 (1-2), 45-53.
- Larrey D., Ripault M.P., (2013). Hepatotoxicity of psychotropic drugs and drugs of abuse, in: N. Kaplowitz, L. DeLeve (Eds.), *Drug-Induced Liver Disease*, Academic Press, Waltham, pp. 443-462.
- Leach B.E., Forbes J.C., (1941). Sulfonamide drugs as protective agents against carbon tetrachloride poisoning, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 48 361-363.
- Lee, C.C.; Wang, C.C.; Huang, H.M.; Lin, C.L.; Leu, S.J.; Lee, Y.L. 2015. Ferulic acid induces Th1 responses by modulating the function of dendritic cells and ameliorates Th2-mediated allergic airway inflammation in mice. *Evid-Based Compl. Alt. Med.*
- Lemelin S., Baruch P., (1998). Clinical psychomotor retardation and attention in depression. *J. Psychiatr. Res.*, 32(2): 81-88.
- Lin, W.C.; Peng, Y.F.; Hou, C.W. 2015. Ferulic acid protects PC12 neurons against hypoxia by inhibiting the p-MAPKs and COX-2 pathways. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 18, 478-484.
- Luedde, T., Kaplowitz, N., Schwabe, RF. 2014. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology.* 147(4), 765-783.
- Magnusson, G., & Ramsay, C. H. (1971). Urolithiasis in the rat. *Laboratory animals*, 5(2), 153-162.
- Marieb, E.N. 2008. *Biologie humaine. Principes d'anatomie et de physiologie*. Huitième édition. Canada : Pearson Education, 631.

- Masrahi, Y. S., Al-turki, T. A et Sayed, O. H. (2012). Crassulacean Acid Metabolism Permutation and Survival of *Caralluma* Species (Apocynaceae) in Arid Habitats, 4(1), 63-71.
- Mates J.M.; Perez-Gomez C., Nunez de Castro I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32: 595-603.
- Mc Cafferty, D., D.N. Granger and J.L. Wallace. 1995. Indomethacin-induced gastric injury and leukocyte adherence in arthritic versus healthy rats. *Gastroenterol.* 109(3) : 1173-1180. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90576-6.
- McGill M.R., Williams C.D., Xie Y., Ramachandran A., Jaeschke H. (2012). Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264:387–394, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.015>.
- Meejung Ahna,, Jong Sang Parkb, Sungwook Chaec, Seungjoon Kimd, Changjong Moone,Jin Won Hyunf, Taekyun Shing. (2014). Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl4-induced hepatic damage in rats. *Acta Histochemica* 116 1104-1112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.05.004>
- Mello A.A., Mello M.F., Carpnter L.L., Price L.H. (2003). Update on stress and depression: The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Review of Brazilian Psychiatry.*, 25, 231-8.
- Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C., Kolisis, F.N., 2006. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochem.* 41, 2029–3204.
- Meotti, F.C., A.P. Luiz, M.G. Pizzolatti, C.A. Kassuya, J.B. Calixto and A.R. Santos. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 316:789–796. DOI: 10.1124/jpet.105.092825
- Merskey H., Bogduk N., (1994). Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. IASP press. Seattle. USA. p. 210.
- Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., (2004). Inflammation et douleur :thérapie génique expérimentale. *Médecine/Sciences*, 20:325-30.
- Meve, Ulrich, et Samia Heneidak. 2005. A Morphological, Karyological and Chemical Study of the *Apteranthes* (*Caralluma*) *europaea* Complex. *Botanical Journal of the Linnean Society* 149 (4): 419-32. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00448.x>.
- Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur.pp : 13-36.
- Miller SM, Piasecki CC, Lonstein JS (2011) Use of the light-dark box to compare the anxiety-related behavior of virgin and postpartum female rats. *Pharmacol Biochem Behav*

100:130–137

- Miura, S., M. Suematsu, S. Tanaka, H. Nagata, S. Houzawa, M. Suzuki, I. Kurose, H. Serizawa and M. Tsuchiya. 1991. Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* .261(2): G213-G219. DOI: 10.1152/ajpgi.1991.261.2.G213.
- Moe, O. W. (2009). PiT-2 coming out of the pits. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(4), F689-F690.
- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, P., & Martínez, E. (2000). *Agastache mexicana* may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine*, 7(3), 199-203.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 3-21.
- Munjal, Y.P., 2012. *API Textbook of Medicine Second Vol Ninth ed.*. The Association of Physicians of India, Mumbai, 1319.
- Nagasaka, R., C. Chotimarkorn, I.M. Shafiqul, M. Hori, H. Ozaki and H. Ushio. 2007. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 358:615–619. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.04.178
- Nakanishi, T., K. Mukai, H. Yumoto, K. Hirao, Y. Hosokawa and T. Matsuo. 2010. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *European Journal of Oral Sciences*. 118(2):145-50. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2010.00714.x
- Nassiri-Asl, M., Mortazavi, S.R., Samiee-Rad, F., Zangivand, A.A., Safdari, F., Saroukhani, S., Abbasi, E., 2010. The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. *Epilepsy Behav.* 18, 50–53.
- Navarro V.J., Senior JR. (2006). Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*;354:731-9.
- Netter F H. *Atlas of Human Anatomy 2011*. Version française de l'œuvre originale en langue anglaise 5ème édition, (ISBN : 978-1-4160-5951-6). Elsevier Saunders, 1600 John F. Kennedy Boulevard, Philadelphia, Pennsylvania, 19103, USA
- Nigel, C.W., Glories, Y., 1991. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42, 364-366
- Ohman A. (2001). *Anxiety: Encyclopaedia of stress*. 1, 226-231. George Fink, Academic press. USA.
- Ojewole, J.A. 2005. Antinociceptive, Anti-Inflammatory and Antidiabetic Effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) Leaf Aqueous Extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(1) :13-19. DOI: 10.1016/j.jep.2005.01.025
- Orhan, D.D., A. Hartevioglu, E. Kupeli and E. Yesilada. 2007. In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina L.* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*. 112:394-400. DOI: 10.1016/j.jep.2007.03.029.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine.

- Japanese Journal of Nutrition. 44, 307-315.
- Packialakshmi, N. Et Naziya, S. (2014). Screening of antibacterial and phytochemical analysis of *Caralluma fimbriata*. *The Pharma Innovation Journal*, 3(6), 65-69.
- Patel, P. K., Patel, M. A., Saralai, M. G., & Gandhi, T. R. (2012). Antiurolithiatic effects of *Solanum xanthocarpum* fruit extract on ethylene-glycol-induced nephrolithiasis in rats. *Journal of young pharmacists*, 4(3), 164-170.
- Patro, B.S., Bauri, A.K., Mishra, S., Chattopadhyay, S., 2005. Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. *Agricultural and Food Chemistry*.53, 6912-6918
- Paulino, N., A.P. Dantas, V. Bankova, D.T. Longhi, A. Scremin, S. Lisboa de Castro and J.B. Calixto. 2003. Bulgarian Propolis Induces Analgesic and Anti-inflammatory Effects in Mice and Inhibits In Vitro Contraction of Airway Smooth Muscle. *J Pharmacological Sciences*. 93:307-313. DOI: 10.1254/jphs.93.307
- Payen J.F., Bru O., Bosson J.L., Lagrasta A., Novel E., Deschaux I., Lavagne P., Jacquot C., (2001). Assessing pain in critically ill sedated patients by using a behavioral pain scale. *Crit. Care. Med*, 29:2258-63.
- Peretti C. S., Ferreri F., (2006). Troubles cognitifs dans la dépression. *La Lettre du psychiatre*, 2:206-209.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008
- Pillemer, K., Suito, J. J., Pedro, S., and Henderson Jr., C. (2010). Mothers Differentiation and suppressive Symptoms Among Adult Children. *Journal of Marriage and Family* 72 (2): 333-345.
- Porsolt R.D., Bertin A., Jalere M., (1977). Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 229:201-210.
- Price D.D., (2002). Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. *Molecular interventions*, 2:392-403.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams, S.M. (2000). *Neuroscience*. (seconde édition). Sinaute Associates. Inc. Sunderland, Massachusettes. USA.
- Queneau P. et Ostermann G., (1998). *Soulager la douleur*. Odile Jacob, Ed, Paris.
- Queneau P. et Ostermann G., (2004). *Le médecin, le malade et la douleur*. Ed 4. Elsevier Masson, Paris, p.12.
- Ramesh, M., Y.N. Rao, A.V. Rao, M.C. Prabhakar, C.S. Rao, N. Muralidhar and B.M. Reddy. 1998. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of a flavonoid isolated from *Caralluma attenuata*. *J. Ethnopharmacology*. 62(1):63-6. DOI:10.1016/S0378-8741(98)00048-8
- Rehman, Riaz, Muhammad Chaudhary, Khalid Khawar, Gang Lu, Abdul Mannan, et Muhammad Zia. 2014. *In Vitro Propagation of Caralluma Tuberculata and Evaluation of*

- Antioxidant Potential. *Biologia* 69 (3). <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0322-z>.
- Reisine T., Bell G.I., (1993).Molecular Biology of Opioid Receptors. *Trends Neurosci*, 16:506-510.
- Rekka, E. and P.N. Kourounakis, 1991.Effect of Hydroxyethyl Rutosides and Related Compounds on Lipid Peroxidation and Free Radical Scavenging Activity.Some Structural Aspects.*Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 43(7):486-491. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1991.tb03519.x
- Richetti, S.K., Blank, M., Capiotti, K.M., Piato, A.L., Bogo, M.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav. Brain Res*. 217, 10–15.
- Riedel W., Neeck G., (2001). Nociception pain and antinociception : currents concepts. *Z. Rheumatol.*, 60:404-15
- Romero V, Akpınar H, Assimos DG. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol*. 2010;12(2-3):e86–e96.
- Rosland, J.H., A. Tjølsen, B. Mæhle and K. Hole. 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, 42(2): 235-242. DOI: 10.1016/0304-3959(90)91167-H
- Rotelli, A.E., T. Guardia and A.O. Juarez. 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological.Research*. 48:601-06. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00225-1
- Roth R.A., Harkema J.R., Pestka J.P., Ganey P., (1997). Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 147 300–311, <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8301>.
- Ryter S.F., Tyrell R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways : role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro and antioxidant properties. *Free Rad. Res.*,36: 1299-1306.
- Sachar E.J., Hellman L., Roffwarg H., Halpern F.S., Fukushima D., Gallagher T., (1973). Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch.Gen. Psychiat.*, 28:19-24.
- Sagou, Nadia, Zineb Rhandour, Malak Eddebbagh, Mohamed Hsaine, Mohamed Berrada, Abdelmjid Abourriche, et Ahmed Bennamara. 2016.Ethnobotany Study and Phytochemical Screening of *Caralluma europaea* (Guss.) N.E. Br. *International Journal of Biosciences (IJB)* 9 (6): 460-67. <https://doi.org/10.12692/ijb/9.6.460-467>.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., 2004.Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15, 549-557.
- Sanmugapriya E., Venkataraman S., 2006. Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. Seeds on CCl₄ induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of ethnopharmacology* 105: 154-160.

- Savary. C., 2014. Étude de la toxicité chronique et du potentiel cancérigène de contaminants de l'environnement séparément et en mélange sur les cellules HepaRG. Thèse de doctorat de l'université de rennes1.p 23.
- Schisler N.J., Singh S.M., 1989. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.* 7: 117-123.
- Schnitzler A., Ploner M., (2000). Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J. Clin. Neurophysiol.*, 17:592-603.
- Schrijvers D., Hulstijn W., Sabbe B.G. C., (2008). Psychomotor symptoms in depression:A diagnostic, pathophysiological and therapeutic tool. *Journal of affective disorders*, 109:1-20.
- Schwedhelm, E., Maas, R., Troost, R., Boö ger, R.H., 2003.Clinical pharmacokinetics of Antioxidants and their impact on systemic oxidative stress.*Clin.Pharmacokinet.* 42, 437–459.
- Semins, M. J., & Matlaga, B. R. (2010).Medical evaluation and management of urolithiasis.*Therapeutic advances in urology*, 2(1), 3-9.
- Servais S., 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, France, pp. 19-35.
- Sgro C., Clinard F., Ouazir K. (2002).Incidence of drug-induced hepatitis injuries: A French population based study. *Hepatology*; 36:451-5.
- Shang, X., J. Wang, M. Li, X. Miao, H. Pan, Y. Yang and Y. Wang. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Phlomis umbrosa* Turcz extract. *Fitoterapia*. 82(4):716-21. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.03.001
- Shen, Y.; Zhang, H.; Wang, L.; Qian, H.; Qi, H.; Miao, X.; Cheng, L.; Qi, X. Protective effect of ferulic acid against 2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidative stress in PC12 cells. *Cell. Mol. Biol.*2016, 62, 109-116.
- Shopsin B., Gershon S., (1971). Plasma cortisol response to dexamethasone suppression in depressed and control patients. *Arch.Gen.Psychiat.*, 24:320-326.
- Shukla, Yatin, Ikhlas Khan, Philippe Geoffroy, et Michel Miesch. 2013.14β-hydroxypregnanes from succulent plants belonging to *Hoodia gordonii* and *Caralluma* genus: Extraction, biological activities, and synthesis. *Studies in Natural Products Chemistry* 40 (décembre): 327-58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00009-6>.
- Sokar Z., (2003). Contribution à la valorisation d'une plante médicinale marocaine: *Herniaria cinerea* dc. Herrast lehjar . Toxicité, activité antilithique et phytochimie. thèse de doctorat d'état, option pharmacognosie, faculté des Sciences Semialia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
- Soobrattee M.A, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma, T. Bahorun. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579 : 200–213. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023

- Stahl S. M. Psychopharmacologie Essentielle. "Bases neuroscientifiques et applications pratiques". 2010. 2ème édition française, (ISBN: 978-2-257-00087-3). Lavoisier SAS. 11 rue Lavoisier 75008 Paris.
- Steiger A., Holsboer F., (1997). Nocturna secretion of prolactin and cortisol and the sleep EEG in patients with major endogenous depression during an acute episode and after full remission. *Psychiatry Res.*, 72 (2):81-88.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: anew method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*85:367–370.
- Sumaira Sahreen; Muhammad Rashid; KhanRahmat Ali Khan. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry* 122 : 1205–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.120>.
- Swain A.R., Dutton S.P., Truswell A.S., (1985). Salicylates in foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, 85: 950-60.
- Tambe, Dipak A., Tejal B Chaudhari, et Sanjay R. Chaudhari. 2010. Phyto-Pharmacology of *Caralluma Adscendens* Roxb: A Review. *Pharmacognosy Journal* 2 (14): 33-38. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80069-0](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80069-0).
- Terlecki RP, Triest JA. A contemporary evaluation of the auditory hazard of extracorporeal shock wave lithotripsy *Urology* 2007; 70(5):898-899.
- Thangarathinam, N., Jayshree, N., Metha, A. V., & Ramanathan, L. (2013). Effect of polyherbal formulation on ethylene glycol induced urolithiasis. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(3), 994-997.
- Tillement J.H., 2001. Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par le Eresveratrol dans les états d'anoxie suivie de réoxygénation. *Bull. Acad. Med.*, 185 (8): 1429-1445.
- Tjølsen, A., O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland and K. Hole. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*.51(1):5-17. DOI:10.1016/0304-3959(92)90003-T
- Toll T.R., Schadrack J., Castro-Lopez J.M., Evan G., Roques B.P., Ziglgansberger W., (1994). Effects of Kelatorphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons. *Pain*, 56:103-12.
- Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene, D., Jakstas, V., Savickas, A., Toleikis, A., 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed. Pharmacother.* 60, 245–248.
- Vacheret N., 1999. Histologie fonctionnelle des organes. Université Lyon I. <http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20LYON/cris-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/FrameAccueil.html>
- Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A., 1996. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.
- Van Praag H.M., Korf J., (1971). Retarded depressions and the dopamine metabolism. *Psychopharmacology*, 19:199-203.

- Villano, M.S. Fernandez-Pachón, M.L. Moyá, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical D. *Talanta* 71 (2007) 230–235. doi:10.1016/j.talanta.2006.03.050
- Vion-Dury T., Cupo, A., (1988).La transmission enképhalinergique: caractéristiques fonctionnelles et rôle physiologique. *Rev. Neurol.*, 144:1-10.
- Waheed, Abdul, James Barker, Stephen J. Barton, Gul-Majid Khan, Qazi Najm-Us-Saqib, Manzoor Hussain, Sabbir Ahmed, Caroline Owen, et Mark A. Carew. 2011.Novel Acylated Steroidal Glycosides from *Caralluma Tuberculata* Induce Caspase-Dependent Apoptosis in Cancer Cells. *Journal of Ethnopharmacology* 137 (3): 1189-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.049>.
- Wallace MA., (1998). Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal*, 68(5):800, 803-816, 819-820; quiz 821-824.
- Waterbury, L.D., D. Silliman, and T. Jolas. 2006. Comparison of cyclooxygenase inhibitory activity and ocular anti-inflammatory effects of ketorolac tromethamine and bromfenac sodium. *Current Medical Research and Opinion*. 22: 1133-1140. DOI: Watts F.N., (1993). Problems of memory and concentrations. In C.G. Costello (ed), symptoms of depression. John Wiley, New York.
- Watts F.N., (1995).Depression and anxiety.In *Handbook of memory disorders*.Edited by Baddeley A.D., Wilso B.A. and Watts F.N. John Wiley and sons.
- Watts F.N., MacLeod A.K., Morris L., (1988).A remedial strategy for memory and concentration problems in depressed patients.*Cognitive Therapy and Research*. 12:185-193. 10.1185/030079906X112471
- Watts FN., Dagleish T., Bourk P., Healy D., (1990). Memory deficit in clinical depression: processing resources and the structure of materials. *Psychological Medicine*, 20:345-349.
- World Health Organization (1993).WHOQoL Study Protocol.WHO (MNH/PSF/93.9).
- World Health Organization (2012).Media Centre Depression. Fact sheet NO 369, Oct., <http://www.who.int/mediacentre.factsheets/fs369/en/>
- Wu, J.L.; Shen, M.M.; Yang, S.X.; Wang, X.; Ma, Z.C. Inhibitory effect of ferulic acid on neuro-inflammation in LPS-activated microglia. *Chin. Pharm. Bull.* 2015, 31, 97–102.
- Xu, Y.; Lin, D.; Yu, X.; Xie, X.; Wang, L.; Lian, L.; Fei, N.; Chen, J.; Zhu, N.; Wang, G.; et al. The antinociceptive effects of ferulic acid on neuropathic pain: Involvement of descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget* 2016, 7, 20455–20468.
- Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, et al. 2001. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*; 298(3): 894-899.
- Yen, G.C. and P.D. Duh. 1994. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agricultural and Food Chemistry*.42 (3):629-632. DOI:10.1021/jf00039a005

- Zakaria, M. N. M, M. W Islam, R Radhakrishnan, H. B Chen, M Kamil, A. N Al-Gifri, K Chan, et A Al-Attas. 2001. Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Properties of *Caralluma Arabica*. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (2): 155-58. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00208-2).
- Zerssen von D., Doerr P., (1980). The role of the hypothalamo-pituitary-adreno-cortisol system in psychiatric disorders. *Advances. Biological. Psychiatry.*, 5:85-106.
- Zhang ZF, Liu Y, Lu LY, et al. 2014. Hepatoprotective activity of *Gentiana veitchiorum* Hemsl. against carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in mice. *Chin J Nat Med*, 12(7): 488-494.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, Wu., 1999. The determination of flavonoïds contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64,555-559.
- Zhu Y, Teng T, Wang H, Guo H, Du L, Yang B, Yin X, Sun Y. 2018. Quercetin inhibits renal cyst growth in vitro and via parenteral injection in a polycystic kidney disease mouse model. *Food Funct*. 24;9(1):389-396. doi: 10.1039/c7fo01253e.
- Zito, Pietro, Maurizio Sajeve, Maurizio Bruno, Antonella Maggio, Sergio Rosselli, Carmen Formisano, et Felice Senatore. 2010. Essential Oil Composition of Stems and Fruits of *Caralluma europaea* N.E.Br. (Apocynaceae). *Molecules (Basel, Switzerland)* 15 (2): 627-38. <https://doi.org/10.3390/molecules15020627>.