جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH DE FES
كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES



N° d'Ordre : **24 /2020**

Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (RNE2D)

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie-physique appliquée

***Laboratoire :* Génie des Matériaux et Environnement (LGME)**

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

AMMOR Kenza

Etude de l'efficacité des extraits de certaines plantes médicinales comme remède pour lithiase urinaire

Soutenue le **14/03/2020** devant le jury composé de :

Pr. Abdelhak KHERBECHE	**Ecole Sciences et Techniques-Fès**	**Président**
Pr. Fatiha LAZIRI	**Faculté des Sciences – Meknès**	**Rapporteur**
Pr. Touriya ZAIR	**Faculté des Sciences- Meknès**	**Rapporteur**
Pr. Idriss EL BAKALI	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Rapporteur**
Pr. Fatima MAHJOUBI	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Examinateur**
Pr. Amina BARI	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Examinateur**
Pr. Mouhcine SFAIRA	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Examinateur**
Pr. Dalila BOUSTA	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Co- Directeur de thèse**
Pr. Abdellah CHAQROUNE	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**	**Directeur de thèse**

Année universitaire 2019/2020

Dédicaces

A mes chers parents Abdelkrim et Amina, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien et tous leurs sacrifices.

Qu'ils trouvent dans ce travail une récompense des espoirs qu'ils ont su mettre en moi et un témoignage de ma profonde affection et tendresse.

A mes chers frères Ahmed et Youness pour leur encouragement et leur soutien.

A mon cher mari Mehdi, qu'il reçoit à travers ce travail tout mon respect, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

A tous mes amis et à ceux qui me sont chers.

Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein du Laboratoire Génie des Matériaux et Environnement (LGME) ainsi que dans le Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique (LANENC) de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès sous la direction du Professeur **Abdellah CHAQROUNE** et la codirection des Professeurs Madame **Dalila BOUSTA** et Madame **Fatima MAHJOUBI**.

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Abdellah CHAQROUNE** pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon parcours et pour m'avoir dirigé, conseillé, encouragé et accueilli en tant que chercheur dans son équipe. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur **Fatima MAHJOUBI**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehrez de Fès d'avoir accepté de codiriger mon travail. Son soutien et ses conseils m'ont été d'un grand apport. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus profonde.

Je tiens à remercier également Madame le Professeur **Dalila BOUSTA**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehrez de Fès, d'avoir codirigé mon travail de recherche et notamment le volet toxico-pharmacologique. Ses recommandations m'ont énormément apporté.

Je tiens à remercier Monsieur **Abdelhak KHERBECHE**, Professeur à l'Ecole Sciences et Techniques-Fès, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes remerciements vont également à Madame le professeur **Fatiha LAZIRI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès d'être rapporteur de cette thèse. Que je remercie infiniment pour l'intérêt porté à cette thèse et également pour la peine qu'elle s'est donnée pour son déplacement.

Je tiens à remercier Madame le professeur **Touriya ZAIR**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès pour le temps qu'elle a consacré en tant que rapporteur à l'examen de ce travail. Aussi pour la peine qu'elle s'est donnée pour son déplacement.

Je tiens à remercier Monsieur **Idriss EL BAKALI**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehrez de Fès, pour le temps qu'il a consacré en tant que rapporteur à l'examen de ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame le professeur **Amina BARI**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehrez de Fès, c'est un honneur pour moi de la voir siéger parmi les membres de jury de ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur **SFAIRA Mouhcine,** Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehrez de Fès, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'examiner le manuscrit de thèse et de faire partie de son jury d'examen.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Tariq SQALLI HOUSSAINI**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, de m'avoir permit de réaliser l'enquête au service de Néphrologie du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie infiniment mon camarade de Laboratoire **Radouane El Habani** de m'avoir facilité la tâche de me procurer les échantillons sur lesquels j'ai effectué mes tests de laboratoire.

Mes remerciements vont également aux autorités de Skhinat et de Sidi Harazem qui m'ont facilité l'opération d'enquêtes ethno pharmacologiques.

Je ne peux manquer d'exprimer ma gratitude envers mes chers parents, mes frères, mon mari.
Mes remerciements les plus chaleureux sont dédiés à tous mes amis et plus précisément Hajar Gaamoussi, Zineb Majbar, Fatima zahra Jawhari, Saousane El kaabi, Hind Khalis, Zineb Mikdame, Soundous El kaabi, Kawtar Khalis, Iman Essafi et Hamza Mechchate et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour leur présence, leur soutien, pour tous les moments partagés et ceux à venir. Merci de votre amitié qui m'est si chère.

Résumé

Dans le but de recenser les plantes utilisées traditionnellement contre la lithiase rénale et de vérifier leur efficacité *in vivo* et *in vitro*, une enquête a été effectuée au sein du service de Néphrologie au Centre Hospitalier Universitaire Hassan II, à l'ancienne médina de Fès, à la station thermale de Sidi Hrazem et à Skhinat. Dans cette étude, plusieurs plantes ont été sélectionnées dont les plus citées sont : *Herniaria hirsuta*, *Zea mays*, *Opuntia ficus indica*, *Ammi visnaga* et *Zizyphus lotus*.

Les extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes retenues par l'enquête ont fait objet d'un criblage phyto-chimique et d'une évaluation de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antalgiques. Aussi leurs effets sur la dissolution des calculs d'oxalate de calcium et des calculs de cystine ont été testés. De même, l'efficacité des extraits sur la prévention de la formation des calculs d'oxalate de calcium a été menée dans ce travail.

Les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *Z. mays* présentent le meilleur taux en polyphénols et en capacité antioxydante. Ainsi que le meilleur taux de dissolution des calculs d'oxalate de calcium. Quant aux calculs cystiniques, les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *H. hirsuta* ont montré le meilleur taux de dissolution.

L'étude de la toxicité montre que l'administration orale des extraits hydro-éthanoliques de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* aux doses de 250 - 500 et 2000 mg/ kg de p.c des rats, n'induisent aucun effet toxique. L'activité anti-inflammatoire à la dose de 500 mg/kg pour les extraits de *Z. mays* et *H. hirsuta* et la dose de 250 mg/kg pour *O. ficus indica* ont montré un fort pourcentage d'inhibition de l'inflammation. L'évaluation de l'activité analgésique a montré que l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* a le pourcentage d'inhibition de la douleur le plus élevé pour les deux méthodes testées.

L'étude *in vivo* de l'extrait hydro-éthanolique d'*O. ficus indica* et de l'extrait de *Z. mays* et ses fractions (tanins et flavonoïdes) sur l'induction des calculs d'oxalate de calcium montre l'efficacité de ces extraits sur la prévention de la formation des calculs rénaux.

Nos travaux confirment l'efficacité des vertus thérapeutiques relatées par la population de la région de Fès – Meknès. Le meilleur résultat a été élucidé pour l'extrait de *Z. mays*, doté d'un taux de dissolution, d'un pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, analgésique très important.

Mots clé : Lithiase rénale, Enquête ethnopharmacologique, Herniaria hirsuta, Opuntia ficus-indica, Zea mays, Ammi visnaga, Zizyphus lotus, activités antioxydantes, dissolution, activité anti inflammatoire, activité analgésique, activité anti-lithiasique, in vitro, in vivo.

Abstract

In order to identify the plants traditionally used against renal lithiasis and to verify their effectiveness *in vivo* and *in vitro*, a survey was carried out within the Nephrology department at the University Hospital Center Hassan II, in the old medina of Fez, the thermal spa of Sidi Hrazem andin Skhinat. In this study, several plants were selected, the most cited of which are: *Herniaria hirsuta*, *Zea mays*, *Opunitia ficus indica*, *Ammi visnaga* and *Zizyphus lotus*.

The hydroethanolic and aqueous extracts of the plants selected by the survey were subjected to a phytochemical screening and an evaluation of their antioxidant, anti-inflammatory and analgesic properties. Also, their effects on the dissolution of calcium oxalate stones and cystine stones was tested. Likewise, the effectiveness of the extracts on preventing the formation of calcium oxalate stones was carried out in this work.

The hydro-ethanolic and aqueous extracts of *Z. mays* have the best level of polyphenols and antioxidant capacity. As well as the best rate of dissolution of calcium oxalate stones. As for cystinic calculi, hydroethanolic and aqueous extracts of *H. hirsuta* showed the best dissolution rate.

The toxicity study shows that the oral administration of hydro-ethanolic extracts of *Z. mays*, *O. ficus indica* and *H. hirsuta* at doses of 250 - 500 and 2000 mg / kg bw of rats, do not induce any toxic effect. The anti-inflammatory activity at the dose of 500 mg / kg for the extracts of *Z. mays* and *H. hirsuta* and the dose of 250 mg / kg for *O. ficus indica* showed a high percentage of inhibition of the inflammation. The evaluation of the analgesic activity showed that the hydro-ethanolic extract of *Z. mays* had the highest percentage of pain inhibition for the two methods tested.

The *in vivo* study of the hydro-ethanolic extract of *O. ficus indica* and the extract of *Z. mays* and its fractions (tannins and flavonoids) on the induction of calcium oxalate stones shows the effectiveness of these extracts in preventing the formation of kidney stones.

Our work confirms the effectiveness of the therapeutic virtues reported by the population of the region of Fez - Meknes. The best result has been elucidated for the extract of *Z. mays*, which has a very high dissolution rate, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic power.

Keywords: Renal lithiasis, Ethnopharmacological survey, Herniaria hirsuta, Opuntia ficus-indica, Zea mays, Ammi visnaga, Zizyphus lotus, antioxidant activity, dissolution, anti-inflammatory activity, analgesic activity, anti-lithiasic activity, in vitro, in vivo.

ملخص

من أجل التعرف على النباتات المستخدمة تقليديا ضد الحصيات الكلوية والتأكد من فعاليتها في الجسم الحي وفي المختبر، تم إجراء مسح داخل قسم أمراض الكلى في مركز المستشفى الجامعي الحسن الثاني، في المدينة القديمة لمدينة فاس وفي منتجع سيدي حرازم وسخينات. في هذه الدراسة تم اختيار عدة نباتات، الأكثر ذكرا منها:

Herniaria hirsuta L., *Zea mays* L., *Opuntia ficus indica* (L.) Mill., *Ammi visnaga* (L.) Lam. *Zizyphus lotus* (L.) Lam.

خضعت المستخلصات المائية الإيثانولية والمائية للنباتات المختارة لفحص كيميائي نباتي وتقييم لخصائصها المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والمسكنة. كما تم اختبار تأثيرها على إذابة حصوات أكسالات الكالسيوم وحصوات السيستين. كذلك، تم تأكيد فعالية المستخلصات في منع تكون حصوات أكسالات الكالسيوم في هذا العمل.

تحتوي المستخلصات المائية الإيثانولية والمائية لـ *Z. mays* على أفضل معدل للبوليفينول والقدرة المضادة للأكسدة. بالإضافة إلى أفضل معدل إذابة لأحجار أكسالات الكالسيوم. أما بالنسبة لحصوات السيستين، فقد أظهرت المستخلصات المائية الإيثانولية والمائية من *H. hirsuta* أفضل معدل انحلال.

كما أظهرت دراسة السمية أن التناول الفموي للمستخلصات المائية الإيثانولية من *Z. Mays* و *O. ficus indica* و *H. hirsuta* بجرعات من 250-500 و2000 مجم / كجم من وزن جسم الفئران، لا تسبب أي تأثير سام. أظهر النشاط المضاد للالتهابات بجرعة 500 مجم / كجم لمستخلصات *Z. mays* و *H. hirsuta* والجرعة 250 مجم / كجم لـ *O. ficus indica* نسبة عالية من تثبيط الالتهاب. أظهر تقييم النشاط المسكن أن المستخلص المائي الإيثانولي لـ *Z. Mays* له أعلى نسبة من تثبيط الألم للطريقتين المختبرتين.

الدراسة في الجسم الحي للمستخلصات المائية الإيثانولية لكل من *O. ficus indica, Z. mays* وجزيئاتهم (العفص والفلافونويدات) لتحريض حصوات أكسلات الكالسيوم بينت فعالية المستخلصات في منع تكون حصوات الكل.

أكدت أبحاثنا على فاعلية المزايا العلاجية التي أبلغ عنها سكان منطقة فاس - مكناس. أتبتت أفضل النتائج لدى مستخلص نبتة *Z. mays* الذي يتمتع بمعذل ذوبان وقدرة مضادة للأكسدة وللإلتهاب ومسكنة جد عالية.

الكلمات الدالة: تحصي الكلوي، المسح العرقي الدوائي، *Herniaria hirsuta*، *Opuntia ficus-indic*، *Zizyphus lotus*، *Ammi visnaga*، *Zea mays*، الأنشطة المضادة للأكسدة، تحلل، النشاط المضادة للالتهابات، النشاط المسكن، النشاط المضاد للتحصي، في المختبر، في الجسم الحي.

Liste des Abréviations

LEC : **L**ithotripsie **E**xtra-**C**orporelle

NLPC : **N**éphro-**L**ithotomie **P**ercutanée

OMS : **O**rganisation **M**ondial de la **S**anté

ECBU : **E**xamen **C**yto-**Ba**ctériologique **U**rinaire

AHHDP : **A**cide **H**exa-**H**ydroxy-**D**i-**P**hénique

DMLA : **D**égénérescence **M**aculaire **L**iée à l'**A**ge

IPP : **I**sopéntyl **P**yro **P**hosphate

GPP : **G**ényl **P**yro- **P**hosphate

AFNOR : **A**ssociation **F**rançaise de **N**ormalisation

EHE : **E**xtrait **H**ydro-**E**thanolique

EA : **E**xtrait **A**queux

ASE : **E**xtraction **A**ccéléré par **S**olvant

GPC : **C**hromatography en **P**hase **G**azeuse

FID : **D**étecteur à **I**onisation de **F**lamme

MS : **S**pectroscopie de **M**asse

HPLC : **C**hromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance

UV- vis : **U**lra **V**iolet **v**isible

RMN : **R**ésonnance **M**agnétique **N**ucléaire

HTS : **C**riblage à **H**aut **D**ébit

CHU : **C**entre **H**ospitalier **U**niversitaire

EOA : **E**spèces **O**xygénés **A**ctivés

ERO : **E**spèces **R**éactives de l'**O**xygène

ADN : **A**cide **D**ésoxyribo **N**ucléique

BHT : 3,5-di-tert-**b**utyl-4-**h**ydroxy**t**oluène

TEAC : Capacité Antioxydante Equivalente en Trolox

ABTS : Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazolin-6-Sulfonique)

DPPH : 2, 2-**Di**p**h**ényl-1-**pi**cryhydrazyl

ORAC : **C**apacité d'**A**bsorption des **R**adicaux **O**xygénés

AAPH : 2,2'-Azobis[2-AmidinoPropane] dihydrochloride

FRAP : **P**ouvoir **A**ntioxydant par **R**éduction **F**errique

CAT : **C**apacité **A**ntioxydante **T**otale

EDTA : **E**thylène **D**iamine **T**étra **A**cétique

MDA : **M**alonaldéhyde

AINS : **A**nti-**I**nflammatoire **N**on-**S**téroïdien

AIS : **A**nti-**I**nflammatoire **S**téroïdien

OCDE : Organisationde **C**oopération et de **D**éveloppement**E**conomiques

ECW: **E**mirate **W**ildlife **P**rogram

EAG: **E**quivanlent d'**A**cide **G**allique

EQ : **E**quivalent en **Q**uercetine

OECD : **O**rganisation **E**conomique pour la **C**oopération et le **D**éveloppement

ROW : **P**oids **R**elatif des **O**rganes

IP : **I**ntra **P**éritonéale

EG : **E**thylène **G**lycol

ALT : **A**lanine **A**mino **T**ransférase

AST : **A**spartate **A**mino **T**ransférase

ALP : **P**hosphatase **A**lcaline **T**ransférase

Liste des figures

Figure 1: Structures de quelques tanins 24

Figure 2: Structures de quelques Flavonoïdes 25

Figure 3: Structure de coumarines 26

Figure 4: Caroténoïdes : Structure du β-carotène 27

Figure 5: Structure de base des terpènes 27

Figure 6: Alcaloïdes : Structure de la caféine 30

Figure 7: Stress oxydant 50

Figure 8: Exemples de structures d'anti-inflammatoires non stéroïdiens 61

Figure 9: Exemples de structures d'anti-inflammatoires stéroïdiens 62

Figure 10: Zone d'enquête de la région Fès-Meknès 76

Figure 11: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales selon le sexe 96

Figure 12: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales selon l'âge 96

Figure 13: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales en fonction du niveau d'étude. 97

Figure 14: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales en fonction de la situation familiale 97

Figure 15: Pourcentage d'utilisation des différentes parties des plantes 98

Figure 16: Répartition des différents modes de préparation 98

Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 104

Figure 18: Courbe d'étalonnage de la quercétine 105

Figure 19: Pouvoir réducteur des extraits hydro-éthanoliques et aqueux comparé à celui du BHT 107

Figure 20 : Analyse en composantes principales de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et des propriétés anti oxydantes des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées 110

Figure 21: Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques pour les extraits aqueux (b) 116

Figure 22: Evolution du pH en fonction du temps en présence des calculs d'oxalo-calcique pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Evolution du pH en fonction du temps en présence des calculs d'oxalo-calciques pour les extraits aqueux (b) 117

Figure 23: Taux de dissolution des calculs de cystine pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Taux de dissolution des calculs de cystine pour les extraits aqueux (b) 118

Figure 24: Evolution du pH en fonction du temps en présence de cystine pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Evolution du pH en fonction du temps en présence de cystine pour les extraits aqueux (b) 119

Figure 25: Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques des extraits des tanins et des flavonoïdes (a) ; Evolution temporelle du pH en présence des calculs oxalo-calciques pour les extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (b)..... 121

Figure 26: Taux de dissolution des calculs de cystine pour des extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (a) ; Evolution temporelle du pH en présence des calculs de cystine pour les extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (b)..... 122

Figure 27: Suivi du poids corporel des rats traités par voie orale aux doses de 250,500 et 2000 mg/kg, Les données sont exprimées en moyenne ± ET ; n=5. 128

Figure 28 : Suivi du poids corporel des rats traités en administration répétée pendant 28 jours. Les données sont exprimées en moyenne ± ET ; N=5. 130

Figure 29: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *Z. mays* aux doses de 250 et 500 mg/kg comparée à l'indométacine 131

Figure 30: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits hydro-éthanoliques de *H. hirsuta* aux doses de 250-500 mg/kg comparée à l'indométacine 132

Figure 31: Activité anti-inflammatoire des extraits hydro-éthanoliques de *O. ficus indica* aux doses de 250-500 mg/kg comparée à l'indométacine 133

Figure 32: Nombre de contractions abdominales (teste de l'acide acétique) pour les groupes traités par EHE de *Z. mays*, de *O. ficus indica*, de *H. hirsuta* comparé au Diclofénac..... 134

Figure 33 : Temps de léchage de la patte postérieur droite (teste de Formalin) en seconde pour les groupes traité par *Z. mays*, *O. ficus indica, H. hirsuta* comparé au Diclofénac..... 135

Figure 34: Evolution du volume urinaire en (ml/24h) en fonction du temps chez les groupes étudiés..... 139

Figure 35: Variation du pH urinaire durant les 4 semaines d'étude pour les groupes étudiées 140

Figure 36: Effet des extraits, des fractions d'extraits et de la cystone sur la concentration urinaire du calcium, du phosphate et du magnésium exprimé en mg/l après 30 jours de traitement..... 141

Liste des tableaux

Tableau 1: Masse moyenne initiale des calculs et fragments de calculs en mg 82

Tableau 2: Liste des différentes plantes utilisées traditionnellement dans le traitement de la lithiase rénale, aussi la partie utilisée, le mode d'utilisation et leurs fréquences d'utilisation dans la préfecture de Fès. 93

Tableau 3: Rendements des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées 102

Tableau 4: Criblage phytochimique des extraits hydro-éthanoliques des plantes étudiées .. 103

Tableau 5: Criblage phytochimique des extraits aqueux des plantes étudiées 103

Tableau 6: Concentration en phénols totaux des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimée en mg EAG/g extrait 104

Tableau 7 : Concentration en Flavonoïdes des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimé en mg Q/g extrait 105

Tableau 8: Valeurs des IC_{50} des extraits hydro-éthanoliques, aqueux et du BHT exprimé en mg/ml 106

Tableau 9 : Valeurs des IC_{50} des extraits hydro-éthanoliques et aqueux et du BHT exprimé en mg/ml 107

Tableau 10: Capacité antioxydante totale des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimées en mg BHT/g d'extrait 108

Tableau 11: Coefficients de corrélation entre les composés 109

Tableau 12: Rendement des fractions de flavonoïdes et de tanins 120

Tableau 13: Poids relatif des organes chez les lots traités aux doses de 250 - 500 et 2000 mg/kg des extrais des plantes étudiées 129

Tableau 14 : Poids relatif des organes chez les lots traités à la dose de 500 mg/ kg des extrais des plantes étudiées 130

Tableau 15 : Evaluation de l'effet analgésique (teste de l'acide acétique) de EHE *Z. mays*, EHE *O. ficus indica*, EHE *H. hirsuta* comparé audiclofénac..... 134

Tableau 16: Evaluation de l'effet analgésique (teste de Formalin) des EHE de *Z. mays*, de *O. ficus indica*, de *H. hirsuta* comparé audiclofénac 135

Tableau 17: Evaluation des paramètres biochimiques des lots traités avec les extraits de plantes et fraction étudiées comparé aux témoins..... 142

Sommaire

Introduction Générale..... 1

PARTIE I : Revue bibliographique

CHAPITRE I : Lithiase Rénale

I. Introduction..... 8

II. Causes de formation de la lithiase rénale..... 8

III. Lithogenèse et formation d'un calcul 9

III.1 Sursaturation..... 9

III.2 Germination ou nucléation cristalline..... 9

III.3 Croissance cristalline..... 10

III.4 Agrégation cristalline 10

III.5 Agglomération cristalline 11

III.6 Rétention des particules cristallines 11

III.7 Croissance du calcul 11

IV. Méthodes d'analyse des calculs rénaux 12

V. Différents types de calculs..... 13

V.1 Oxalate de calcium 14

V.2 Phosphate de calcium 14

V.3 Struvite..... 14

V.4 Acide urique 15

V.5 Urates..... 15

V.6 Cystine 16

V.7 Calculs médicamenteux..... 16

VI. Symptomatologie de la lithiase rénale 16

VI.1 Colique néphrétique..... 16

VI.2 Hématurie 16

VI.3 Infection urinaire 17
VI.4 Anurie 17
VII. Techniques d'élimination des calculs 17
VII.1 Lithotripsie extracorporelle 18
VII.2 Néphrolithotomie percutanée 18
VII.3 Urétéroscopie 18
VII.4 Chirurgie 18
VIII. Conclusion 19

CHAPITRE II : Substances végétales bioactives et méthodes d'extraction

I. Introduction 21
II. Molécules bioactives issues de métabolites primaires et secondaires 21
II.1 Métabolites primaires 21
II.2 Métabolites secondaires 22
III. Méthodes d'extraction des substances végétales bioactives 30
III.1 Huiles essentielles 31
III.2 Extraits de plantes 34
IV. Méthodes d'analyses 36
IV.1 Chromatographie en phase gazeuse 36
IV.2 Couplage GC/MS 37
IV.3 Chromatographie liquide haute performance 37
V. Conclusion 37

CHAPITRE III : Méthodes de sélection des plantes objet de l'étude

I. Différentes méthodes de dépistage de l'activité biologique des végétaux 40
I.1 Première voie 40
I.2 Deuxième voie 41

II. Enquête ethnopharmacologique 42
II.1 Enquêtes antécédentes 42
II.2 Monographie des plantes sélectionnées 43

CHAPITRE IV : Oxydation et anti-oxydants

I. Stress oxydant 50
I.1 Définition 50
I.2 Radical libre 51
I.3 Espèces réactives de l'oxygène 51
I.4 Conséquences du stress oxydant 51
I.5 Maladies liées au stress oxydatif 51
II. Antioxydants 52
II.1 Définition 52
II.2 Mécanisme d'action 52
II.3 Différentes utilisations 53
II.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante 53

CHAPITRE V : Activités toxico-pharmacologiques et étude *in vitro* des substances végétales bioactives

I. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires 58
I.1 Inflammation 58
I.2 Causes de l'inflammation 58
I.3 Types d'inflammation 59
I.4 Cellules d'inflammation 60
I.5 Médiateurs d'inflammation 61
I.6 Anti-inflammatoires 61
I.7 Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire 63
II. Généralités sur la douleur et les antalgiques 63
II.1 Douleur 63

II.2 Physiologie de la douleur 64
II.3 Types de douleurs 64
II.4 Antalgiques 65
II.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antalgique 65
III. Généralités sur les études toxicologiques 66
III.1 Toxicité aiguë (administration unique) 67
III.2 Toxicité subaiguë (administration réitérée) 67
III.3 Dose létale 50 68
IV. Traitement anti-lithiasique 68
IV.1 Phythomédicaments ayant une activité anti-lithiasiques 69
IV.2 Induction des calculs d'oxalate de calcium *in vivo* 70
V. Réduction massique des calculs rénaux *in vitro* 71

PARTIE II : Matériel et Méthodes

I. Matériel 74
I.1 Matériel végétal 74
I.2 Animaux 74
I.3 Calculs rénaux 74
II. Méthodes 75
II.1 Questionnaire de l'enquête 75
II.2 Descriptive de la zone d'étude 75
II.3 Extractions des substances naturelles 76
II.4 Criblage phytochimque des extraits de plantes 78
II.5 Dosages des polyphénols 80
II.6 Dissolution des calculs rénaux *in vitro* 81
II.7 Evaluation de l'activité antioxydante 83
II.8 Etudes des propriétés pharmacologiques 84

PARTIE III : Résultats et Discussions

CHAPITRE I :Etude ethnopharmacologique des plantes médicinales à vertu anti-lithiasique

I. Introduction 93

II. Enquête ethnopharmacologique 93

III. Profil de l'informateur 95

III.1 Utilisation des plantes médicinales selon le sexe 95

III.2 Utilisation des plantes médicinales en fonction de l'âge 96

III.3 Utilisation des plantes médicinales en fonction du niveau d'étude 96

III.4 Utilisation des plantes médicinales en fonction de la situation familiale 97

IV. Analyse des données en fonction des plantes utilisées 97

IV.1 Aspect floristique 97

IV.2 Parties utilisées 97

IV.3 Mode de préparation 98

IV.4 Plantes médicinales fréquemment utilisées dans le traitement des calculs rénaux ... 99

IV.5 Plantes retenues par l'étude 99

V. Discussion 99

VI. Conclusion 100

CHAPITRE II :Etude phytochimique et évaluation de l'activités antioxydantes des extrais des plantes objet de l'étude

I. Introduction 102

II. Rendement des extraits hydro-éthanoliques par Soxhlet et aqueux par Décoction 102

III. Criblage phytochimique 102

IV. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes 104

IV.1 Phénols totaux 104

IV.2 Flavonoïdes 105

V. Evaluation de l'activité antioxydante 105
V.1 Piégeage du radical libre du DPPH 105
V.2 Pouvoir réducteur du fer 106
V.3 Capacité antioxydante totale 108
VI. Corrélation et analyse en composantes principales 108
VII. Discussion 110
VIII. Conclusion 113

CHAPITRE III :Effets *in vitro* des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées sur la dissolution des calculs oxalo calciques et cystiniques

I. Introduction 115
II. Effet des extraits hydro-éthanoliques et aqueux sur les calculs oxalo-calciques 115
II.1 Evolution temporelle du taux de dissolution (TD) 115
II.2 Evolution temporelle du pH 117
III. Effet des extraits hydro-éthanoliques et aqueux sur les calculs de cystine 117
III.1 Evolution temporelle du taux de dissolution 117
III.2 Evolution temporelle du pH 119
IV. Effet des fractions des flavonoïdes et tanins sur les calculs rénaux 120
IV.1 Rendement d'extraction par fractionnement des tanins et flavonoïdes 120
IV.2 Evolution temporelle du TD et du pH sur les calculs oxalo-calciques 120
IV.3 Evolution temporelle du taux de dissolution et du pH sur les calculs de cystines .. 121
V. Discussion 122
VI. Conclusion 125

CHAPITRE IV :Etudes pharmacologiques

A. Etude de la toxicité et de l'activité anti-inflammatoire et analgésique 127
I. Introduction 127
II. Etudes toxicologiques 127

II.1 Etude de la toxicité aigue 127
II.2 Etude de la toxicité subaiguë 129
III. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire 131
III.1 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *Z. mays* 131
III.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE *H. hirsuta* 131
III.3 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *O. ficus indica* 132
IV. Evaluation de l'activité analgésique 133
IV.1 Méthode de l'acide acétique 133
IV.2 Méthode de Fomalin 134
V. Discussion 135
VI. Conclusion 137
B. Etude de l'activité anti-lithiasique *in vivo* 138
I. Introduction 138
II. Effet des extraits sur les urines 139
II.1 Evolution du volume urinaire 139
II.2 Variation du pH urinaire 140
II.3 Evolution des cations Ca^{2+}, Mg^{2+} et PO_4^{3-} 140
III. Cristallurie urinaire 141
IV. Analyse des paramètres biochimiques 141
V. Discussion 142
VI. Conclusion 144
Conclusion Générale 145
Références bibliographiques 149
Annexe 185

Introduction Générale

Introduction générale

La lithiase rénale est une pathologie métabolique multifactorielle dont le nom dérive du grec « lithos » qui signifie pierre [1]. C'est l'une des plus anciennes maladies connues. Il y a environ 5000 ans, on décrivait le premier cas chez un jeune égyptien de 15 ans lors de 9000 autopsies pratiquées sur des momies [2]. Elle résulte de la cristallisation de certaines substances chimiques se trouvant en sursaturation dans l'urine. Le calcul est donc la conséquence d'un déséquilibre biologique urinaire transitoire, intermittent ou permanent. Il est l'expression d'une sursaturation relative ou absolue quelle qu'en soit l'origine [3,4]. La lithiase rénale est devenue très fréquente dans les pays développés, elle peut être due à l'augmentation du niveau de vie et aux modifications des habitudes alimentaires (surpoids) qui en résultent. Aussi les facteurs métaboliques, infectieux, anatomiques et/ou médicamenteux dont l'identification nécessite des investigations cliniques et biologiques.

Toutefois, les facteurs génétiques jouent également un rôle essentiel et il existe plusieurs modèles de lithiase d'origine héréditaire où l'anomalie génétique est la cause directe de la formation des calculs [5,6]. La formation de calculs dans les reins et les voies urinaires représente un problème majeur de la santé publique auquel les urologues et les néphrologues sont régulièrement confrontés à cause du caractère récidivant et récurrent de la maladie.

Malgré les progrès considérables qui ont été réalisés dans le domaine urologique au cours des dernières années offrant aux chirurgiens une panoplie de moyens pour l'extraction du calcul urinaire : la lithotripsie extracorporelle (LEC), la néphrolithotomie percutanée (NLPC) et l'endoscopie interventionnelle. Certaines lithiases ont tendance à récidiver en l'absence de traitement et peuvent alors être responsables des manifestations douloureuses invalidantes, voire de complications sévères nécessitant des interventions chirurgicales répétées et comportant des risques d'altération définitive de la fonction rénale. Le traitement des lithiases rénales comprend donc toujours deux aspects : le traitement des calculs et celui de la maladie lithiasique qui repose sur la connaissance de la nature du calcul et l'enquête étiologique [7].

L'évolution et la récidive des calculs rénaux pourraient être aujourd'hui évitées dans la majorité des cas au prix d'un diagnostic précoce et d'un traitement préventif approprié et régulièrement suivi. L'analyse du calcul, par des méthodes physiques fiables (diffraction des rayons X, la spectroscopie moléculaire, l'analyse thermique), est primordiale pour identifier la nature de la maladie lithiasique et pour orienter l'exploration biologique chez la majorité des patients lithiasiques.

Depuis longtemps, l'Homme a trouvé dans son environnement certains remèdes pour guérir et aussi soulager ses maux et il a également appris à ses dépens à reconnaitre les plantes

toxiques. Ces connaissances ont été transmises de génération en génération, renforcée par les échanges entre civilisation et l'expérience empirique. La transmission des connaissances a d'abord été orale. Ensuite ils ont été dans les écrits dont il subsiste des traces de l'emploi des plantes comme médicaments par les anciens dans les plus vieilles civilisations. De nos jours, et malgré le développement qu'a connu la médecine moderne, les remèdes traditionnels n'ont jamais perdu leurs valeurs.

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 80 % des populations rurales vivant dans les pays en développement utilisent les plantes pour leurs besoins en soin de santé. L'usage des plantes médicinales est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. À cause de leur coût moins élevé comparé aux médicaments conventionnels et aussi leur relative disponibilité surtout dans les régions éloignées.

En raison de la diversité de son règne végétal, le Maroc constitue, sur le plan thérapeutique, un champ de prédilection des botanistes, des chercheurs et des guérisseurs.

Actuellement, les substances naturelles sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments et en représentent près de 60 %. Les 40 % restantes découlent de la synthèse ou de l'hémi synthèse. La recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle passe par l'inventaire des plantes et l'examen systématique de leur activité biologique.

C'est dans cette optique que se place le présent travail qui a pour but de vérifier le bien-fondé ou non des savoirs et des savoir-faire traditionnels ainsi que les vertus accordées à la pharmacopée traditionnelle dans le traitement des calculs rénaux par la population de la région de Fès-Meknès et ceci à travers l'analyse phytochimique pharmacologique et biologique de quelques plantes médicinales et aromatiques réputées pour avoir des effets anti-lithiasiques.

Pour atteindre ce but, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- ✓ Mener une enquête ethnopharmacologique dans l'objectif de sélectionner les plantes médicinales candidates réputées anti-lithiasiques dans la préfecture de Fès à savoir la commune urbaine de Fès-Médina, le centre hospitalier universitaire Hassan II et la station thermale (Sidi Hrazem et Skhinat).
- ✓ Réaliser un criblage phytochimique des plantes sélectionnées et vérifier leurs propriétés antioxydantes.

- ✓ Vérifier, *in vitro*, l'efficacité des plantes sélectionnées par l'enquête ethnopharmacologique dans la réduction massique de quelques calculs rénaux à base d'oxalate de calcium et de cystine.
- ✓ Etudier les propriétés pharmacologiques (toxicité, activité anti-inflammatoire, activité analgésique), des extraits de plantes sélectionnées suite de l'étude de la dissolution des calculs rénaux.
- ✓ Etudier l'activité anti-lithiasique des extraits pouvant prévenir la formation des calculs d'oxalate de calcium.

Le présent manuscrit de thèse est subdivisé en trois parties :

- ➢ La première partie représente une synthèse bibliographique qui traite la pathologie de la lithiase rénale et les substances bioactives végétales. Elle est répartie en cinq chapitres : Le premier concernera la lithiase rénale, les causes de sa formation, la lithogénèse d'un calcul, les différents types de calculs, les différentes symptomatologies de la lithiase rénale et les techniques de leur élimination. Au second chapitre nous exposerons les structures ainsi que les vertus thérapeutiques des molécules bioactives végétales. Nous présenterons également des généralités sur les méthodes d'extraction des substances bioactives et les méthodes d'analyse de ces substances. Dans le troisième chapitre nous évoquerons les méthodes de sélection des plantes. Le quatrième chapitre concernera les phénomènes d'oxydations et les antioxydants en l'occurrence leurs mécanismes d'action ainsi que les méthodes d'évaluation de leurs activités. Le dernier chapitre est dédié aux différentes méthodes d'évaluation des activités pharmacologiques en l'occurrence la toxicité, l'activité anti-inflammatoire et antalgique et l'étude *in vitro* des substances bioactives.

- ➢ La deuxième partie concernera les différentes approches méthodologiques utilisées *in vitro* et *in vivo*.

- ➢ La troisième partie portera sur les résultats et discussions. Elle contiendra :
  - Une étude ethnopharmacologique des plantes médicinales à vertu anti-lithiasique ;
  - Une étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits des plantes objet de l'étude ;
  - Les effets *in vitro* des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées sur la dissolution des calculs oxalo calciques et cystiniques ;

- Une étude de la toxicité et de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des plantes étudiées ;
- Une étude de l'activité anti-lithiasique *in vivo*.

PARTIE I :

Revue bibliographique :

Lithiase rénale et substances végétales bioactives

CHAPITRE I :
Lithiase rénale

I. Introduction

La pathologie lithiasique est très répandue dans le monde et est à l'origine d'une morbidité non négligeable [8]. Elle atteint selon les pays 5 à 20 % de la population totale, essentiellement entre 20 et 60 ans, avec un sex-ratio de trois hommes pour une femme. Sa prévalence annuelle a triplé en quarante ans.

Après la découverte d'un premier calcul, les récidives sont fréquentes (plus de 60 % après les 10 ans qui suivent). Son caractère récidivant et les complications qu'elle engendre rendent nécessaires sa prévention et son traitement [8].

Les calculs urinaires sont formés de deux composantes de base, à savoir la matrice organique qui représente entre 2 et 5 % du poids du calcul et dont la majorité est de nature protéinique. Quant au reste est représenté par les minéraux.

Les calculs présentent une composition hétérogène dans 90 à 95 % des cas. C'est pourquoi, pour des raisons de simplification, plusieurs publications limitent l'expression de la composition cristalline à l'espèce majoritaire [9].

II. Causes de formation de la lithiase rénale

La lithiase rénale est le résultat de plusieurs facteurs qui peuvent être éventuellement génétiques, alimentaires ou infectieux et varient le plus souvent dans leur composition chimique en fonction de la cause. Les calculs d'origine calcique sont les plus courants et sont composés principalement d'oxalate de calcium. Ils sont dus généralement à l'augmentation de la concentration du calcium ou d'oxalate dans les urines pour diverses raisons comme une consommation excessive d'aliments contenant de l'oxalate (noix, chocolat, pomme de terre, fèves de soja, etc.). Soit à des approvisionnements élevés en vitamine D contenue dans des compléments alimentaires. Soit à certains troubles digestifs qui provoquent l'augmentation de l'absorption du calcium ou de l'oxalate par l'intestin.

Il est à remarquer que les autres types de calculs rénaux pourraient être provoqués soit par des infections urinaires appelées calculs de struvite. Aussi peuvent être dûs à une déshydratation ou un apport élevé en protéines, ou à certains troubles héréditaires du métabolisme comme la cystinurie. Cette dernière provoque une excrétion excessive de l'acide aminé, appelé cystine, dans l'urine conduisant à la formation de calculs cystiniques.

L'hyperplasie bénigne de la prostate chez les hommes âgés de plus de 50 ans empêche la vessie de se vider complètement, ce qui pourrait contribuer à la création de calculs dans la vessie.

Quelques médicaments peuvent induire la formation de cristaux lors de leur élimination par les reins. L'excès de laxatifs ou la diarrhée régulière pourraient également favoriser l'apparition d'une lithiase [1,5,6].

III. Lithogenèse et formation d'un calcul

La genèse d'un calcul se fait selon plusieurs processus qui conduisent à son développement et sa formation dans les voies urinaires. Le processus de la lithogenèse peut être subdivisé en sept étapes [10,11].

III.1 Sursaturation

La sursaturation des urines est l'action primordiale de la création des germes cristallins. Elle dépend à la fois de la concentration molaire des substances dissoutes et de leur degré d'ionisation qui dépend lui-même du pH des urines et de la température.

La concentration molaire dépend quant à elle du débit urinaire quotidien, des solutés et du volume de la diurèse.

D'autres composantes interviennent également comme la force ionique qui exerce un effet solubilisant quand elle est élevée et la concentration en substances capables d'interagir avec les solutés lithogènes [12].

Pour la lithiase oxalo-calcique, le rapport de concentration des deux prompteurs tels que, le calcium et l'oxalate, joue un rôle primordial pour déterminer la phase cristalline [6]. Lorsque le pH est inférieur à 5, ce qui correspond à des situations d'hyperxalurie relatives ou absolues, la forme monohydratée est favorisée. A l'inverse, lorsqu'il est supérieur à 14, ce qui traduit généralement l'existence d'une hypercalciurie, la forme dihydratée est pratiquement la seule capable de se former. Quant à l'oxalate de calcium trihydraté, il est fréquent en solution aqueuse *in vitro* mais très rare dans l'urine normale [13].

III.2 Germination ou nucléation cristalline

La nucléation est la conséquence d'une sursaturation très élevée, les molécules en excès se rassemblent pour constituer des germes cristallins, premier stade des particules solides conduisant à la formation de calculs. Cette étape de germination ou nucléation cristalline peut

traduire différentes situations. Schématiquement, on distingue deux sortes de nucléation : la nucléation homogène et la nucléation hétérogène [10,11,14].

- La nucléation homogène est due à la cristallisation immédiate d'une espèce dont le niveau de sursaturation est haut. C'est par exemple le cas de l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) dans l'hyperoxalurie primaire [13].
- La nucléation hétérogène s'observe pour des niveaux de sursaturation moindres. Elle traduit le fait que les cristaux se créent au contact de particules telles que des résidus épithéliaux ou cellulaires ou d'autres cristaux déjà existants jouant le rôle d'inducteurs [14].

III.3 Croissance cristalline

Un cristal a plusieurs sites de croissance spécifique qui contribuent à la détermination de sa forme et de sa taille. Après formation de nucléus stables, la croissance a lieu par dépôt de solutés sur les sites de croissance, élargissant ainsi davantage les cristaux [15].

Les cristaux produits par la sursaturation élevée des urines sont initialement très petits (< 100 nm) et ne présentent pas une menace de lithiase. Ils accroissent plus ou moins rapidement par addition des nouvelles molécules de la substance sursaturée présente dans l'urine formant ainsi des particules plus grandes, comprises entre 1 et 100 µm selon les espèces cristallines et la composition urinaire. Cette croissance nécessite une cinétique souvent supérieure à celle du transit de l'urine au travers du néphron. Cela rend le risque de rétention cristalline intra-rénale par la taille des cristaux très faible. Cependant, les urines peuvent rester longtemps dans la vessie. Pendant cette période, la croissance des cristaux peut y générer la formation de particules parfois assez grosses comme les cristaux d'acide urique dihydraté qui pourront s'agréger et engendrer un processus lithiasique [10,11,13].

III.4 Agrégation cristalline

L'agrégation est un phénomène complexe durant lequel les cristaux s'agglomèrent, conduisant à la formation des amas volumineux d'une taille suffisamment grande pour empêcher leur élimination. Les agrégats dépassent parfois 200 µm et peuvent se former en moins d'une minute, ce qui facilite par la suite leurs rétentions dans les tubes collecteurs [14].

Cette étape est déterminante dans la formation d'un calcul urinaire puisque la formation de cristaux est un phénomène commun aussi bien chez les patients lithiasiques que chez les sujets sains [16].

L'agrégation cristalline peut résulter soit d'une attraction électrostatique entre les couches atomiques externes, soit par la présence dans les urines des macromolécules qui se comportent comme un ciment entre les germes cristallins, on parle dans ce cas de liaison visqueuse [17].

III.5 Agglomération cristalline

L'agglomération des cristaux comporte des macromolécules urinaires qui, par leurs nombreuses charges négatives, peuvent s'accrocher à la surface des cristaux et favoriser ainsi la fixation de nouveaux cristaux suivant un arrangement bien défini, contribuant ainsi à l'architecture du calcul. Il s'agit d'un aspect fondamental des processus lithiasiques s'exprimant aussi bien au niveau des étapes initiales de la lithogenèse, qui aboutissent à la rétention de particules dans les voies urinaires, que dans les phases ultérieures de croissance du calcul initié. Ce mécanisme comporte principalement des protéines [10].

Les interactions entre macromolécules et cristaux sont complexes et dépendent de plusieurs facteurs tels que le pH, la force ionique, la concentration en inhibiteurs de faible masse molaire comme le citrate, la concentration en promoteurs comme le calcium ou en électrolytes, en particulier le sodium, tous facteurs susceptibles de modifier la conformation de ces macromolécules, leur affinité pour les cristaux et leur efficacité à exercer leur action inhibitrice [10].

III.6 Rétention des particules cristallines

Cette étape peut être critique pour la formation de calculs rénaux. Elle est la première étape du processus lithiasique proprement dit à partir de laquelle des particules cristallines formées au cours des différentes phases de la cristallogenèse vont être retenues dans le rein ou dans les voies urinaires et vont croître pour former le calcul [13, 18].

Le temps de transit de l'urine à travers le néphron est trop court pour permettre à des cristaux isolés de former un calcul par simple croissance, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs tels que la rétention et l'agrégation des particules cristallines. En effet, l'interaction et l'adhésion de microcristaux d'oxalate de calcium monohydratés déjà nucléés dans la lumière tubulaire sur les membranes apicales des cellules tubulaires [19].

III.7 Croissance du calcul

La cinétique de croissance du calcul qui débute par la rétention cristalline se voit très variable et dépendante du niveau de sursaturation des urines. Lorsque la lithogenèse est due à des

fautes diététiques, son expression est intermittente dont l'augmentation du calcul se fait par poussées au gré des sursaturations urinaires. Lorsque le facteur est une maladie génétique, le calcul se développe de manière plus ordinaire dont de nouvelles particules retenues dans le rein sont à l'origine de nouveaux calculs qui grossissent généralement au même rythme que les premiers. Cela explique la différence de taille observée entre les calculs les plus anciens, généralement plus volumineux que les calculs récents. Parfois, pour des raisons anatomiques ou de flux urinaire, certains calculs ont la possibilité de capter de nouvelles molécules plus facilement que d'autres et vont alors croître plus rapidement [10, 20].

Lorsque la sursaturation est liée à une anomalie métabolique de forte amplitude, le calcul qui en résulte est généralement pur. Dans le cas contraire, il peut fixer des composants divers au gré des sursaturations urinaires ; ce qui explique le fait que la plupart des calculs urinaires renferment plusieurs espèces cristallines.

La croissance n'est pas le seul mode d'évolution spontanée que peut subir un calcul retenu dans les voies urinaires. En effet, d'autres phénomènes peuvent s'exprimer et conduire à des modifications de phases cristallines.

Ces phénomènes résultent de l'instabilité de certaines formes hydratées qui ont tendance à évoluer progressivement dans le temps vers des formes thermodynamiquement plus stables et moins hydratées. Ainsi, l'acide urique dihydraté, qui se forme facilement lorsque l'urine est très acide, se convertit peu à peu au sein du calcul en acide urique anhydre avec quelques remaniements morphologiques qui attestent ce processus de conversion. De même, la weddellite, sous certaines conditions, peut se transformer en whewellite. D'autres espèces cristallines sont concernées comme la struvite qui se transforme en newbérite en perdant son ammonium [10, 20].

IV. Méthodes d'analyse des calculs rénaux

Les techniques d'analyse qualitative et quantitative de routine des calculs sont peu nombreuses et appartiennent à trois groupes de techniques reposant sur la diffraction des rayons X, la spectroscopie de masse et l'analyse thermique [21].

Les techniques de diffraction des rayons X, fondées essentiellement sur l'étude des diagrammes de poudres, ont été historiquement les premières techniques appliquées à l'identification des constituants lithiasiques [22,23]. Cependant, les conditions pratiques de leur mise en œuvre et leurs limitations quant à la détection de composants mal cristallisés ou

très peu abondants induisent à l'emploi de techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformer de Fourier ou plus récemment, la spectroscopie Raman [24,25].

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier s'est imposée aujourd'hui comme la méthode de référence, pour l'analyse des calculs [26-28]. Ainsi, cette technique a fait la preuve de sa sensibilité pour détecter des constituants très peu abondants mais cliniquement importants par leur nature ou leur localisation au sein du calcul. Elle permet d'identifier les constituants minéraux et organiques, cristallisés ou amorphes, les médicaments, les composés exogènes (ligatures, corps étrangers) ainsi que les faux calculs constitués d'espèces variées [21]. La spectroscopie infrarouge permet aussi de quantifier les espèces cristallines présentes en utilisant les spectres d'absorption infrarouge [29].

Aux côtés de la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman, qui permet contrairement à l'infrarouge de transporter un faisceau laser à travers une fibre optique, pourrait dans les années à venir permettre de réaliser une analyse *in situ* de la composition du calcul pendant son traitement. Actuellement, les spectroscopies Raman permettent l'analyse *in vitro* des calculs [30,31].

L'analyse thermique, qui consiste à soumettre les échantillons de calcul à un gradient de température et à enregistrer les différentes phases de leur décomposition par la chaleur, spécifique des espèces cristallines présentes, a été appliquée dans certains laboratoires [32-34].

Cependant comme pour toute technique d'analyse fondée sur l'interprétation d'un diagramme ou d'une courbe, une expérience est nécessaire et les performances de la technique sont en partie conditionnées par l'expertise de l'utilisateur [35] car les logiciels de bases de données proposés par les constructeurs ont des performances limitées et insuffisantes pour une interprétation fiable et exhaustive des spectres de mélanges de constituants [3].

V. Différents types de calculs

La cristallisation dépend étroitement de la sursaturation des urines en produits cristallisables dont l'oxalate, le calcium, le phosphore, le magnésium, les bicarbonates, l'acide urique, la cystine et certains médicaments. En général, la classification des calculs urinaires tient compte de la composante majoritaire. En effet, et de façon très schématique on peut classer les calculs selon sept grandes catégories :

V.1 Oxalate de calcium

L'oxalate de calcium est le constituant le plus fréquent des calculs urinaires, il existe sous trois formes cristallines distinctes :

- L'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) : de formule chimique Ca $(COO)_2$ H_2O. Elle est typiquement cristallisée dans le système prismatique monoclinique et est la seule forme cristallisable au niveau de la papille. Ces calculs paraissent sous une structure plus ou moins mamelonnée ou muriforme et lisse en cristaux ovales [36-38].
- L'oxalate de calcium dihydraté (Weddellite) : de formule chimique Ca $(COO)_2$ $2H_2O$, et est cristallisée dans le système tétragonal bipyramidal. Ces calculs ont une structure spéculée, en cristaux bipyramidaux aplatis enchevêtrés, brillants translucides aux angles et crêts vifs. La Weddillite est plutôt calcium dépendante [38].
- L'oxalate de calcium trihydraté : elle se cristallise dans le système triclinique en forme d'aiguilles et est beaucoup plus rare que les deux précédentes. Cette forme est instable (elle se transforme en whewellite). Elle n'est donc pratiquement jamais majoritaire dans un calcul. Et comme le whewellite, il s'agit d'une espèce oxalo-dépendante [13,39].

V.2 Phosphate de calcium

Ces calculs représentent 15 à 20 % des lithiases urinaires. Cristallisés dans le système cubique, les cristaux de phosphate de calcium sont regroupés sous le terme apatite et leurs noms minéralogiques différents selon leur constitution chimique. On distingue : la carbapatite, le phosphate octocalcique pentahydraté, la brushite, la whitlockite et le phosphate amorphe de calcium carbonaté [40,41].

V.3 Struvite

Le phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté ou struvite, dite aussi lithiase d'infection, de formule chimique Mg (NH_4) PO_4 $6H_2O$. Elle se cristallise dans le système orthorhombique avec des cristaux en pyramide. C'est une espèce particulière par son lien étiologique extrêmement fort avec les micro-organismes uréasiques qui peuvent décomposer l'urée urinaire en ammoniac et en anhydride carbonique. En présence d'eau, il se forme des ions ammonium qui alcalinisent l'urine et des ions bicarbonates qui contribuent à la carbonatation des phosphates calciques. Ce contexte entraîne une sursaturation en struvite et en phosphates calciques, d'où la présence simultanée de plusieurs phosphates dans les calculs induits par une infection de ce type. Cette forme de lithiase touche 80 % des femmes particulièrement celles d'âge entre 20 à 35 ans [42].

V.4 Acide urique

Les calculs d'acide urique, dont la formule chimique est $C_5 H_4 N_4 O_3$, sont cristallisés dans le système orthorhombique avec des cristaux lamellaires en forme de losange dont les sommets sont plus ou moins érodés. Ces calculs représentent 10 à 20 % de l'ensemble des lithiases urinaires.

Dans les urines, la forme dihydratée est la plus répandue. Il s'agit d'une espèce relativement instable qui se transforme facilement en acide urique anhydre. Ce qui explique la prépondérance de celui-ci dans les calculs. Les deux grandes raisons biochimiques de formation des calculs d'acide urique sont l'hyperacidité permanente des urines et l'hyperuricurie. Les calculs à forte teneur en acide urique dihydraté sont, donc, des calculs témoignant d'une lithogenèse active.

70 à 80 % des cas surviennent chez l'homme, tandis qu'elle ne se voit guère chez la femme qu'à partir de la ménopause. La lithiase urique atteint surtout les sujets obèses et est caractérisée par une acidité urinaire constante [43].

V.5 Urates

A l'inverse de l'acide urique, les urates se forment en urines peu acides et même souvent de pH alcalin. L'urate d'ammonium anhydre est de loin l'urate le plus fréquemment identifié dans les calculs en raison de sa solubilité qui est environ 2,5 fois inférieure à celle de l'urate de sodium.

Par ordre décroissant de fréquence, on distingue par suite l'urate acide de sodium monohydraté, l'urate double de sodium et de potassium, l'urate de potassium et quelques urates plus rares liés à des facteurs de risque spécifiques comme, l'urate complexe d'aluminium, de magnésium et de potassium, observé chez des patients qui présentent des insuffisances rénales, dont les raisons manifestent une surcharge aluminique d'origine médicamenteuse [11, 43]. Le point commun nécessaire à la formation de ces divers urates serait l'existence d'une hyperuricurie.

La solubilité de tous les urates dépend de trois facteurs : la concentration en ions urate, le pH et la concentration du cation. Plus le pH augmente, plus la quantité d'ammonium nécessaire à la cristallisation de l'urate d'ammonium serait faible. Ainsi, il s'avère donc nécessaire de tenir compte de la teneur en cations de l'urine si l'on veut modifier efficacement la solubilité des ions urates en agissant sur le pH des urines [44].

V.6 Cystine

Elle représente 1 % des lithiases urinaires. Elle est observée essentiellement chez l'adulte (et environ 10 % de cas observés chez l'enfant). Elle est de formule chimique $C_6 H_{12} N_2 O_4 S_2$ et cristallise dans le système hexagonal. Il s'agit d'une maladie héréditaire, caractérisée par un défaut de réabsorption tubulaire rénale de la cystine et des acides aminés basiques (ornithine, lysine, arginine). La cystine est peu soluble dans l'eau et sa concentration excessive dans les urines conduit à la formation répétée des calculs [11].

V.7 Calculs médicamenteux

Environ 1,5 % des calculs présentent une cause médicamenteuse. Les principales causes sont les traitements prolongés sur plusieurs années et les traitements poly-médicamenteux qui peuvent induire des modifications de l'éruption rénale. Toute substance médicamenteuse peu soluble en milieux aqueux telles que les sulfamides, glafénine, triamtérène, allopuriol et l'indinavir sont susceptibles de cristalliser. Les médicaments peuvent être impliqués directement dans le processus de cristallisation, comme ils peuvent contribuer simplement à la croissance de lithiases préexistantes [5,45].

VI. Symptomatologie de la lithiase rénale

La lithiase rénale compliquée se manifeste habituellement par une douleur dite colique néphrétique (CN) ou plus rarement par une infection urinaire ou une hématurie.

VI.1 Colique néphrétique (CN)

La CN est une affection douloureuse lombo-abdominal résultant de la mise en tension brutale de la voie excrétrice du haut appareil urinaire en amont d'une obstruction, quelle qu'en soit la cause [45,46].

La CN lithiasique, liée à un calcul urinaire, représente 75 à 80 % des causes de coliques néphrétiques [47] et celle-ci survient le plus souvent tout au début de la journée [48].

VI.2 Hématurie

C'est la présence de sang en quantité anormale dans les urines. Normalement il ne doit pas y avoir plus de 10 globules rouges par mm^3 d'urine ou pas plus de 10000 globules rouges par millilitre d'urine. Si ce taux est dépassé, on parle d'hématurie microscopique. Pour des taux encore supérieurs, le sang peut être visible à l'œil nu dans les urines avec souvent des caillots sanguins : on parle d'hématurie macroscopique. L'hématurie macroscopique, en rapport avec un calcul urinaire, est souvent totale [49].

VI.3 Infection urinaire

L'infection urinaire se définit par des signes biologiques et par des signes cliniques. La définition biologique repose sur l'examen cytobactériologique des urines (ECBU) suite auquel on mettra en évidence un ou deux germes au maximum, en nombre supérieur à 100000 / ml d'urine et des globules blancs en nombre supérieur à 10 / mm^3 d'urine ou à 10000 / ml d'urine.

Les signes cliniques de l'infection urinaire dépendent du siège du calcul et de la partie de l'appareil urinaire qui sera intéressée par cette infection. Lorsque le calcul est situé dans le bas appareil urinaire les signes sont ceux de la cystite avec brûlures mictionnelles. Chez l'homme, une cystite peut se compliquer d'une prostatite à l'origine d'une fièvre à 39 - 40 ° C.

En cas de calcul situé dans le haut appareil, des signes de cystite peuvent être notés mais surtout l'infection urinaire donnera des signes de pyélonéphrite avec syndrome infectieux général : fièvre, frissons et des douleurs lombaires spontanées ou à la percussion lombaire [50].

VI.4 Anurie

L'anurie est définie par l'arrêt total de la diurèse. Il s'agit d'une urgence médicale car elle expose le patient à des conséquences métaboliques qui mettent rapidement en jeu le pronostic vital. Elle peut être expliquée par trois mécanismes : calcul sur rein unique, obstacle bilatéral et l'anurie d'origine septique [51].

VII. Techniques d'élimination des calculs

Les calculs rénaux sont des cristallisations de sels minéraux qui se forment dans les reins ou les voies urinaires, dont l'évacuation s'effectue naturellement. Mais lorsqu'ils sont de taille importante, ils peuvent parfois rester bloqués. C'est en bouchant les conduits urinaires que les calculs rénaux déclenchent des crises très douloureuses. Il est nécessaire d'intervenir en urgence pour soulager la douleur et éviter les complications liées à cette obstruction des voies urinaires par un calcul rénal. Parfois, les calculs restent à l'intérieur du rein, où ils ont tendance à grossir progressivement. Cela peut aussi endommager le rein de façon irréversible. Pour toutes ces raisons, il est souhaitable de prévenir leur formation ; et dans le cas où ils se manifestent par des signes cliniques cités auparavant comme douleurs, hématurie ou anurie, il devient plus que nécessaire de les extraire. Pour cela, il existe plusieurs techniques d'élimination des calculs rénaux.

VII.1 Lithotripsie extracorporelle (LEC)

La LEC consiste à envoyer des ondes de choc depuis l'extérieur du corps sur un calcul pour le fragmenter s'il n'est pas trop dur. Ces ondes de choc sont produites par un générateur et sont dirigées sur le calcul par un système de visée à repérage radiographique et/ou échographique.

L'intervention nécessite une anesthésie locale et peut se réaliser en ambulatoire. Certains fragments étant susceptibles d'aller se loger un peu plus loin et de grossir à nouveau avec un risque de déclencher une nouvelle colique néphrétique, il est parfois nécessaire de poser une sonde entre le rein et la vessie, afin de faciliter l'évacuation des fragments par les voies urinaires [52].

VII.2 Néphrolithotomie percutanée (NLPC)

La NLPC consiste à introduire directement dans le rein un appareil permettant de fragmenter et d'enlever le ou les calculs. Selon la position du calcul dans le rein ou dans les voies urinaires hautes, s'il présente une taille importante ou s'il résiste à la lithotripsie, il s'avèrera nécessaire d'opérer pour l'extraire. En effet, s'il est de taille importante, le calcul rénal est fragmenté sur place au laser. Si le calcul a été fragmenté, il arrive que la pose d'une sonde soit nécessaire afin de faciliter son évacuation [53].

VII.3 Urétéroscopie

Cette opération a l'avantage de ne nécessiter aucune incision. Elle consiste à aller chercher le calcul en passant par les voies naturelles. L'intervention consiste à introduire dans l'uretère un appareil appelé urétroscope. Cet instrument optique mesure environ 3 mm de diamètre et permet de travailler sous contrôle de la vue. Il contient un canal de travail à travers lequel divers instruments sont introduits. Certains urétéroscopes sont métalliques et rigides, d'autres sont flexibles. Le choix de l'instrument sera fait par l'urologue en fonction de différents paramètres [54].

VII.4 Chirurgie

La chirurgie est de moins en moins utilisée. Les calculs rénaux sont extraits après ouverture du bassinet (pyélotomie) ou du parenchyme rénal (néphrotomie). Les calculs urétéraux sont extraits par incision urétérale (urétérotomie). Dans tous les cas, les urines sont drainées transitoirement par une néphrotomie ou par une sonde urétérale (type sonde double J). Les calculs nécessitant un acte chirurgical sont les calculs coralliformes du rein, les calculs volumineux enclavés dans l'uretère et les échecs des autres techniques. Les complications sont pariétales (infection, hématome), thrombo-emboliques et urologiques [55].

VIII. Conclusion

La connaissance des grandes étapes de la lithogenèse, aide beaucoup à comprendre les facteurs qui conduisent à la formation des calculs chez un patient donné afin de proposer des mesures préventives, diététiques ou thérapeutiques adaptées.

La connaissance de la lithogenèse sert aussi à proposer des traitements plus sélectifs en fonction de la nature des constituants lithiasiques et des causes de sursaturation identifiées lors des explorations biologiques.

Les effets indésirables de la médecine conventionnelle dans le traitement de la lithiase rénale ainsi que les systèmes de soins de santé qui sont devenus de plus en plus chers ont déjà détourné l'attention des personnes vers des traitements à base de plantes.

Actuellement les plantes possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés et spécialement celle des différentes substances actives qu'elles contiennent. Leurs extraits peuvent avoir des propriétés biologiques et pharmacologiques.

CHAPITRE II :

Substances végétales bioactives et méthodes d’extraction

I. Introduction

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme a utilisé les plantes pour se soigner. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations (égyptiens, grecs, chinois etc.) de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Les extraits de plantes étaient déjà connus et utilisés en médecine traditionnelle. Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique à des substances, dites alors actives, qu'elles renferment. Il est néanmoins important de noter que la nature active de ces composés peut engendrer des effets bénéfiques, aussi bien que des effets néfastes, sur les organismes vivants.

II. Molécules bioactives issues de métabolites primaires et secondaires

On distingue chez les plantes les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

- Les métabolites primaires sont les molécules indispensables à la vie et commune à toutes les espèces : glucides, lipides, protéines.
- Les métabolites secondaires sont les précurseurs de tous les composés organiques, ils diffèrent selon les espèces. Leurs rôles sont encore mal connus, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement. Ces composés servent à la défense contre des prédateurs ou des agents pathogènes, à la prédation, à l'adaptation de la plante à son environnement, à la communication, etc. Ils représentent les éléments essentiels de la coévolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments [56].

II.1 Métabolites primaires

II.1.1 Glucides

Les glucides sont des constituants universels des organismes vivants. Ils sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites.

Chez les végétaux, on les retrouve sous différentes formes [57] :

- Comme éléments de soutien, participant à la structure de l'organisme (cellulose et autres polysaccharides pariétaux) ;
- Comme réserves énergétiques, sous forme de polymères (amidon) qui stockent l'énergie solaire captée par le processus de la photosynthèse ;

- Comme constituants de métabolites variés : acides nucléiques et coenzymes, mais aussi hétérosides multiples dont le rôle n'est que rarement connu ;

II.1.2 Acides aminés

Les acides aminés sont des métabolites indispensables comme éléments constitutifs des protéines structurales et enzymatiques. Ces métabolites primaires polaires participent au maintien et à la survie de l'espèce [56].

II.1.3 Lipides

Les lipides sont des substances naturelles, esters d'acides gras et d'un alcool ou d'un polyol. Ces substances sont hydrophobes et parfois amphiphiles. Ils ont une solubilité totale dans les solvants organiques, non volatiles. On parle ainsi d'huile « fixe », par opposition aux huiles « essentielles ». On distingue habituellement :

- Les lipides simples : ester d'acides gras et d'un alcool qui peut être :
  - Le glycérol constitutif des triacylglycérols ou triglycérides,
  - Un alcool aliphatique de masse moléculaire élevée, constitutif de cérides ;
- Les lipides complexes : phospholipides, glycolipides. Ils jouent un rôle fondamental dans les organismes vivants, en particulier comme constituants membranaires aux applications pharmaceutiques ou industrielles [57].

II.2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se trouvent dans toutes les parties des plantes, ce sont des molécules essentielles à la vie des plantes et leur interaction avec l'environnement. Ils sont également des sources importantes pour les produits pharmaceutiques, les additifs alimentaires, les arômes etc.

La concentration de ces molécules dans les différentes parties des plantes est influencée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, l'intensité lumineuse, l'eau, les sels minéraux et le CO_2 [58,59].

En raison de l'importance des métabolites secondaires, de nombreuses études ont été menées afin d'améliorer la croissance des végétaux et d'augmenter la production de ces molécules.

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux : les composés phénoliques, les composés terpéniques et les alcaloïdes.

Chacune de ces catégories comporte une vaste diversité de composés qui bénéficient d'une large gamme d'activités.

II.2.1 Composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié un ou plusieurs groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside, etc. Ils ont une solubilité pour les solvants polaires et contiennent le plus de molécules et ont une grande distribution dans le règne végétale, avec plus de 8000 structures phénoliques trouvées [56,60].

On les trouve dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, feuilles, tiges, fleurs, fruits et graines) et ils interviennent dans plusieurs processus physiologiques comme la germination des graines, la croissance cellulaire, la maturation des fruits ou la rhizogenèse [61].

Les polyphénols sont des antiseptiques, des antalgiques et des anti-inflammatoires. Ils offrent également, pour la santé humaine, une protection contre certaines maladies impliquant un stress oxydatif, comme les cancers et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [62].

Les plantes en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Il existe une très grande variété de phénols, allant de composés simples à des substances plus complexes. Les phénols sont des anti-inflammatoires et des antiseptiques. Leur présence dans les tissus animaux est généralement due à l'ingestion d'aliments d'origine végétale [63].

Les classes principales de composés phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxy-cinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [64,65].

II.2.1.1 Tanins

Les tanins sont des substances poly-phénoliques qui ont une variété structurelle, de saveur astringente, ayant en commun la faculté de tanner la peau (Figure 1). Cette propriété est due à la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 [56]. Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées [66]. Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [67].

Grâce à leurs propriétés astringentes, les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes [68].

On distingue deux groupes de tanins différents selon leurs origines biogénétiques ou leurs structures : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [56].

- **Tanins hydrolysables** : sont des oligo ou des polyesters d'un sucre, (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est généralement le glucose. L'acide-phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ; acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques [68].
- **Tanins condensés** : sont des polymères flavanoiques constitués d'unités flavan-3-ols le plus souvent épicatéchine et catéchine. Leur structure, voisine de celle des flavonoïdes, est caractérisée par l'absence de sucre [69].

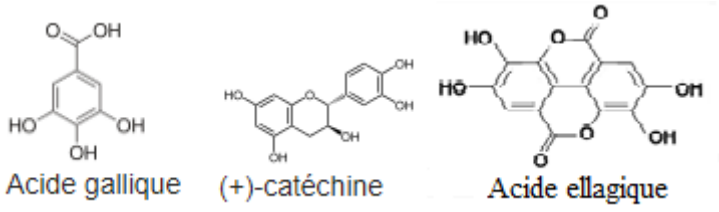


Figure 1: Structures de quelques tanins

II.2.1.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits qui ont une large distribution dans le règne végétal. Ils sont, entre autres et pour certains, responsables de la coloration des fruits, des feuilles et parfois des fleurs, et sont presque toujours hydrosolubles. Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet B [56,66].

Ils peuvent aussi participer à la résistance des végétaux aux maladies. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchainement 2-phénylchromane [69].

Les flavonoïdes interviennent pour protéger les plantes des herbivores et contrôler le transport des auxines [70]. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation et agissent sur les vaisseaux sanguins sous

forme d'activité vitaminique « P ». Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale [71-73].

Certains travaux suggèrent que les flavonoïdes posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène [74-80]. L'hespéridine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive par voie orale), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'œdème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran [81].

Les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes et piégeuses de radicaux libres comme démontrés par plusieurs travaux de recherche [82-86]. Cette propriété est décrite selon la réaction suivante :

$$\text{Flavonoïde (OH)} + R^{\bullet} \rightarrow \text{flavonoïde } (O^{\bullet}) + RH$$

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence [87-93].

Les flavonoïdes sont répartis en différentes classes de molécules : plus de 6400 structures ont été déterminées. Les classes les plus importantes des flavonoïdes sont : isoflavandiols, flavones, flavanols, aurones, flavondiols, anthocyanins et les chalcones (Figure 2) [94].

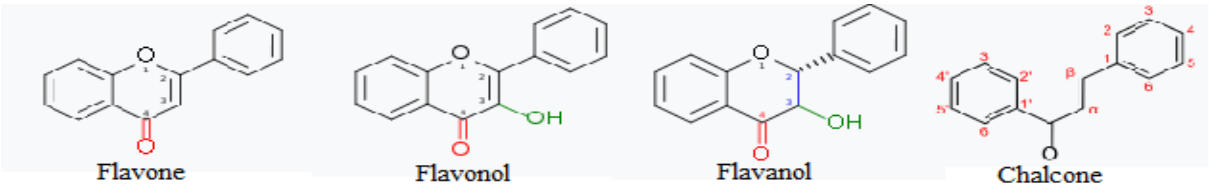


Figure 2: Structures de quelques Flavonoïdes

II.2.1.3 Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C_6-C_3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo-α-pyrone (Figure 3) [95] et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle.

Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre soit combinées avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [96]. Les coumarines libres sont solubles dans les solvants organiques ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau.

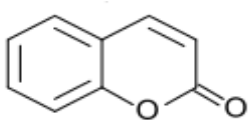


Figure 3: Structure de coumarines

Les coumarines ont de nombreuses propriétés biochimiques et pharmacologiques. L'activité de ces molécules dépend de la structure et de la nature des substituants [97,98]. La majorité des coumarines et leurs dérivées ont été soumises à de profondes investigations afin d'évaluer leurs effets sur la santé humaine. Les recherches ont montré qu'elles peuvent être des agents anti HIV, antitumoraux [99], anticancéreux, antimicrobiens [100,101], anti-inflammatoires [102,103], antifongiques [104], antioxydants [105] et même vasodilatateurs [106].

D'autres études ont d'ailleurs confirmé l'activité insecticide et larvicide des furocoumarines [107,10]. Ces derniers possèdent des propriétés photo toxiques, utilisées pour la protection des plantes contre les herbivores, les insectes et les microorganismes pathogènes [109].

II.2.1.4 Saponosides

Les saponosides sont des glycosides contenus dans les plantes. Ils possèdent des propriétés tensio-actives grâce à leur dissolution dans l'eau permettant la formation de solutions moussantes [110]. Structuralement, les saponosides peuvent être classés en deux groupes suivant la nature de leur génine :

- Saponosides à génine stéroïdique, presque exclusivement présents chez les Angiospermes monocotylédones ;
- Saponosides à génine triterpénique : de loin les plus nombreux. Ils existent chez quelques animaux marins et quelques Ptéridophytes. Pratiquement inexistants chez les Gymnospermes, on les rencontre, essentiellement chez les Angiospermes Dicotylédones.

Les saponosides ont un large éventail de propriétés, qui incluent leur goût doux et amer [111-113], des propriétés émulsifiantes à travers leur capacité de former des mousses [114] et des propriétés pharmacologiques telles que les effets analgésiques et antidépresseurs d'extraits méthanoliques de quelques espèces appartenant au genre Zygophyllym [115], des propriétés hémolytiques. Ainsi que des activités antimicrobiennes, insecticides, molluscicides [116,117]. Les saponosides ont de nombreuses applications, on les retrouve dans les boissons et les confiseries, ainsi que dans les cosmétiques [114, 118, 119] et dans les produits pharmaceutiques [117].

II.2.1.5 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée voire rouge. Malgré l'identification de plus de 600 caroténoïdes spécifiques, seuls un nombre limité d'entre eux sont présents en quantité sensible dans le sang et les tissus humains [120]. Les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O_2Cela leur permet d'employer une protection contre les dommages produits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [121].

L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure. Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROO·, R·) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (Figure 4) [122-124].

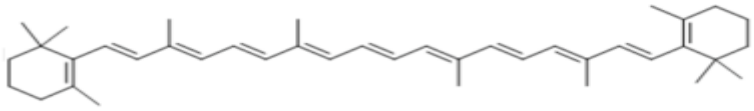


Figure 4: Caroténoïdes : Structure du β-carotène

Les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies [124]. L'effet bénéfique des caroténoïdes a été démontré dans des cas de maladies de l'œil dont la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), de l'érythème induit par la lumière, pour la réduction de l'incidence de maladies associées au syndrome métabolique (inflammation du tissu adipeux, maladies cardiovasculaires) et de certains cancers [125-129].

Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire, dans la protection de la stabilité génomique et dans la fertilité (ex : accumulation dans le corpus luteum des ovaires) [130].

II.2.2 Composés terpéniques

La très grande majorité des terpènes sont spécifiques du règne végétal même si on peut les rencontrer chez les animaux. Tous les terpènes sont formés par l'agglomération d'une ou plusieurs unités penta carbonées ramifiées dérivées de l'isopentényl pyrophosphate (Figure 5).

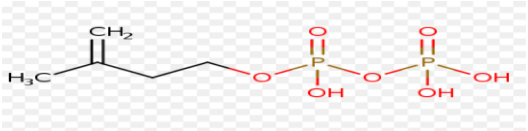


Figure 5: Structure de base des terpènes

Les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée des composés organiques des végétaux, avec près de 15.000 structures moléculaires connues. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui les composent ainsi que dans les divers modes d'assemblage. On distingue ;

- Les monoterpènes à 10 atomes de carbone ;
- Les sesquiterpènes à 15 atomes de carbone ;
- Les diterpènes à 20 atomes de carbone ;
- Les triterpènes à 30 atomes de carbone ;
- Les tétraterpènes à 40 atomes de carbone ;
- Les polyterpènes [56].

II.2.2.1 Monoterpènes

Ce sont les constituants les plus simples des terpènes (à l'exception des hémiterpènes rares). Ils sont issus du couplage de deux unités isopréniques de formule brute $C_5 H_8$. On en connait plus d'un millier. Lorsqu'ils sont de structure « régulière », ils sont les éléments habituels des huiles essentiels (HE). De structure « irrégulière », ils participent à la formation des pyréthrines et à la composition de certaines HE d'Astéracées. Tandis que cyclisés en méthylcyclopentanes, ils constituent les iridoîdes. La plupart des monoterpénoides existent à l'état libre.

Si l'on connaît une quarantaine de squelettes monoterpéniques, la grande majorité des structures décrites se rattache à un petit nombre d'enchainements de base issus du couplage tête-à-queue de deux unités en C5 en géranyl-pyrophosphate (GPP) et qui peuvent être :

- Acycliques (myrcane ou 2,6-diméthyloctane, séco-iridane) ;
- Monocycliques (p-menthane, iridane, etc.) ;
- Bi- et tricycliques (carane, pinane, bornane, thuyane, etc.) [56].

II.2.2.2 Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont une classe de terpènes formée de 3 unités isopréniques et de formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurelles : acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique et polycyclique. Un très grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des HE des végétaux et peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles [69].

II.2.2.3 Diterpènes

Les diterpènes forment une classe très vaste de molécules issues du géranylgéranyl-pyrophosphate. Ils sont rencontrés essentiellement chez les végétaux, préférentiellement dans certaines familles comme les Astéracées, même si quelques-uns sont ubiquitaires, comme les gibberellines, qui jouent le rôle d'hormones végétales. Leurs structures sont très variables, ils peuvent être linéaires ou contenir un ou plusieurs cycles. Ils sont apolaires. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique.

Parmi les diterpènes linéaires, on rencontre la famille Phytane dont le phytol est le représentant le plus connu dans la chlorophylle ou dans les vitamines K et E.

Les diterpènes cycliques quant à eux sont des dérivés de cyclophytane. Le rétinol et le rétinal, deux formes de la vitamine A, sont les plus connus de cette famille [131].

La forte toxicité de certains d'entre eux en fait parfois une piste intéressante pour la recherche d'agents anticancéreux [56].

II.2.2.4 Triterpènes

Les triterpènes sont des composés en C_{30} issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3 dihydro-squalène ou, plus rarement, du squalène lui-même. Plus de 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents sont connus à la fin du XX^{ème} siècle.

Presque toujours hydroxylés en C_3 (du fait de l'ouverture de l'époxyde), les triterpènes présentent une très forte unité structurale : les différences majeures sont d'ordre configurationnel et sont liées à la conformation adoptée par l'époxysqualène ou le squalène avant la cyclisation. Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1,2 de protons et de méthyles rationalisant l'existence des différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe. L'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel des triterpènes en font un groupe de métabolites secondaires de première importance [69].

II.2.3 Alcaloïdes

Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels. Initialement, ils sont définis comme des substances azotées, basiques ou amers, d'origine naturelle et de distribution restreinte.

Les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative.

Ils existent à l'état de sels et ils sont formés à partir d'un acide aminé. Ces éléments caractérisent ce qu'on appelle les alcaloïdes vrais, que l'on distingue souvent des proto-alcaloïdes et des pseudos-alcaloïdes, mais les limites sont parfois subtiles [56].

Si dans les plantes, les alcaloïdes, en tant que composés du métabolisme secondaire, jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils trouvent également plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme [132-134] :

- ✓ Antitumoraux : vincaleucoblastine, vincristine, taxol, camptothecin,
- ✓ Antalgiques : morphine, codeïne,
- ✓ Spasmolytiques : tubocurarine et papaverine,
- ✓ Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine,
- ✓ Emétiques : émétine,
- ✓ Antitussifs : codéine,
- ✓ Antiarythmiques : quinidine et ajmaline,
- ✓ Antipaludiques : quinine,
- ✓ Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine.

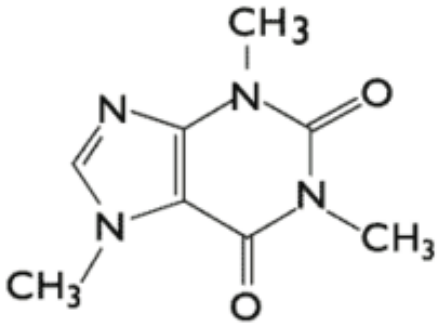


Figure 6: Alcaloïdes : Structure de la caféine

III. Méthodes d'extraction des substances végétales bioactives

Les différentes techniques d'extraction des substances bioactives des plantes doivent, tenir compte de leurs caractéristiques. Elles sont basées sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques seront présentées selon le principe sur lequel elles se basent.

III.1 Huiles essentielles

La norme AFNOR définit une huile essentielle comme « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation ». (*AFNOR NF T* 75-006)

Les huiles essentielles, appelées aussi « essences », sont des substances volatiles et odorantes sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation [135]. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Les HE sont présents dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire [136]. Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agroalimentaires [137].

Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans une région particulière de la plante telle que les feuilles, les écorces ou les fruits. Et généralement quand elles se produisent dans divers organes de la même plante, elles présentent des compositions chimiques différentes [138].

Il existe plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles. Elles peuvent être extraites par simple pression à froid, par distillation, ou par solvant volatil ou fluide supercritique comme le dioxyde de carbone. La distillation par entrainement à la vapeur d'eau (alambic) est le procédé le plus pratiqué dans l'industrie. Les huiles essentielles obtenues sont des produits généralement peu polaires, volatils, odoriférants et généralement moins dense que l'eau. Elles sont solubles dans la majorité des solvants organiques et peu solubles dans l'eau.

III.1.1 Entrainement à la vapeur d'eau '*ex-situ*'

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Ce mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique « huile essentielle ».

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [139].

III.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau '*in-situ*'

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien, le plus utilisé et le plus rentable. Cette méthode consiste à porter à ébullition un mélange d'une partie de la plante et de l'eau. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Sous l'action de la chaleur, les cellules éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils.

La vitesse de vaporisation des composés volatiles des plantes aromatiques et médicinales (PAM) par l'hydrodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau [140,141]. La vapeur d'eau formée entraine les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant. La condensation de ce mélange gazeux, provoque sa séparation en deux phases liquides :

- Une phase liquide huileuse et très odorante, appelée huile essentielle, contenant la majorité des composés odorants.
- Une phase aqueuse, odorante, appelée eau aromatique, qui n'en contient que très peu.

Cependant, cette technique présente parfois des inconvénients non négligeables, dont le plus important est un risque de discrimination des composés les plus volatils par dégradation thermique ou par hydrolyse [56].

III.1.3 Expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange, …) sont pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'originale. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, incision perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau [56,142].

L'avantage de cette technique est sans doute son faible coût de production ainsi que le fait que l'essence obtenue après écrasement des fruits ne nécessite qu'une filtration pour obtenir un

produit commercialisable. Néanmoins, elle nécessite une énergie mécanique et est limitée aux agrumes.

III.1.4 Enfleurage

Cette méthode est adoptée pour l'extraction des huiles essentielles contenues dans les cellules de la corolle des fleurs. Elle consiste à éparpiller les fleurs sur une surface spécialement préparée avec de la graisse appelée corps. Ces graisses, grâce à leur pouvoir d'absorption, vont fixer les constituants de parfum que le végétal libère dans le milieu ambiant. Les essences sont récupérées par dissolutions dans l'éthanol.

III.1.5 Extraction assistée par micro-ondes

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. La distribution de la température interne d'une matière soumise à l'échauffement classique est limitée par sa conductivité thermique, alors que dans le chauffage par micro-ondes tous les éléments de cette matière sont chauffés individuellement. Par conséquent, le temps nécessaire pour le chauffage par micro-ondes est réduit [143].

Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entrainées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [144]. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie considérables [145].

III.1.6 Hydrodistillation assistée par ultra-sons

Méthode simple, efficace et peu couteuse, elle offre une augmentation du rendement d'extraction. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante « pré » ou « post » opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons [146]. Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HE. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement.

III.1.7 Extraction au CO_2 supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé : le CO_2 supercritique. Au-delà du point critique (pression = 73,8 bars et température = 31,1 ° C), le CO_2 possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction des HE.

La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO_2 supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO_2 s'évapore et il ne reste plus que l'HE.

En jouant sur les conditions de températures et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective. Pour extraire les composés volatils uniquement, il ne faut pas dépasser certaines conditions de températures et de pression (60 °C et 60 bars) [144].

Cette technique permet d'éviter la dégradation des composés thermosensibles offrant ainsi une huile de qualité supérieure [147, 148].

III.2 Extraits de plantes

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique.

Il existe plusieurs techniques d'extraction de produits de haute valeur ajoutée. Ces techniques peuvent être soit conventionnelles (utilisées depuis longtemps) ou récentes (développées actuellement) [149].

III.2.1 Infusion

Cette dernière est nécessaire si l'on utilise les parties fragiles de la plante (telles que les fleurs, sommités fleuries). Le procédé consiste à recouvrir la plante d'eau bouillante et à laisser refroidir. Après on filtre et on consomme [150].

III.2.2 Décoction

La décoction repose sur la mise à ébullition de la plante et l'eau pendant une durée de 15 à 30 minutes. Une variante est aussi possible dans laquelle on jette la plante dans l'eau bouillante et on laisse frémir. Le résultat obtenu est le décocté.

Cette méthode est assez violente et peut détruire certains composants organiques. Elle est donc adaptée pour des drogues de consistance dure voir très dures (bois, racines, écorces, fruits durs ou tiges), notamment celles qui renferment des tanins [151].

III.2.3 Macération

La macération consiste à maintenir en contact le matériel végétal avec un solvant à température ambiante sous agitation pendant des heures voire des jours (le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre). Cette méthode permet une extraction douce des principes actifs, surtout lorsqu'ils sont thermolabiles.

Cette méthode nécessite une filtration après extraction. Plusieurs extractions sont parfois nécessaires pour pouvoir faire passer le maximum de composés contenus dans la plante vers le solvant. Cette opération conduit à l'utilisation d'une grande quantité de solvant.

L'inconvénient principal de ce mode de préparation est le risque de contamination bactérienne du produit final en l'absence d'ébullition. Le macérât est la tisane la plus longue à obtenir et qui se conserve le moins longtemps [141].

III.2.4 Extraction par Soxhlet

C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quelle que soit la matrice végétale.

Ses inconvénients les plus significatifs de cette méthode sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé). Par ailleurs, l'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques, ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable [147].

III.2.5 Extraction assistée par Ultra-sons

Méthode simple, efficace et peu couteuse. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. L'extraction par ultra-sons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultra-sons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à

l'atténuation des ondes ultra-sonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité de l'émetteur d'ultrasons [144].

Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus. L'étape limitante est la filtration et le rinçage après l'extraction [152].

III.2.6 Extraction accélérée par solvants

L'extraction accélérée par solvants (EAS) est une technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures variables (50 – 200 °C) et des pressions élevées (100 – 150 bars). La pression est maintenue assez élevée pour garder le solvant à l'état liquide à température élevée.

Pendant l'EAS, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques [144]. Les avantages de cette technique comparée aux techniques conventionnelles, sont les suivants : on évite les échauffements locaux et on consomme de plus petites quantités de solvant en comparaison à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation.

Ses inconvénients sont liés à sa non-sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits [144, 153]. Par ailleurs, les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles [140].

IV. Méthodes d'analyses

La complexité des extraits de plantes nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules.

Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation et l'identification des produits naturels tels que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS). La chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la HPLC couplée avec la MS (HPLC/MS) [154-155].

IV.1 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La GC est une technique qui permet de séparer les molécules organiques d'un mélange complexe. Elle a été employée pour l'analyse et l'identification des composés volatils.

Outre les composés volatils, la GC est particulièrement adaptée à l'analyse de molécules de faible poids moléculaire et/ou à caractère hydrophobe facilement volatilisable et thermiquement stable.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur.

Ainsi cette technique peut être couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à un détecteur de spectrométrie de masse [154].

IV.2 Couplage GC/MS

En chimie analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la GC avec un spectromètre de masse (MS).

En effet, cette technique est très utilisée pour analyser et identifier les composants des huiles essentielles. La méthode réside en un bombardement, à l'aide d'électrons, d'une molécule préalablement éluée sur la colonne capillaire qui va être divisée. Les fragments obtenus ont une charge positive et constituent le spectre de masse de la molécule. Cela permet d'identifier un composé en faisant une comparaison entre son spectre et ceux des composés compris dans des bibliothèques de spectres [155].

IV.3 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

D'une manière générale la HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultra-violet visible (UV-vis), MS et résonance magnétique nucléaire (RMN) [154].

V. Conclusion

L'intérêt pour les plantes médicinales comme nouvelles sources de médicaments pour de nombreuses pathologies telles que la lithiase rénale est en hausse continuelle grâce à leurs métabolites secondaires qui peuvent servir pour la création de médicament ou phyto-

médicament. En raison de l'importance des métabolites secondaires, de nombreuses études de recherche ont été menées afin d'améliorer la croissance des végétaux et d'augmenter la production de ces molécules.

Le médicament végétal, originaire de la matière vivante, est généralement mieux toléré par l'organisme que de nombreuses substances de synthèse, physiologiquement très actives, mais dont les effets secondaires sont parfois imprévisibles.

CHAPITRE III :

Méthodes de sélection des plantes objet de l'étude

Méthodes de sélection des plantes objet de l'étude

I. Différentes méthodes de dépistage de l'activité biologique des végétaux

Le règne végétal constitue une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement ou pouvant servir comme molécule guide pour le développement de nouveaux agents comme principe actif thérapeutique et trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications pour ces substances tant dans les domaines pharmaceutiques que cosmétiques.

Afin de rendre la stratégie d'isolement plus efficace, il convient de sélectionner convenablement les plantes considérées. Cette sélection a été guidée par :

- L'usage traditionnel connu et fréquent des différentes espèces par les populations autochtones ;
- La nécessité de valoriser et conserver nos phyto-ressources ;
- La quête de nouvelles molécules à des fins thérapeutiques ;
- L'intérêt pour les plantes médicinales comme nouvelles sources de médicaments pour de nombreuses pathologies ;
- La richesse en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes, HE…) sachant que ces derniers sont produits exclusivement par les plantes.

Lorsqu'on veut déceler dans la nature des substances susceptibles de développer une activité biologique, deux voies distinctes de recherche peuvent être empruntées [156,157] :

I.1 Première voie

La première voie consiste à procéder au dépistage chimique de molécules ou de classes de molécules dans les plantes d'un territoire dont le choix se fait en fonction de déterminations ou de circonstances particulières (richesse de la flore dans l'aire retenue, biodiversité peu étudiée, facilité d'accès à la région, etc.) sans autres critères de sélection que ceux se rapportant à l'identité botanique des taxons.

Ce dépistage peut être systématique (toutes les plantes d'une aire délimitée à l'avance, toutes les espèces ligneuses ou au contraire toutes les herbacées, tous les champignons, etc.) ou aléatoire (c'est-à-dire portant sur un ensemble de plantes collectées au hasard). L'idée de base étant qu'il existe toujours une certaine probabilité de trouver, dans une grande série d'échantillons végétaux, des molécules susceptibles d'intéresser les pharmacologues.

Cette méthode (*random sampling*) a l'inconvénient de nécessiter la mobilisation de gros budgets. On peut essayer d'en réduire les coûts en la combinant avec une approche

chimiotaxinomique : les espèces ciblées seront alors choisies dans des genres ou des familles connues pour renfermer certaines classes de structures chimiques. Cette variante de méthode qui se fait assister par la chimiotaxonomie (*chemotaxonomic sampling*) ou (*phylogenetic targeting*) ne fait pas appel à l'anthropologie pour la sélection des données de terrain.

La technique moderne dite de « criblage à haut débit » (*high throughput screening*, HTS), largement utilisée aujourd'hui par l'industrie pharmaceutique, fait partie aussi des méthodes non ethno pharmacologiques. Elle consiste à analyser systématiquement des végétaux non répertoriés ethno botaniquement afin de déceler à terme, dans un rapport temps/coût/résultats acceptable, une nouvelle molécule active ou, au moins, un nouveau chef de file structural qui conduira à des développements intéressants. Cette technique permet de tester plusieurs extraits (ou fractions d'extraits) de plantes de façon extrêmement rapide, tellement rapide que le problème des utilisateurs du HTS est désormais de trouver suffisamment de matériel végétal à soumettre aux automates pour que l'investissement puisse être rentabilisé.

Mais l'inconvénient principal de cette technique, outre son coût élevé, c'est de courir le risque de passer à côté d'activités pharmacologiques s'écartant de l'axe de recherche du laboratoire qui a commandé le criblage. Elle peut aussi ignorer des molécules actives trop peu concentrées dans les extraits pour réagir positivement à des tests standardisés.

I.2 Deuxième voie

La seconde voie s'attache à sélectionner un ensemble de plantes supposées biologiquement actives en suivant comme fil conducteur les usages adoptés dans les cultures vernaculaires (*ethnodirected sampling*). Cette méthode guide aujourd'hui les travaux d'un grand nombre de chercheurs intéressés par des thèmes particuliers *Balick* [158], qui cherchait dans la nature des substances à activité antivirale, a démontré que cette approche ethno-orientée possédait un meilleur rendement que les méthodes aléatoires en termes de productivité, de nouveautés et de coût. Partant d'une démarche analogue, *Cox* [159] arrive à la même conclusion.

Après un demi-siècle d'expérimentation, le bilan de cette méthode est globalement positif. Plusieurs nouveautés produites ces dernières décennies par l'industrie pharmaceutique sont issues d'enquêtes menées auprès des populations autochtones.

Au nombre des végétaux qui ont conduit à des médicaments intéressants, citons trois espèces emblématiques très exploitées aujourd'hui : *Centella asiatica*, *Gingko biloba* et *Prunus africana*.

Suite aux résultats obtenus, la méthode ethnopharmacologique, que plusieurs auteurs [160-165], ont contribué à faire connaitre, est très vite devenue un outil de travail essentiel dans la recherche de nouveaux médicaments.

Actuellement, dans certains pays en voie de développement comme le Maroc, la population fait souvent appel à l'utilisation d'extraits végétaux pour lutter contre différentes pathologies.

Plusieurs travaux [165-176] ont eu recours à cette seconde voie dans leurs enquêtes et recherches sur la flore marocaine. C'est dans cette voie et ce contexte que nous avons choisi de baser notre étude sur une enquête ethnopharmacologique dans la région de Fès-Meknès dans le but de déceler les plantes médicinales utilisées par la population de cette région dans le traitement des maladies rénales et spécialement les calculs rénaux.

II. Enquête ethnopharmacologique

L'ethnopharmacologie est l'étude scientifique interdisciplinaire des relations que les cultures vernaculaires ont établies avec leur environnement naturel dans le domaine des soins de santé, thérapeutique, diététique, hygiénique ou diagnostique. Cette étude visant à rechercher d'éventuelles efficacités biologiques derrière les discours et les rituelles mis en œuvre dans l'emploi de remèdes matériels. Ces remèdes, préventifs ou curatifs, destinés aux hommes ou à leurs animaux domestiques, peuvent appartenir au règne végétal, minéral et animal [156].

II.1 Enquêtes antécédentes

Au Maroc une étude avait permis de recueillir des informations sur les pratiques thérapeutiques utilisées par la population de la région de sud marocain dans le traitement de la lithiase rénale. Les plantes médicinales recensées au cours de cette étude ethnobotanique auprès de la population de la province de Tan-Tan sont réparties en 29 familles et 50 espèces utilisées dans le traitement de la lithiase rénale. Parmi les plantes anti-lithiasiques les plus réputées, on trouve : *Herniaria hirsuta L*., *Zizyphus lotus L*., *Opuntia ficus-indica L, Zea mays L* et *Ammi visnaga* L [177].

Une autre étude a été menée sur la population de Rabat, de Salé et de Témara [178]. L'examen des résultats, obtenus à partir des questionnaires a permis de relever 35 espèces végétales qui se répartissent en 23 familles botaniques. Les recherches ont montré que les espèces les plus citées sont : *Herniaria hirsuta* (21,6 %), *Petroselium crispum* (12,4 %), *Zizyphus lotus* (10,5 %) et *Citrus limon* (9,7 %).

Une troisième enquête réalisée dans la région de Kénitra à démontrer que les espèces les plus utilisées contre les calculs rénaux sont : *Herniaria hirsuta*, *Glycyrrhiza glabra*, *Opuntia ficus-indica*, *Hordeum vulgare* et *Agropyrum repens* [179].

Hseini et *Kahouadji* [180] ont montré que l'espèce *Herniaria hirsuta* présente un effectif important par rapport aux autres taxons. Elle est efficace dans la thérapie des calculs rénaux dans la région de Rabat. Ils ont aussi trouvé que : *Zea mays*, *Zizyphus lotus*, *Opuntia ficus indica* sont surtout prescrites comme remède contre les maladies de l'appareil urinaire.

Par ailleurs, *Lahsissene* [181] a identifié trois autres espèces utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental) dans le traitement de la lithiase urinaire : *Artemisia absinthium*, *Lawsonia inermis*, *Ranunculus bullatus* L.

II.2 Monographie des plantes sélectionnées

II.2.1 *Herniaria hirsuta L*

Petites plantes herbacées, appartient à la famille des Caryophyllaceae, parfois vivaces, à tiges très rameuses, couchées, étalées en cercle, ne dépassant pas 5 à 15 cm de hauteur. Les feuilles sont très petites, à stipules peu apparentes. Les fleurs sont verdâtres, de taille inférieure à 1 mm, groupées en glomérules axillaires. *H. hirsuta* a un calice densément hispide. Le fruit est une petite capsule indéhiscente, enveloppé par le calice et contenant une seule graine.

Cette espèce est connue partout au Maghreb. On la rencontre sur les sols sablonneux, au bord de chemins, dans les endroits incultes, des pelouses sèches, des pâturages, des olivettes et sur les lieux de passage car elles résistent au piétinement.

Commune dans les plaines, elle se trouve dans la plus grande partie des zones tempérées. Rencontrée en Europe, en Asie, aux Canaries et dans les régions méditerranéennes, elle est représentée dans presque tout le Maroc [182].
Les espèces du genre *Herniaria* contiendraient des polyphénols selon *Stefova et. Al.* qui ont étudié les parties aériennes de la plante et ont découvert la quercétine flavonoïde et un flavonol non identifié [183].

Cette espèce est traditionnellement indiquée dans les rétentions d'eau, les œdèmes, les oliguries, les lithiases rénales, les catarrhes de la vessie et chaque fois qu'il y a lieu de stimuler les fonctions rénales d'élimination de l'eau [182].

Herniaria hirsuta est très employée pour éliminer les calculs rénaux. Le nom vernaculaire « *herras lehjer* » utilisé par les marocains signifie d'ailleurs « casse-pierre » de même que le nom vernaculaire *rumpepedra* utilisé dans le nord du Maroc et qui est d'origine espagnole.

Les bergers s'en servent comme plante saponifère. Séchée cette plante exhale une odeur agréable de coumarine [182].

II.2.2 *Zea mays L*

Originaire d'Amérique centrale, le maïs était connu des anciens. Il fut introduit en Espagne en 1520, d'où il gagna l'Italie et la Turquie. C'est la raison pour laquelle il est connu en méditerranée sous l'appellation de blé de Turquie.

A partir du XVII^{e} siècle, il fut incorporé par les Turcs et les Arabes dans la matière médicale. C'est aujourd'hui une céréale jouant un rôle important dans l'économie mondiale [182].

Le maïs une plante herbacée de la famille des *Poaceae,* annuelle, monoïque, pouvant atteindre 2,5 m de hauteur, à tige dressée épaisse, cylindrique et noueuse. Ses feuilles, de grande taille, sont larges, rugueuses et garnies d'une nervure médiane. Les fleurs mâles, verdâtres sont disposées en panicules terminales ; les fleurs femelles, sont groupées en gros épis cylindriques, axillaires, enveloppés de grandes bractées membraneuses et surmontées par les styles et les stigmates formant une touffe brune à maturité. Les graines sont dures, luisantes, généralement jaunes. Le maïs est cultivé en grand nombre au Maghreb pour la production de grains. Il en existe de nombreuses variétés horticoles [182].

Les styles renferment 5 % de sels minéraux dont beaucoup de potassium ; 20 % de sucres, de pentosannes et de gomme. Les stigmates contiennent des protéines, des vitamines, des glucides, des sels de Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+} et Na^{+} ; des matières grasses contenant des insaponifiables (dont des sitostérols et le stigmastérol) et des acides cérotiques, néocérotiques, cérébroniques, l'allantoine, des traces d'huile essentielle, de l'acide salicylique et des carbures saturés (heptacosane, nonacosane, heptricontane).

Les composés phénoliques présents dans les stigmates sont les saponines, les tanins pyro-catéchiques, les alcaloïdes et les flavonoïdes [186-188]. Les anthocyanes, l'acide p-coumarique, l'acide vanillique, l'acide protocatéchuique, les dérivés de l'hespéridine, la quercétine et les formes liées à l'acide hydroxycinnamique composées d'acide p-coumarique et férulique [189].

L'embryon est riche en huile (l'huile de maïs) contenant des glycérides d'acides gras non saturés (acide oléique, linoléique) et une fraction insaponifiable avec des sitostérols, des déhydrostérols, des stigmastérols, de la vitamine A. Il renferme, en plus, de la lécithine, des phosphatides et une substance très sucrée, précurseur du coixol [182].

Les styles et stigmates ont des propriétés diurétiques, cholagogues, sédatives sur l'appareil urinaire, antihémorragiques (vitamine K). L'huile a des propriétés anti-athéromateuses en raison de sa richesse en acides gras insaturés [182].

De nombreuses recherches ont été réalisées sur les activités biologiques et les constituants des stigmates de maïs. Ces derniers ont été utilisés dans de nombreuses régions du monde pour le traitement de l'œdème, de la cystite, de la goutte, des calculs rénaux, de la néphropathie et de la prostatite [186,190].

II.2.3 *Opuntia ficus indica L*

Cette espèce de plante de la famille des *Cactaceae*, originaire du Mexique, fut introduite aux Îles canaries par les espagnols au XIe siècle pour l'élevage de la cochenille d'Amérique, puis, de là, gagna toute l'Afrique du Nord. Aujourd'hui, la figue de Barbarie représente une ressource alimentaire importante pour les populations de cette région. Elle est parfois séchée pour être consommée durant toute l'année après réhydratation. La plante est cultivée généralement en haie. Les raquettes sont un fourrage recherché pour les bovins, surtout en période de sécheresse [182].

C'est une plante ligneuse pouvant atteindre 3 m de hauteur, sans feuilles, dont les tiges sont formées d'articles aplatis et de forme ovale (les raquettes), d'un vert clair, munies de nombreuses touffes d'épines blanches ou de glochides jaunes ou blanches (selon l'espèce). Les fleurs, jaunes, solitaires, et sessiles, apparaissent sur le bord supérieur des raquettes et donnent en été un fruit ovoïde, d'abord vert puis orange à rougeâtre, contenant une pulpe orange à graines nombreuses (la figue de Barbarie) [182].

Le figuier de barbarie possède une grande adaptation aux conditions les plus hostiles (aridité du climat, salinité des sols, terrains de faible potentiel agricole). Son extension est limitée surtout par les basses températures hivernales ; son seuil de tolérance étant de -10 °C.

O. ficus-indica, à raquettes inermes mais avec de nombreuses glochides jaunes, est plantée surtout en zone aride pour fournir du fourrage vert et des fruits [182].

Les fruits, les fleurs et les cladodes de *O. ficus indica* contiennent différents composés phytochimiques ainsi que des composés tels que les flavonoïdes (pendulétine, lutéoline, quercitrine, kaempférol, rutine), des sels de potassium et de calcium. Le fruit contient des polysaccharides, des pentoses, des hexoses, des caroténoïdes, des β-xanthines et des β-cyanines et de la vitamine C. les graines contiennent des protéines et des lipides. La sève est riche en mucilage et contiendrait des alcaloïdes et des bases : hordénines, caudicine, choline, tyramine, etc [191].

Il a été rapporté que les extraits de fruits et de tiges avaient des actions hypoglycémiantes [192,193], anti-ulcéreuses [194,195] et anti-allergiques [196]. De plus, *Park et al*. ont rapporté des actions analgésiques et anti-inflammatoires des extraits de ses fruits et ses tiges [197], puis ont identifié le b-sitostérol comme principe actif anti-inflammatoire de l'extrait de tige [198].

Les fleurs sont indiquées comme diurétique (œdèmes, rétentions d'urine, cures d'amaigrissement, etc.) et dans le traitement des diarrhées non infectieuses [182].

II.2.4 *Ammi visnaga L*

Ammi visnaga ou Khella est une plante annuelle ou bisannuelle de la famille des *Apiaceae* à racine allongée, à tige dressée, robuste et rameuse, pouvant atteindre 1 m de hauteur. Les feuilles sont très découpées, à segments linéaires. Les inflorescences sont de grandes ombelles de petites fleurs blanches verdâtres apparaissant au début de l'été. Après la floraison, les rayons des ombelles convergent pour former une touffe et deviennent durs. Les fruits ovoïdes sont des petits diakènes. Cette espèce est répondue au Maghreb [182].

Les fruits contiennent des furanochromones, surtout de la khelline (1 à 2 %) accompagnée d'une substance voisine, la visnagine, des composés à fonction alcool (l'ammiol, le visammiol et le khellol. Ce dernier existant aussi sous la forme de 2 glucosides : khellol-glucoside et khellinine). On y trouve également des pyranocoumarines (samidine, dihydrosamidine et visnadine), des flavonoïdes (acacétine), des glucides, des protides, beaucoup de lipides, des tanins, une huile essentielle. Les ombelles contiennent elles aussi une petite quantité de principes actifs [199].

Les gens utilisent la khella pour plusieurs traitements. Par voie orale, la khella est utilisée pour le traitement des coliques et des crampes abdominales, des calculs rénaux, des problèmes respiratoires tels que l'asthme, la bronchite, la toux et la coqueluche [200].

La khella développe une activité antispasmodique sur les uretères, les voies biliaires, les muscles bronchiques, l'intestin et l'utérus (activité rapportée en partie à la visnadine). Elle possède de plus des propriétés coronodilatatrices (dues à la visnadine et à la khelline), diurétique et stimulante de la respiration. On a démontré sur l'animal une action protectrice de la khelline contre l'ulcère gastrique [201-203].

A. visnaga est indiqué dans les calculs urétraux, les coliques néphrétiques, l'asthme, les toux quinteuses, la dyspnée d'effort et le traitement de terrain de l'angine de poitrine (et non la crise d'angor) [182].

II.2.5 *Zizyphus Lotus L*

Le jujubier de la famille des *Rhamnaceae*, communément appelé en Afrique du Nord ″Sedra″, est une plante frutescente de 1,3 à 2,2 m très ramifiée. Les rameaux sont recourbés vers le bas, flexueux, blanc grisâtre à épines par paires droites ou recourbées. Les feuilles sont petites, alternes, obtuses, crénelées, à trois nervures, glabres, faiblement rigides, de 7 à 9 mm de large et de 9 à 13 mm de long, à pétiole court. Les fleurs sont solitaires ou groupées avec un seul pédicelle court, à calice en forme d'entonnoir, pentamère, à petite corolle à cinq pétales, à cinq étamines épipétales, à deux styles courts.

Les fruits appelés ″Nbeg″ sont des drupes sphériques dont les noyaux osseux biloculaires, petits et ronds, sont recouverts d'une pulpe demi-charnue, très vite sèche et riche en sucre [204].

Le *Zizyphus lotus* (L.) est une espèce méditerranéenne résistante au froid modéré et aux fortes chaleurs, pouvant végéter en atmosphère sèche et se contenter d'une faible pluviosité. Mais il craint l'humidité excessive de l'air et les précipitations abondantes. En raison de ses aptitudes, il est cultivé en zone tempérée à hiver doux, à saison sèche prolongée, en zones subtropicales et tropicales à climat subaride et aride [182].

Selon *Bellakhdar*, les jujubes sont considérés comme fébrifuges, tonifiants et revigorants, justifiant leur emploi dans la convalescence. Au Sahara occidental, elles ont gardé encore la réputation d'être antivarioliques et actives contre la rougeole [205].

Dans le Sud marocain, cette espèce est indiquée contre les furoncles et les abcès. La décoction des feuilles est également utilisée pour les soins des cheveux. Par ailleurs, la cendre de bois, additionnée de vinaigre constitue un traitement local des morsures de serpent [165].

Méthodes de sélection des plantes objet de l'étude

Les différentes espèces du Ziziphus sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les maladies inflammatoires, les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie [206,207].

CHAPITRE IV :

Oxydation et anti-oxydants

I. Stress oxydant

L'oxygène est une molécule indispensable à la vie. Il est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA) vu sa possession de deux électrons non appariés. Ceci explique sa grande réactivité. Lorsque la production de radicaux libres dépasse les capacités de défense de l'organisme, cela peut accélérer le vieillissement des cellules et augmenter le risque de développement de certaines maladies dégénératives (stress oxydatif). La formation des radicaux libres est activée par plusieurs paramètres comme : rayon UV, tabagisme, chauffage….

L'utilisation des antioxydants naturels est très bénéfique pour la santé vu leurs capacités à neutraliser les radicaux libres et à prévenir ce stress oxydatif.

I.1 Définition

Les réactions d'oxydation sont des réactions habituelles et indispensables au sein de notre organisme car elles contribuent au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. En effet, les réactions d'oxydation ont lieu lors de nombreux processus biologiques qui visent à maintenir un équilibre ou à synthétiser des molécules indispensables. Le métabolisme cellulaire produit et utilise en permanence des espèces oxydantes, c'est le cas au cours de la respiration, où chaque cellule réduit notamment l'oxygène en eau [208]. Cependant comme dans tout phénomène important, un dérèglement dans ces réactions d'oxydation peut créer un dysfonctionnement au niveau des cellules, c'est ce qu'on appelle un stress oxydant (Figure 7) [209,210].

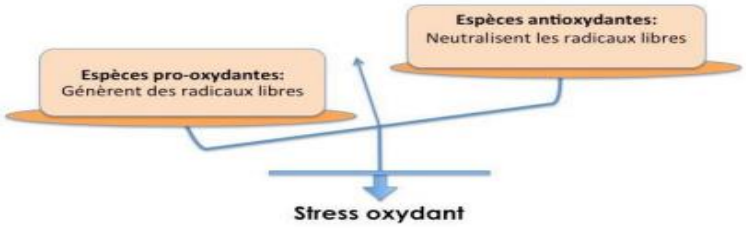


Figure 7: Stress oxydant

Le stress oxydant peut être défini comme la résultante d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes et au détriment des espèces antioxydantes [209]. Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants tels que les radicaux libres et d'autres non radicalaires tel que les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), soit d'une altération des mécanismes de défense [211,212].

Les premiers travaux dans le domaine ont montré le rôle important joué par les intermédiaires oxygénés, appelés également radicaux libres, dans les phénomènes physiologiques et leurs effets délétères dans les processus cellulaires [211,212].

I.2 Radical libre

Un radical libre est une substance chimique qui possède un électron non apparié sur son orbitale externe, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité [213]. Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant ainsi de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre. La production des radicaux libres de l'oxygène est physiologique. Elle est nécessaire à de nombreux métabolismes. Seul leur excès devient néfaste [214].

I.3 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes. Elles ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène et sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Les espèces réactives de l'oxygène les plus connus sont : le radical hydroxyle ($^{*}OH$), le monoxyde d'azote (NO^{*}), le radical superoxyde ($O2^{*-}$), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires avec une toxicité très importante tels que le peroxynitrite ($ONOO^{-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [215,216].

I.4 Conséquences du stress oxydant

La création abusive des radicaux libres induits des lésions directes de molécules biologiques entrainant ainsi le dysfonctionnement ou l'inactivation de protéines et de systèmes enzymatiques et altérant la structure des cellules, de leurs organites ou des acides nucléiques (cassure de brin). Les dommages induits par les ERO peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée) [217].

I.5 Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydant est la cause principale de nombreuses pathologies. Outre les maladies cardio-vasculaires (oxydation des lipides) et le cancer (oxydation de l'ADN), il provoque la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, l'Alzheimer, Parkinson, les infections intestinales, le rhumatisme, l'athérosclérose et le diabète [218,219].

II. Antioxydants

II.1 Définition

Un antioxydant correspond à une substance qui peut, à faible concentration comparée aux substrats oxydables, supprimer ou empêcher l'oxydation de ceux-ci [220].

Les antioxydants sont des substances naturellement présentes dans l'organisme, capables de le protéger d'influences néfastes, notamment des réactions d'oxydation (stress oxydant).

Les antioxydants, qui constituent un système de défense *in vivo*, se composent de plusieurs lignes de protection. La principale d'entre elles consistent à inhiber la formation des radicaux libres et des dérivés réactifs de l'oxygène en isolant les ions métalliques et en détruisant l'anion super oxyde et l'oxygène singulet, réduisant le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes dans chaque cellule de l'organisme [220].

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes [221].

II.2 Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques : cas de dérivés du phénol. En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention. Ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires.

D'autres en interrompant la réaction en chaine de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis

que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur [222].

II.3 Différentes utilisations

Il est important de noter que les antioxydants sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire dans la prévention du rancissement des matières grasses, néanmoins, ils sont utilisés dans l'industrie des matières plastiques ou des additifs afin de protéger les polymères de l'oxygène de l'air (que ce soit au moment de la fabrication ou pour prolonger la durée de vie des matériaux qui perdent leurs caractéristiques de plasticité ou d'élasticité), des rayonnements (UV principalement) et de l'ozone. Cependant, les industries cosmétiques utilisent des molécules qui sont plus ou moins les mêmes que dans l'industrie alimentaire (tocophérols, ascorbates, caroténoïdes…). Le BHA, le BHT sont utilisés comme partout, étant donné leur faible coût, mais la légère coloration jaune qu'ils peuvent occasionner dérange. De la même manière, on utilise plus volontiers des extraits végétaux divers (thym, romarin, sauge, sésame…), qui sont plus à même de gagner la confiance du consommateur [223].

II.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Il existe un grand nombre de méthodes physico-chimiques pour la mesure de l'activité antioxydante des extraits naturels. Pourtant il existe une grande variabilité entre les études. On ne trouve donc pas de corrélation entre les résultats. De par la diversité des espèces réactives et les différents mécanismes oxydatifs intervenant au sein de l'organisme, il est donc difficile de déterminer une seule méthode universelle de mesure de la capacité antioxydante que ce soit *in vitro* ou *in vivo* [224].

II.4.1 Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Cette méthode est basée sur l'élimination du radical l'$ABTS^{+}$ (di ammonium 2,2'-azinobis 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate) qui est détectable par spectrophotométrie à 734 nm [225]. La capacité antioxydante est mesurée comme la concentration (mM) de Trolox (un analogue soluble de la vitamine E) produisant le même effet que l'échantillon d'essai sur la réduction d'ABTS [226].

Le radical $ABTS^{\cdot+}$ est généré chimiquement en utilisant du persulfate de potassium (2 ABTS + $S_2O_8^{2-}$ ➔ 2 $ABTS^{\cdot+}$ + 2 SO_4^{2-}) et la disparition de l'$ABTS^{+}$ en présence d'antioxydant est mesurée par spectrophotométrie.

II.4.2 Méthode du DPPH

Cette méthode est basée sur la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl), un radical organique azoté stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette, par un antioxydant AH (DPPH· + AH ➔ DPPH-H + A·). Cette réduction est accompagnée d'un changement de couleur (du violet au jaune), suivi par une diminution de l'absorbance à 515 nm.

Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piégeur des radicaux libres. Plus un composé à la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé phénolique nécessaire pour atteindre une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre est connue comme l'IC_{50}.

La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité [222].

II.4.3 Méthode ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

La méthode ORAC mesure la capacité d'un antioxydant à éliminer les radicaux péroxyles formés spontanément à partir de l'AAPH (2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride) dans une solution saturée en O_2 [R-N=N-R(AAPH) ➔ 2 R· + N_2 ; puis R· + O_2➔ ROO·].

Le protocole décrit par *Ou* [227], est basé sur l'interférence de l'antioxydant (AOH) dans la réaction de destruction de la fluorescéine (FL-H) par le radical péroxyle qui est suivie par spectrométrie fluorescente :

ROO· + FL-H ➔ ROOH + FL· ou ROO· + AOH➔ AO· + ROOH

En présence d'une activité antiradicalaire (composé, produit naturel, etc..), la fluorescéïne est protégée du stress et la durée de sa fluorescence est augmentée. C'est cette augmentation qui permet de quantifier le pouvoir antiradicalaire via un étalonnage par le Trolox [227].

II.4.4 Méthode de FRAP

La méthode FRAP correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe (III)-TPTZ)$_2$] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe (II)-TPTZ)$_2$] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer.

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm. Plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur [228].

II.4.5 Méthode de blanchissement de β-carotène

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du β-carotène consiste à suivre la cinétique de décoloration du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique en présence d'oxydant [229]. Le β-carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation [230].

Plus l'efficacité d'un antioxydant est grande, plus la décoloration de la couleur du β-carotène sera lente et vice-versa [231,232].

II.4.6 Capacité anti oxydante totale

L'évaluation de la capacité antioxydante totale (CAT) est reposée sur la formation d'un complexe vert de phosphate/ Mo(V) dans un milieu acide. La présence de l'extrait permet la réduction de molybdène Mo (VI) en molybdène Mo (V) MoO_2^+ [233].

II.4.7 Piégeage du radical hydroxyle (HRSA)

Le $^{\bullet}OH$ est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de *Haber Weiss* [234].

Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2310 mV) lui permettant de réagir avec les lipides, les protéines, les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine [235].

In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basé sur la réaction de *Fenton* en mesurant la génération du radical ·OH et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique, le système implique l'auto-oxydation du complexe Fe^{2+}–EDTA dans un milieu aqueux pour former $O^{\bullet 2-}$ qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7,4. Ensuite, ce dernier est interagi avec Fe^{2+} pour former les radicaux ·OH en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton).

$$H_2O_2 + Fe^{2+}\text{- EDTA} \rightarrow \ \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}\text{- EDTA}$$

La dégradation du désoxyribose par $^{\bullet}OH$ dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des antioxydants protège et diminue la production des MDA [236]. Notant que le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fenton :

$$Fe^{3+}\text{- EDTA + ascorbate} \rightarrow Fe^{2+}\text{- EDTA + ascorbate oxide}$$

CHAPITRE V :

Activités toxico-pharmacologiques et étude *in vitro* des substances végétales bioactives

I. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires

I.1 Inflammation

L'inflammation est un ensemble de mécanismes réactionnels de défense de l'organisme contre des agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique ou biologique (réponse immunitaire ou infectieuse). Elle peut être causée par des agressions physiques (comme le chaud, le froid, les radiations ionisantes) ou chimiques (composés acides ou basiques, des toxines bactériennes).

Elle peut aussi être la conséquence d'une infection en rapport avec la présence dans l'organisme vivant des pathogènes tels que bactéries, virus, parasites ou champignons [237-239].

Les symptômes de l'inflammation sont : rougeur, chaleur, douleur et gonflement. De plus, une altération du fonctionnement de l'organe touché peut survenir.

L'inflammation est généralement associée à la douleur comme un processus secondaire résultant de la libération de médiateurs algiques comme les kinines, les produits de la cyclo oxygénase et les cytokines [240].

L'inflammation a pour but de militariser le système immunitaire pour l'élimination de l'agent pathogène et la réparation des lésions tissulaires. L'inflammation peut être mauvaise pour la santé. Elle peut être un facteur déclencheur de plusieurs maladies chroniques comme les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, rhumatoïde, l'arthrite et le cancer [241,242].

I.2 Causes de l'inflammation

Les causes ou les facteurs qui déclenchent l'inflammation sont multiples et variés. Ils peuvent avoir diverses origines.

Causes exogènes :

- Agents physiques : traumatisme, radiations, ionisation, électricité, froid, chaleur, piqûre, coupure ;
- Agents chimiques : acide, base, caustiques, toxines, venins substances minérales diverses ;
- Agents biologiques : microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon) et d'autres agents comme le vin, le pollen et les toxines [243,244].

Causes endogènes :

- Causes trophiques : elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation ;
- Conflits immunitaires : rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques [245].

I.3 Types d'inflammation

I.3.1 Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur. Elle est caractérisée par sa durée limitée dans le temps (de quelques jours à quelques semaines) et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. Elle est dite non spécifique lorsque l'évènement déclencheur de la réaction inflammatoire est rencontré pour la première fois par l'organisme, et qu'elle ne fait pas intervenir la « mémoire lymphocytaire ».

Le pouvoir de guérison des inflammations aiguës peut être spontané ou avec traitement. Quand la destruction tissulaire est imposante cela peut laisser des séquelles.

Le mécanisme réactionnel inflammatoire peut être réparti en trois grandes phases : une phase cellulaire consécutive, une phase vasculaire immédiate et une phase de résolution et de cicatrisation [241,246].

I.3.2 Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, caractérisée par une infiltration de cellules monoculaires telles que les plasmocytes dans les tissus, les macrophages et les lymphocytes.

La persistance de la réponse inflammatoire peut être due à l'engagement des réponses de l'immunité innée et acquise et cela peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années.

Le déclenchement de cette inflammation est à l'origine des réponses vasculaires qui entraine l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales. Ces derniers vont amener l'adhésion des lymphocytes et des monocytes et causer donc leur migration dans le compartiment extravasculaire.

Dans l'inflammation chronique, les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire et de réparation coexistent et cela pendant toute l'évolution de l'inflammation, contrairement à l'inflammation aiguë. L'installation d'un phénomène de cicatrisation pathologique peut être due à la non-régénération tissulaire [238,241, 245].

L'inflammation chronique peut être répartie en trois types :

- L'inflammation chronique non spécifique : Elle est l'aboutissement d'une inflammation aiguë non guérie.
- L'inflammation chronique spécifique (primaire) : Son apparition peut être une réponse à quelques types d'agressions.
- L'inflammation granulomateuse : elle est marquée par la présence de granulomes et peut-être considérée comme un sous-type d'inflammation chronique [247].

I.4 Cellules d'inflammation

Lors d'une blessure, d'une infection ou d'un contact avec des produits chimiques, la couche cornée est traversée et/ou altérée. Une réponse inflammatoire est alors mise en place par les cellules résidantes de l'épiderme et du derme. Cette réaction induit le recrutement de cellules immunitaires circulantes.

Plusieurs cellules interviennent dans le mécanisme inflammatoire telles que :

Les polynucléaires neutrophiles : Ils libèrent des protéases, des protéines cationiques et des eicosanoïdes. Ils présentent des récepteurs membranaires responsables de leurs propriétés d'adhérence, de chimiotactisme, de migration, endocytose et phagocytose.
Ces polynucléaires neutrophiles sont phagocytés par le macrophage après leur mort sur le site [248].

Les phagocytes mononucléés : Les monocytes proviennent de la moelle osseuse. Ils jouent un rôle d'adsorption et de lyse d'agents pathogènes. Ils assurent également la présentation des antigènes aux lymphocytes, la résorption de substances étrangères et de débris, ils sécrètent des cytokines, participent à l'agression tissulaire par la libération de métabolites de l'oxygène et de protéase. Ils participent enfin au fibrinogène et au remodelage cellulaire par l'apport de collagénase.

Les lymphocytes : ils naissent dans la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang et les tissus lymphoïdes. Ils sont de deux types : Les lymphocytes B qui par différenciation donnent naissance aux plasmocytes, producteurs d'immunoglobulines et les lymphocytes T responsables de l'immunité à médiation cellulaire. Les fibroblastes libèrent la collagénase et les plaquettes constituent le lieu de stockage de la sérotonine [249,250].

Les mastocytes : qui contiennent de l'histamine et les cellules endothéliales qui sécrètent les cytokines, leur multiplication et leur différenciation sont indispensables à l'angiogenèse,

facteur clé de réparation tissulaire. A ces cellules s'ajoutent les polynucléaires éosinophiles, qui libèrent les dérivés de l'acide arachidonique [251].

I.5 Médiateurs d'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. La réponse inflammatoire est initiée et contrôlée par de nombreux médiateurs qui peuvent être soit pro ou anti-inflammatoires, soit des substances protéiques plasmatiques présentes dans le sang circulant, soit chimiques, ou proviennent de cellules comme les neutrophiles, les macrophages, les thrombocytes, les mastocytes et les monocytes [238,252].

Ces médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium et augmentent l'agrégation des plaquettes [253, 254].

I.6 Anti-inflammatoires

Le traitement de l'inflammation a pour but de réduire la douleur sans modifier les effets de réparation. Le processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments dits anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou traditionnels. Les anti-inflammatoires sont une classe de médicaments subdivisée en deux catégories.

I.6.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS comme les : phénylbutazone, indométacine, diclofénac, ibuprofen, dérivés de l'acide propionique et l'oxicam sont des médicaments dépourvus de noyau stéroïde ayant des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Figure 8) [255]. Ils forment un groupe hétérogène de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire quelle que soit son origine.

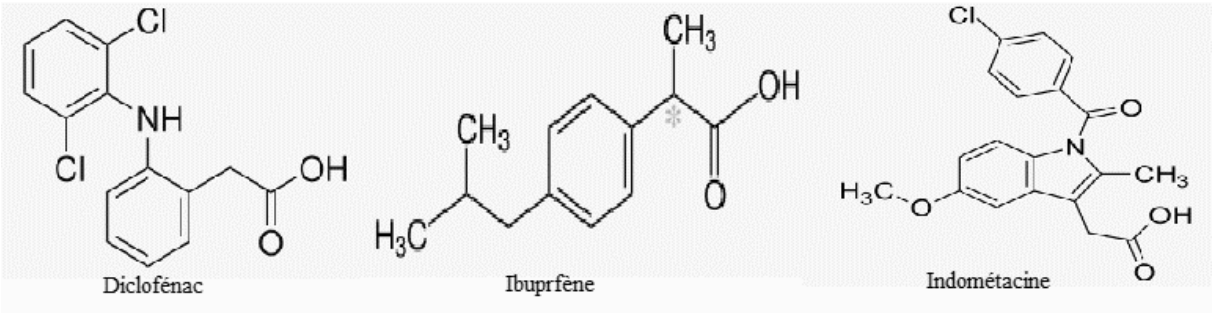


Figure 8: Exemples de structures d'anti-inflammatoires non stéroïdiens

Dans le processus de la réaction inflammatoire, au cours de la phagocytose et de la synthèse des différents dérivés de l'acide arachidonique, il y a une libération de superoxydes à action

pro-inflammatoire d'où l'inflammation. Les AINS inhibent par action sur la cyclooxygénase la synthèse des prostaglandines ; et par action sur la lipooxygénase inhibent la formation de superoxydes.

Ils ont également la capacité de stabiliser la membrane lysosomiale empêchant ainsi la libération des composés pro-inflammatoires et d'inhiber l'élaboration des kinines. L'acide acétylsalicylique ou aspirine constitue l'anti-inflammatoire non stéroïdien le plus usuel [256,257].

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS s'accompagne d'effets favorables en gênant ainsi l'agrégation plaquettaire et donc la coagulation du sang, ce qui peut prévenir la formation des caillots (thrombose), mais aggrave les hémorragies ; en provoquant aussi des problèmes gastro-intestinaux (ulcères), rénaux et d'hypersensibilité [258-260].

I.6.2 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les AIS ou corticoïdes sont représentées par des dérivés du cortisol, principal glucocorticoide surrenalien (Figure 9). Ce sont des anti-inflammatoires puissants largement utilisés pour supprimer les effets délétères des réponses inflammatoires. Ils agissent à différents niveaux par régulation (activation ou inhibition) de la transcription d'un grand nombre de gènes cibles [261]. Ces corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes de l'organisme. Ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase et donc la libération de l'acide arachidonique.

Néanmoins, l'utilisation des glucocorticoïdes peut entrainer plusieurs effets indésirables, et ces derniers peuvent augmenter avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Ces effets peuvent être l'altération de la peau, la fragilité osseuse, l'apparition d'un état diabétique ou d'hypertension artérielle, ainsi que des troubles digestifs (apparition d'ulcèresgastro-duodénaux), musculosqueletiques (ostéoporose) et endocriniens (prise de poids) [262].

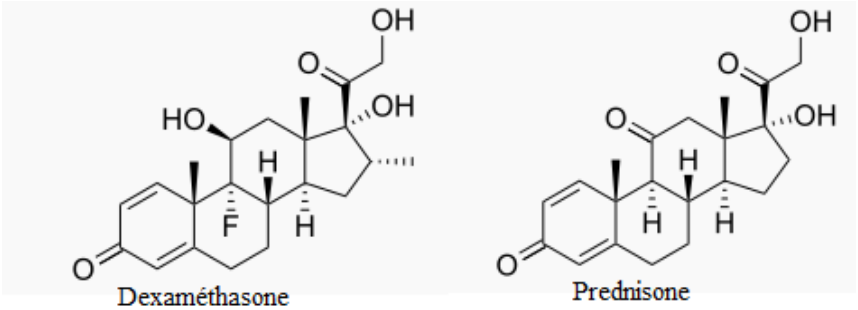


Figure 9: Exemples de structures d'anti-inflammatoires stéroïdiens

I.7 Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les méthodes d'étude des anti-inflammatoires sont très nombreuses. Il existe un grand nombre de modèles *in vivo* d'inflammation aiguë par création d'un œdème. Les souris et les rats sont les espèces animales les plus utilisées et la création de l'œdème se fait généralement à l'oreille ou à la patte.

Après avoir créé l'inflammation sur les animaux de laboratoire, les effets sur les différentes phases de l'inflammation sont recherchés.

- Inflammation locale de l'oreille :

L'inflammation de l'oreille de rat, provoquée par l'application locale d'huile de croton peut être réduite par l'application locale de substances anti-inflammatoires [263].

- Erythème aux rayons ultraviolets chez le cobaye :

Il s'agit d'apprécier l'intensité de la coloration rouge de la peau épilée du dos du cobaye soumis aux rayons ultraviolets, en absence puis en présence d'anti-inflammatoires. Ce test peut être effectué sur les souris [264].

- Perméabilité capillaire chez le lapin :

L'essence de térébenthine ou l'huile de croton est appliquée sur la peau épilée du lapin albinos. Une exsudation plasmatique est mise en évidence par l'injection intraveineuse de bleu trypan ou de bleu Evans qui se lie aux protéines plasmatiques. L'étendue de la tâche bleu cutanée est proportionnelle à la perméabilité capillaire. L'étendue de la diffusion du bleu dans la substance fondamentale du derme est réduite en présence d'anti-inflammatoires [265].

- Œdème de la patte de rat :

L'injection de carragéenine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de rat provoque un œdème dont on peut ralentir le développement par un médicament anti-inflammatoire préventif. L'exsudation est évaluée par le gonflement de la patte postérieure du rat après injection d'un agent phlogogène (formol, olvabumine, carragéenine). Le diamètre de gonflement est ensuite mesuré à l'aide d'un pied à coulisse où la patte est pesée et son volume est estimé dans un plétysmomètre [266].

II. Généralités sur la douleur et les antalgiques

II.1 Douleur

La douleur est un processus physiologique dont le but est d'avertir la personne d'une menace de son intégrité physique, d'où le terme nociception [267]. Elle 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.

Par son intensité et sa durée, elle peut devenir un véritable syndrome retentissant sur les grandes fonctions organiques et capable à lui seul d'aggraver l'état du malade [268].

Selon les physiologistes, la douleur est un phénomène pathologique résultant de l'activation des récepteurs nociceptifs par une variété de stimuli douloureux. Elle possède des récepteurs appelés nocicepteurs, des voies de conduction du message nociceptif et des centres supérieurs [269]. Cependant, la manière dont une sensation douloureuse est ressentie en qualité et en intensité demeure subjective. Sa perception et son intégration sont complexes et segmentées entre de nombreux étages du système nerveux. En plus, elle est un phénomène sensoriel qui intègre une expérience personnelle complexe influencée par un certain nombre de paramètres psychologiques [270].

II.2 Physiologie de la douleur

La douleur trouve son origine dans la stimulation de différents nocicepteurs correspondant aux extrémités des neurones sensoriels afférents dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale [271]. Il existe plusieurs voies de douleurs qu'on peut citer : les voies périphériques, le relais médullaire, la moelle épinière, les voies ascendantes et les voies descendantes [272].

II.3 Types de douleurs

II.3.1 Douleur aiguë

La douleur aiguë est une douleur vive, immédiate, et généralement brève. Elle est causée par une stimulation nociceptive de l'organisme. La douleur a ici un rôle de signal d'alarme ou de protection. Elle est associée à un traumatisme et a une cause organique précise. La récupération de ce type de douleur est complète et sa durée d'évolution est inférieure à trois mois [273].

II.3.2 Douleur chronique

La douleur chronique est définie par une durée d'évolution supérieure à trois mois ou six mois selon les auteurs. Elle est une pathogenèse peu claire, avec souvent une absence de cause organique et il y a une incapacité à restaurer les effets psychologiques normaux.
Par le fait même de sa persistance, une douleur qui était initialement un signal d'alarme peut se modifier et devenir un syndrome à part entière [273].

II.4 Antalgiques

Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments à action symptomatique qui atténuent, abolissent ou diminuent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations contrairement aux anesthésiques.

II.4.1 Analgésiques morphiniques

L'analgésique morphinique est sélectif. Il supprime les sensations douloureuses sans altérer les autres sensations en préservant l'état de conscience. Autrement dit, il augmente le seuil de perception de tous les stimuli douloureux. La durée et l'intensité de l'analgésique sont en rapport direct avec la voie d'administration, la sensibilité individuelle et la dose. La morphine soulage bien les douleurs sourdes, les douleurs viscérales et les douleurs aiguës [257].

II.4.2 Analgésiques non morphiniques

Les analgésiques non morphiniques ou antalgiques, sont soit seulement sédatifs de la douleur, soit à la fois antalgiques et antipyrétiques ou anti-inflammatoires.
Ces médicaments ont une action analgésique beaucoup moins forte que celle des analgésiques centraux comme la morphine. Leurs effets analgésiques se manifestent dans les douleurs peu intenses (céphalées, névralgie, arthralgie, maux de dents…).

Certains sont antipyrétiques, car ils normalisent une température élevée, en agissant sur le centre de la thermorégulation [257].

II.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antalgique

Les méthodes d'étude des antalgiques sont très nombreuses et ont plusieurs origines :

- Les stimuli mécaniques :

Ils consistent à soumettre la patte du rat à une pression mesurée qui réagit par un cri (test de *Randall et Selitto*), ou de pincer la base de la queue de la souris (test d'*Haffner*) ; l'animal analgésié ne réagit pas [272-274].

- Les stimuli thermiques :
  - La souris est placée sur une plaque à la température de 56°C. Si elle n'est pas analgésiée, elle se lèche les pattes en moins de 8 secondes. Les réactions de groupes de souris naïves sont comparées (test de *Woolf* et *McDonald* ou hot plate test).
  - En présence d'un rayon lumineux calorifique focalisé sur la queue de la souris, en moins de 6 secondes, elle déplace la queue. On considère que l'animal est analgésié si la réponse n'est pas obtenue en 12 secondes (test d'*Amour et Smith*).

- La queue du rat est stimulée par la chaleur, il s'agit d'un appareil constitué d'une ampoule émettant de la chaleur irradiante de 55 à 60°C. Le seuil d'inhibition de la douleur se situe à 6 secondes, un temps supérieur à 6 secondes révèle une action analgésique centrale type morphine (Test de *Tail Flick*) [272-274].

➢ Les stimuli électriques :

- On stimule la pulpe dentaire du lapin qui répond par un frémissement des babines, un mâchonnement ou un recul de la tête selon l'intensité du stimulus (le test de *Koll et Refert*) ;
- La base de la queue du rat est excitée électriquement, le rat présente une réaction de fuite avec cris. Le seuil d'intensité de courant électrique déterminant le cri et sa variation après analgésie sont évalués (le test de C*harpentier*) [272-274].

➢ Les stimuli chimiques :

- Dans le test de *Siegmund*, on injecte à la souris ou au rat par voie intrapéritonéale une solution de phénylbenzoquinone ou d'acide acétique à 3 % ; l'animal présente un phénomène de torsion de son corps. C'est le « *writhing test* ». Sur des groupes d'animaux, on recherche la dose d'analgésique empêchant le phénomène de torsion à la douleur.
- Dans le test de *Lim*, on injecte par voie intraveineuse aux chiens de la bradykinine qui provoque une sensation de brûlure. La dose d'analgésique qui abolit le réflexe d'aboiement est ensuite recherchée [272-274].

III. Généralités sur les études toxicologiques

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son éventuelle introduction en thérapeutique. En effet, en plus de l'efficacité, il ne doit pas se produire pour la dose active des effets toxiques et néfastes pour l'organisme. Il faut donc définir le rapport bénéfice-risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Ceci ne peut être réalisé que par l'intermédiaire de deux types d'étude : D'une part l'efficacité chez l'animal (pharmacologie expérimentale) et chez l'homme (effets bénéfiques) et d'autre part une étude de sécurité chez l'animal (toxicologie) et chez l'homme (effets indésirables).

La toxicologie doit donc veiller à l'innocuité des plantes médicinales. Mais sa position ne doit pas être seulement négative et réglementaire, bien au contraire, elle doit aider aussi à l'innovation et au choix des plantes médicinales à des doses bénéfiques.

En définitive, l'étude toxicologique doit apporter à la phytothérapie et à la consommation des plantes une certaine garantie et une certaine caution.

L'évaluation de la sécurité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë ou bien par l'étude de sa toxicité subaiguë.

III.1 Toxicité aiguë (administration unique)

L'étude de la toxicité aiguë fournit des informations sur les dangers susceptibles d'un produit sur la santé. Elle permet de relever les effets indésirables et les dangers immédiats suite à une prise unique du produit. L'étude de la toxicité aiguë qui consiste en une administration unique peut être réalisée selon la ligne directrice européenne de l'OCDE (code 423).

Cette ligne directrice utilise des rongeurs (de préférence des rats femelles). La substance d'essai est administrée généralement oralement par une dose unique (par sonde gastrique ou toute autre canule appropriée pour intubation) à des animaux à jeun avant l'administration. Le niveau de dose de la première prise est choisi entre quatre niveaux fixés, 5, 50, 300 et 2000 mg/kg poids corporel. L'essai limite correspond à un niveau de dose d'au moins de 2000 mg/kg de poids corporel (exceptionnellement 5000 mg/kg). Les animaux sont observés attentivement pendant les 4 premières heures et quotidiennement par la suite, pour un total de 14 jours généralement.

Le poids des animaux doit être mesuré chaque semaine. Le taux de mortalité, comportement de l'animal et les signes de toxicité doivent être observé également durant les 14 jours qui suivent l'exposition pour déceler d'éventuels effets retardés des extraits [274-279].

III.2 Toxicité subaiguë (administration réitérée)

Cette méthode fournit des informations sur les dangers pour la santé qui peuvent résulter d'une exposition à une substance d'essai par voie orale. L'étude de la toxicité subaiguë peut être réalisée selon la ligne directrice européenne de l'OCDE (code 407) [280].

La méthode est basée sur l'administration orale répétée de la substance étudiée pendant une période limitée (un niveau de dose quotidiennement pendant 28 jours). Cette ligne directrice utilise principalement des rongeurs (de préférence des rats). Au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être employés pour chaque niveau de dose. Le composé d'essai est administré par gavage ou via la nourriture ou la boisson. Un essai limite peut être effectué si on n'attend pas d'effet à une dose de 1000 mg/kg poids corporel /j.

Le rapport de cette étude inclut les résultats d'observations cliniques et fonctionnelles, des mesures de poids corporel et de consommation de nourriture/d'eau, des données d'hématologie et de biochimie clinique, ainsi que d'autopsie générale et d'histopathologie.

III.3 Dose létale 50

La dose létale 50 (DL50) est la quantité de produit, exprimée en mg par kilogramme (mg/kg) de poids corporel (ou en mg/cm^2 de surface corporelle), qui provoque la mort de la moitié des animaux d'un lot homogène quant à la race, au sexe, à l'âge et au poids [274-278].

IV. Traitement anti-lithiasique

La phytothérapie repose en partie sur l'utilisation traditionnelle des plantes dans le but de se soigner. Les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces principes actifs ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments soignant plusieurs pathologies. Dans le cas de la lithiase rénale, on compte plus de 70 espèces de plantes ayant des propriétés anti lithiasiques [13,281].

A l'heure actuelle, de nombreux pays utilisent encore la phytothérapie pour le traitement de la lithiase rénale, notamment en Inde, au Proche-Orient, en Afrique du Nord et en Amérique du Sud. Ces plantes sont utilisées sous forme de tisanes, de décoctions, d'infusion, de macération ou sous forme de poudre. L'utilité des plantes est prouvée même si la justification de leur utilisation n'est pas bien établie. Leur effet le plus certain est d'augmenter la diurèse, sans que l'on puisse conclure à une action directe sur la formation des calculs ou leur éventuelle dissolution [13,281].

De nombreuses recherches sont menées sur certaines de ces plantes médicinales utilisées comme remèdes pour le traitement de différents types de lithiases rénales. Ces résultats de recherche sont très confondus, la plupart des cas attribuent les propriétés anti lithiasiques à un extrait végétal déterminé sans spécifier le type de calcul. Et si on tient compte des différences entre l'étiologie des calculs de composition distincte et même ceux du même type, il sera difficile d'admettre qu'un extrait de plante médicale peut agir par une correction des différents facteurs étiologiques en même temps ou dissolvent des substances très distinctes [13,281].

Cependant on peut accepter que certaines actions diurétiques et ou désinfectantes peuvent être bénéfiques dans quelques situations décrites. En effet, en augmentant le volume et la qualité

d'urine excrétée on peut favoriser, par simple action mécanique, l'élimination des sables ou fragmenter les calculs. Un extrait de plante peut agir aussi par modification du pH urinaire. La diminution du pH urinaire à des valeurs suffisamment acides est l'unique approche possible de la dissolution des calculs phosphocalciques et ou magnésienne. Dans le cas des plantes qui provoquent l'élévation de pH, l'effet serait négatif en provoquant la précipitation de ces sels [13,281].

IV.1 Phythomédicaments ayant une activité anti-lithiasique

De nos jours, plusieurs médicaments sont à base de plantes. De nombreuses formulations utilisées pour la gestion de calculs rénaux sont disponibles dans le commerce à savoir :

- Cystone: Himalaya Drug Company, Inde;
- Calcuri : Charak Pharmaceuticals, Bombay, Inde ;
- Uriflush : Inti Sumatra mondial ; Indonésie ;
- Uriflow : Discovery Herbes, USA ;
- Chandraprabha bati : Baidyanath, Inde.

Ces médicaments ont été largement utilisés cliniquement pour dissoudre les calculs rénaux.
Les recherches pharmacologiques et cliniques réalisées sur une formulation d'origine de plantes. Composites : Trinapanchamool (formulation polyherbal) composé de cinq plantes (*Desmostachya de bipinnata, Saccharum officinarum, Saccharum Nunja, Saccharum spontaneum et Imperata cylindrica*) ont montré son efficacité en tant que prophylactique dans la prévention de la formation de calculs et comme curatifs pour dissoudre les calculs préformés chez des rats albinos. L'activité anti lithiasique de cette formulation a été attribuée à son activité diurétique [282].

Le Cystone est un produit souvent prescrit par les médecins pour les patients souffrant de calculs urinaires. Plusieurs études ont montré sa capacité à inhiber la formation d'oxalate de calcium et de phosphate de calcium [283]. En outre, son efficacité pour réduire la lithiase urinaire a également été signalée chez des rats *Wistar* mâles [284]. Dans différentes études, le Cystone est utilisé comme une référence pour évaluer les propriétés anti lithiasiques d'autres plantes.

Plusieurs recherches scientifiques ont fait l'objet de publication pour démontrer les effets de certaines plantes dans la dissolution ou la prévention de la lithiase rénale [285-300].

IV.2 Induction des calculs d'oxalate de calcium *in vivo*

L'induction des calculs d'oxalate de calcium chez les rats se fait par l'addition de l'éthylène glycol dans l'eau de boisson des rats. Plusieurs travaux ont été réalisés selon le même protocole expérimental. L'efficacité des différentes concentrations de *Helichrysum plicatum* DC. a été réalisée par *Bayira* [285]. Les résultats montrent que la plante à un effet bénéfique sur la prévention et l'élimination des dépôts de CaOx dans les reins des rats étudiés.

Des études réalisées sur l'extrait aqueux de fruits de *Ammi visnaga* avaient pour but d'évaluer si l'administration orale de l'extrait pourrait empêcher le dépôt de cristaux chez des rats formant des calculs. L'examen histopathologique des reins a révélé que *A. visnaga* réduisait considérablement l'incidence du dépôt de cristaux d'oxalate de calcium (CaOx). En outre, augmentait de manière significative l'excrétion urinaire ainsi qu'une diminution de l'excrétion de l'oxalate [286,287].

Le potentiel prophylactique des flavonoïdes totaux, des composés phénoliques totaux et des polysaccharides de *Orthosiphon stamineus* a été examiné par l'induction expérimentale de rats néphrolithiasiques à oxalate de calcium (CaOx). Les résultats démontrent que les polysaccharides sont les principaux matériaux thérapeutiques de la plante. En plus, ils avaient des effets prophylactiques impressionnant sur les calculs de CaOx chez les rats néphrolithiques [288].

D'autres résultats exposent l'efficacité de l'extrait alcoolique de *Pergularia daemia* contre les pathologies urinaires avec une importante activité diurétique. La réduction des constituants de formation de calculs dans l'urine et leur rétention rénale ont été faite en réduisant le produit de solubilité de sels cristallisants tels que l'oxalate de calcium et le phosphate de calcium, ce qui pourrait contribuer à la propriété anti-urolithiatique de l'extrait [289].

Saeidi J [290], a démontré que l'extrait aqueux de *Petroselinum sativum* réduit la croissance des calculs urinaires et l'hépatotoxicité induite par l'éthylène glycol chez le rat.

L'effet anti-lithiasique de *Orthosiphon grandiflorus*, *Hibiscus sabdariffa* et *Phyllanthus amarus* a été déterminé par *Surachet Woottisin et al* [291]. L'induction de l'hyperoxalurie a été faite en donnant 3 % de glycolat pendant 4 semaines aux rats. *Hibiscus sabdariffa* et *Phyllanthus amarus* ont réduit les dépôts de cristaux de calcium dans les reins. L'effet antilithique de *Hibiscus sabdariffa* peut être lié à une diminution de la rétention d'oxalate dans le rein et à une plus grande excrétion dans les urines, tandis que celui de *Phyllanthus*

amarus peut dépendre de l'augmentation du citrate urinaire. En revanche, l'administration d'*Orthosiphon grandiflorus* n'a eu aucun effet antilithique [291].

Les résultats de recherche de *Ajij Ahmeda et al.* [292], sur l'extrait hydro alcoolique de *Adiantum capillus veneris* Linn indiquent une réduction signifiante dans le nombre de cristaux dans les groupes traités par la plante et donc une activité anti-urolithique de l'extrait.

V. Réduction massique des calculs rénaux *in vitro*

L'action anti-lithiasique été évaluée par *Hannach et al.* [293], qui a incubé des calculs de cystine *in vitro* dans des extraits d'infusion de plantes : *Arenaria ammophila*, *Parietaria officinalis* et *Paronychia argentea*, pendant huit semaines sous agitation magnétique. Aucun des extraits testés n'a eu d'effet positif pour dissoudre les calculs de cystine. Le seul qui s'est avéré avoir un effet était l'extrait de *A. ammophila.*

Selon *Amar et al.* [294], l'effet des différentes concentrations de l'infusion de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation oxalo-calcique oxalo-dépendante, induite par ajout d'oxalate dans des urines de sujets sains, montre des propriétés controversées : elle est inhibitrice de la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté et inductrice de la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté.

Une étude sur la vérification de l'efficacité des différentes concentrations de la perfusion et de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Arbutus unedo* L contre la cristallisation de l'oxalate de calcium par inhibition. Suggèrent une plus grande efficacité de l'infusion de plantes vis-à-vis de l'extrait hydroalcoolique contre la cristallisation en particulier au stade de l'agrégation [295].

L'évaluation de diverses concentrations de l'extrait hydroalcoolique des rhizomes de *Bergenia ciliata* sur l'inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium comparé au Cystone, à des concentrations identiques. A montrer que l'extrait de *B. ciliata* était significativement plus efficace pour inhiber la nucléation et l'agrégation des cristaux que le Cystone. De plus, l'extrait induit davantage de cristaux de dihydrate de CaOx, avec une réduction significative du nombre et de la taille des cristaux du calcium oxalate monohydraté [296].

Les publications de *Meiouet* et *El habbani* [297,298] se sont intéressées à la dissolution des calculs cystiniques par les extraits d'infusion de *Herniaria hirsuta* L, *Opuntia Ficus- Indica*, *Zea Mays* et *Ammi Visnaga* L. Les deux résultats de *Meiouet* et *El habbani* [297,298]

montrent, qu'après huit semaines d'incubation, il y a une réduction de masse pour les quatre plantes étudiées.

L'influence de l'extrait de plante *Ammi Visnaga* et *Punica granatum* sur la nucléation et la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté sous forme de calculs rénaux a été étudiée par *Abdel-Aal et Kachkoul* [299,300]. Les résultats indiquent que les extraits de plantes ont une grande efficacité contre la nucléation et contre l'agrégation, donc ils agissent sur la cristallisation de l'oxalate de calcium.

PARTIE II :

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1 Matériel végétal

Le choix des plantes sélectionnées pour cette étude a été basé sur l'enquête ethnopharmacologique effectuée au centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès, à l'ancienne médina de Fès, à la station thermale Sidi Hrazem et skhinat.

Les plantes sélectionnées sont : *Herniaria hirsuta*L collectée dans la montagne du Moyen Atlas au Maroc, *Zea mays* L, *Opuntia ficus indica* L, *Ammi visnaga* Let *Ziziphus lotus* L qui provenaient de Taounate (nord-est de Fès). Ces plantes ont été récoltées durant la période de floraison entre Avril et Juin 2016.

Ces plantes, fraichement collectées, ont été séchées à l'ombre et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré. Puis ont été identifiées. Des échantillons ont été déposés à l'herbier du laboratoire de Biotechnologie et de préservation des ressources naturelles de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès (RAB 76986 pour *A. visnaga* ; RAB 1264407 pour *O. ficus indica* ; *H. hirsuta* RAB 090814. RAB 1108434 Pour *Z. mays* et RAB 357564 pour *Z. lotus*).

I.2 Matériel Animal

Des souris *Swiss* albinos, mâles et femelles, dont le poids varie entre 25 et 30 g et des rats *Wistar* ont été fournis par le centre ECWP (Emirates Wildlife Propagation Center) de Missour. Dès leur réception, ils ont été placés au hasard en groupe de cinq dans des cages standard pour une période d'adaptation de deux semaines avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Une période pendant laquelle les animaux ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau et ont été maintenus à une température constante (22 ± 2) °C et à un cycle de lumière/obscurité de 12/12 h. Les animaux sont actifs pendant la période nocturne, c'est pour cette raison que la phase obscure commence à partir de midi pour que les différentes expériences puissent avoir lieu durant cette phase.

I.3 Calculs rénaux

Le choix des calculs rénaux pour notre étude s'est dirigé vers deux types : Le premier type sont les calculs d'oxalate de calcium qui les plus fréquent chez les patients lithiasiques, le second choix concerne les calculs de cystine qui ont été sélectionnés à cause de leur résistance à la lithotritie extracorporelle et à leur grande récidivité.

Dans cette étude, nous avons travaillait sur des fragments de cystine et sur des calculs d'oxalate de calcium monohydrate. Les calculs ont été fournis par le service de Néphrologie et d'Urologie du Centre Hospitalier Hassan II de Fès.

II. Méthodes

II.1 Questionnaire de l'enquête

Le questionnaire de l'enquête ethnopharmacologique (Annexe) permet de collecter des informations portant sur les patients et sur les plantes connues par cette population comme anti-lithiasique.

- ✓ Informations sur la personne interrogée : Prénom, âge, sexe, poids.
- ✓ Informations sur les plantes anti-lithiasiques :
  - Fréquence d'utilisation ;
  - Nom des plantes : nom vernaculaire ;
  - Parties utilisées : tiges, racines, feuilles, graines, partie aérienne, ... ;
  - Mode de préparation : décoction, macération, infusion.
- ✓ Date et source d'information.

Une liste des noms vernaculaires des plantes médicinales utilisées par cette population a été créée. Puis, l'identification taxonomique des plantes et la détermination définitive de leurs noms botaniques, leurs noms en français ont été répertoriés.

II.2 Descriptive de la zone d'étude

L'enquête a été réalisée dans la région de Fès-Meknès (Figure 10), située au nord-est du Maroc.

La diversité bioclimatique des milieux écologiques et le caractère montagnard de la région se traduisent par une grande diversité des essences et espèces forestières naturelles (1.446.160 ha de forêts soit 16 % du total national).



Figure 10: Zone d'enquête de la région Fès-Meknès

La région se caractérise par un climat allant du méditerranéen au continental en hiver et chaud en été. Cette région présente des potentialités naturelles, humaines et économiques importantes qui, exploitées de manière rationnelle et intégrée, sont susceptibles de garantir un développement durable et cohérent [301].

L'enquête a été réalisée sur trois sites, à savoir :

- Station thermale Sidi Harazem et Skhinat:

Cette station est réputée pour son eau minérale ayant des vertus curatives pour les maladies du foie et des reins. Les curistes viennent consommer l'eau salvatrice. Il s'agit d'une eau dont la température avoisine les 35°C.

- Centre Hospitalier Universitaire Hassan II Fès (CHU)

Le service de Néphrologie et d'Urologie du Centre Hospitalier Hassan II de Fès nous a autorisé à poser certaines questions à des patients lithiasiques.

- Ancienne médina de Fès ou nous avons questionnée les herboristes.

II.3 Extractions des substances naturelles

II.3.1 Décoction

Lors de cette extraction, le matériel végétal correspondant aux plantes sélectionnées par cette étude est séché, broyé et mis en contact direct avec le solvant qui est l'eau et laissé chauffer

jusqu'à ébullition pendant 30 minutes. Le mélange obtenu est filtré et évaporé sous vide. L'extrait sec obtenu est récupéré et mis dans des flacons teintés à 4 °C. L'extrait obtenu est un extrait aqueux (EA).

II.3.2 Soxhlet

L'extraction a été faite en utilisant un appareil de type Soxhlet. La technique consiste à introduire une masse donnée de la plante séchée et broyée (25 g) dans une cartouche filtrante et 250 ml de solvant (hydro-éthanolique) dans le ballon. L'extraction est lancée en continue jusqu'à récupération totale des composés extractibles. L'extrait obtenu est un extrait hydro-éthanolique (EHE).

II.3.3 Fractionnement de Tanins

L'extraction par fractionnement de tanins est réalisée selon la méthode décrite par *Bruneton J* [56]. Dans une première étape, on réalise une dilapidation de 30 g de poudre de plante qu'on macère dans 100 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. Après filtration, le marc est récupéré tandis que la chlorophylle et les lipides sont éliminés. Le marc récupéré est repris dans 50 ml d'éther diéthylique puis est filtré pour éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique. Le marc est repris une seconde fois avec 100 ml de méthanol. Il est ensuite filtré puis le filtrat méthanolique est évaporé sous vide pour obtenir un résidu sec. C'est un extrait de tanin pur qui sera pesé.

II.3.4 Fractionnement des flavonoïdes

Le protocole de fractionnement de flavonoïdes a été réalisé selon la méthode décrite par *Bruneton J* [56]. Une quantité de 30 g de poudre de plante est mise à macérer dans 100 ml de méthanol pendant 72 h. Après filtration, le méthanol est évaporé par un évaporateur rotatif à une température de 40 °C sous vide. Le résidu sec obtenu est traité avec 50 ml d'eau tiède pour obtenir un extrait aqueux. Nous avons réalisé une série d'extractions liquide-liquide par une ampoule à décanter avec des solvants non miscibles à l'extrait aqueux. Cette opération permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides sensiblement non miscibles. Elle consiste à ajouter 3x30 ml de chloroforme qui élimine la chlorophylle et les lipides. Ensuite, nous ajoutons 3x30 ml d'éther diéthylique pour extraire les génomes libres et les flavonoïdes. Enfin, l'addition de 3x30 ml d'acétate d'éthyle permet d'éliminer les monosides et provoque la majorité des glycosides flavones. Au cours de ses différentes étapes, on récupère la phase aqueuse. Et au cours de la dernière phase aqueuse, on ajoute 3x30 ml de butanol pour récupérer la phase alcoolique.

Cette dernière phase contenant les flavonoïdes est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Il est ensuite soumis à une évaporation du butanol sous vide à 55°C pour obtenir le résidu sec. Cet extrait de flavonoïdes sera pesé.

II.3.5 Calcul de rendement

Le rendement des extraits ou des fractions a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Avec : } \mathbf{Rendement} = \frac{\mathbf{m\ extrait}}{\mathbf{m\ s}} \times \mathbf{100}$$

- **m** extrait (g) : masse de l'extrait récupéré ou de fraction
- **ms** (g): masse végétale sèche

II.4 Criblage phytochimque des extraits de plantes

Il s'agit de réactions physicochimiques permettant d'avoir des informations qualitatives sur la composition chimique des différents extraits. La révélation des familles chimique est basée sur des réactions colorimétriques et de précipitation par différents réactifs [302].

II.4.1 Tanins

La caractérisation des tanins repose sur leur réactivité en présence du chlorure ferrique. La réaction consiste à ajouter dans un tube à essai 1 ml de l'extrait à 1 ml d'une solution aqueuse diluée de $FeCl_3$ à 1 %. En présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

On distingue entre deux types de tanins :

- Tanins catéchiques : Il s'agit de tanins non hydrolysables.

Ils dérivent des catéchols et des proanthocyanidol par condensation des molécules. Ils sont parfois classés parmi les flavonoïdes au sens large, car de structures voisines. Leurs révélations consistent à ajouter 5 ml d'extrait à 1 ml d'alcool chlorhydrique (5 ml d'alcool 95 °C, 5 ml d'eau distillée, 5 ml d'HCl concentré). Le tout est porté à ébullition pendant 15 minutes.

En présence de tanins catéchiques, il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique.

- Tanins galliques : Il s'agit de tanins hydrolysables.

Ils appartiennent à la grande famille des hétérosides. Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Leur réaction de révélation consiste à ajouter 30 ml d'extrait à 15 ml du réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 %, 15 ml d'acide chlorhydrique concentré). L'ensemble est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes, puis on procède à la filtration et à la saturation du filtrat par 5 g d'acétate de sodium pulvérisé. 1 ml d'une solution de $FeCl_3$ à 1 %

est ajoutée goutte à goutte jusqu'à la formation d'un précipité indiquant la présence des tanins galliques.

II.4.2 Flavonoïdes

La mise en évidence des flavonoïdes dans nos extraits a été faite en utilisant la réaction à la cyanidine. Le principe consiste à mettre dans un tube un volume égal de l'extrait à révéler avec une solution d'alcool chlorhydrique, auquel on ajoute quelques coupeaux de magnésium puis de l'alcool isoamylique, soit 1/5^{ième} du volume par rapport à l'alcool chlorhydrique.
L'apparition d'une coloration rose orangée indique la présence des flavones, une coloration rose violacée indique l'apparition des flavonones et une coloration rouge celle des flavonols.

II.4.3 Saponosides

Les saponosides se caractérisent par leur capacité à former une mousse en présence d'eau. Ainsi leur mise en évidence se fait par observation de la hauteur après agitation d'un extrait dissous dans l'eau pendant 15 secondes et après un repos de 15 min. Une hauteur de mousse d'1 cm indique la présence de saponosides.

II.4.4 Alcaloïdes

Dans un tube a essaie on met 1 ml de l'extrait avec 5 ml d'acide chlorhydrique le tout est chauffé au bain marie, puis on répartit dans deux tubes à essai à raison de deux ml par tube. Le premier tube est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer, l'autre par 5 gouttes de réactif de Dragendorff. La présence des alcaloïdes est indiquée par l'apparition d'un précipité blanc ou brun.

II.4.5 Terpènes et stérol

L'extrait de plante est obtenu à partir d'une macération pendant 24 heures de 1 g de poudre avec 20 ml d'éther. On filtre et ont complète avec de l'eau distillée jusqu'à 20 ml. L'ensemble est évaporé jusqu'à sec dans une capsule de 10 ml d'extrait, puis le résidu est dissous dans 1 ml d'anhydride acétique puis dans 1 ml de chloroforme. On partage le tout dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin, et on met dans le fond du second tube 1 à 2 ml de H_2SO_4 concentré. A la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette, révèle la présence de stérols et triterpènes.

II.4.6 Mucilages

Les mucilages sont constitués de polysaccharides qui gonflent au contact de l'eau en prenant une consistance visqueuse, parfois collante, semblable à la gélatine. Ils sont détectés par la

formation d'un précipité floconneux après l'ajout de 5 ml d'alcool absolu à 1 ml d'une solution d'extrait.

II.4.7 Hétérosides stéroïdiques

On ajoute 10 ml de chloroforme anhydre à 10 ml d'extrait évaporé et on mélange avec 5 ml d'anhydre acétique. On ajoute ensuite quelques gouttes de l'acide sulfurique, on agite puis on laisse reposer le mélange. Le développement d'une coloration violacée virant au vert indique la présence des hétérosides stéroïdiques.

II.4.8 Triterpènes hétérosides

A cinq ml d'extrait, on ajoute 3 ml d'acide sulfurique et 2 ml de chloroforme. S'il y'a apparition d'une coloration rouge marron dans la couche d'interphase, ceci indique la présence des tritépènes hétérosides.

II.4.9 Coumarines

On met 1 g de plante avec de l'eau dans un tube. On recouvre le tube avec du papier imbibé de NaOH dilué. Le tout est porté à ébullition. La présence de coumarines est indiquée par une fluorescence jaune après exposition aux UV.

II.4.10 Glycosides cardiaques

Ces composés sont révélés par l'ajout de deux ml de chloroforme à 1 ml de l'extrait. S'il y'a apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H_2SO_4, ceci indique la présence des glycosides cardiaques.

II.4.11 Oses et holosides

Les oses sont des sucres simples tandis que les holosides sont des associations d'un même ose ou d'oses différents. La présence de ces composés est révélée par la réaction à l'acide sulfurique et quelques gouttes d'alcool saturé avec du thymol qui conduit, en leur présence, à l'apparition d'une coloration rouge.

II.5 Dosages des polyphénols

II.5.1 Phénols totaux

Les phénols totaux ont été estimés en utilisant le réactif du Folin Ciocalteux. Il s'agit d'un acide de couleur jaune. Lorsque les phénols totaux sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteux en un complexe ayant une couleur bleue. La dégradation de la coloration est due aux taux des composés phénoliques oxydés dont la réaction est la suivante : [Oxydation des phénolates ➔ réduction des polyhétérocycles➔ formation d'un complexe molybdène (Mo_8

O_{23}) -tungstène (W_8 O_{23})]. Ce complexe est de couleur bleue, stable et absorbe fortement à une longueur d'onde de 765 nm.

Le dosage a été réalisé selon la méthode d'*Akkol EK* [303]. L'extrait de plante (100 µl), convenablement dilué, est introduit dans un tube à essai contenant initialement 6 ml d'eau distillée auquel on ajoute 500 µl du réactif de Folin puis on procède à l'agitation. Après 5 min, une solution de Na_2 CO_3 à 20 % (1,5 ml) est rajouté au mélange tout en agitant le tout. La solution est complétée à 10 ml avec de l'eau distillée. Après une incubation de 2 h à température ambiante, l'absorbance est mesurée avec un blanc fait à partir d'eau distillée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La quantification des polyphénols est déterminée en se basant sur une courbe d'étalonnage linéaire de l'Acide Gallique à différentes concentrations et dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le taux en phénols totaux dans les extraits est ensuite exprimé en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS). Tous les essais sont reproduits trois fois.

II.5.2 Flavonoïdes

La quantification du contenu flavonoique consiste à mélanger 1 ml de la solution de l'extrait avec un volume égal d'une solution de Al $Cl_3.6H_2O$ (2 %). Après 10 min, l'absorbance du mélange est mesurée à une longueur d'onde de 430 nm. La quantification des flavonoïdes est déterminée en se basant sur une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par la Quercetine à différentes concentrations et dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les taux en flavonoides sont exprimés en microgrammes d'équivalent de Quercetine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) [304].

II.6 Dissolution des calculs rénaux *in vitro*

II.6.1 Dispositif expérimental

L'expérience consiste à comparer les effets des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes sélectionnées selon l'enquête ethnopharmacologique ainsi que l'effet des fractions de flavonoïdes et de tanins de *Herniaria hirsuta*, *Opuntia ficus indica* et *Zea mays* et ceci en plaçant les calculs d'oxalate de calcium et fragments de calculs de cystines dans des béchers en présence de 0,5 % d'extrait de plante dans une solution physiologique (9 g de NaCl / L) à température ambiante.

Les calculs ont été laissés au contact des extraits pendant huit semaines, période qui correspond à la durée de traitement recommandée par les médecins.

Tous les 15 jours, les calculs sont sortis du milieu expérimental, lavés à l'eau distillée, séchés à 40 °C pendant 16 heures, puis pesés à l'aide d'une balance de précision pour évaluer la perte de masse et ensuite retournés au milieu pendant les 15 jours suivants. La pesée a été effectuée après deux, quatre, six et huit semaines (S_2 à S_8). Pour chaque expérience, le pH de la solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre type Hanna Instrument PH 209. L'effet des extraits de plantes a été comparé à celles :

- D'une solution aqueuse de citrate de sodium à 3 mmol/L, qui correspond à la concentration moyenne de citrate urinaire obtenue lors du traitement de la cystinurie par alcalinisation des urines.
- D'une solution aqueuse de NaCl à 9 g/L utilisée comme solution témoin.

II.6.2 Détermination du taux de dissolution

L'activité des extraits a été évaluée en calculant le taux de dissolution des calculs après séjour dans le milieu expérimental en comparant le poids résiduel des calculs par rapport à leur poids initial avant l'incubation. Le pourcentage de dissolution a été calculé par la formule :

$$\boldsymbol{TD}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{mi - mf}}{\boldsymbol{mi}} \times \mathbf{100}$$

- **TD %** : Taux de variation de la masse du calcul.
- $\mathbf{m_i}$ (mg). : Masse moyenne initiale du calcul.
- $\mathbf{m_f}$ (mg). : Masse moyenne finale du calcul.

Les valeurs de la masse moyenne initiale (± écart-type) des fragments de calculs et des calculs dans la solution chargée en extrait de plante et dans les solutions témoins sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1: Masse moyenne initiale des calculs et fragments de calculs en mg

Plantes	Type de calcul	
	Oxalate de calcium	Cystine
A. visnaga	140,2 ± 36,6	137,65 ± 2,15
Z. lotus	98,7 ± 17,3	66,65 ± 6,95
O. ficus indica	125,6 ± 24,2	50,55 ± 3,85
Z. mays	247,8 ± 15	41,05 ± 0,05
H. hirsuta	156,4 ± 35,3	39,3 ± 2,2
Solution de NaCl	260 ± 15	203,42 ± 6
Solution de citrate	245 ± 21	240,45 ± 5

II.7 Evaluation de l'activités antioxydantes

Dans notre étude, la mise en évidence *in vitro* de l'activité antioxydante de nos extrais a été réalisée par trois techniques chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et la capacité antioxydante totale.

II.7.1 Piégeage du radicale libre du DPPH

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH˙). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par *Sahin* [304].

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation suivante :

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH·.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait a été mélangé à 2 ml d'une solution méthanolique à 60 µM DPPH fraîchement préparée, puis nous avons agité vigoureusement le mélange et l'avons incubé pendant 20 minutes dans l'obscurité à 25 °C. L'absorbance des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie à 517 nm. Le témoin positif est le BHT. Son absorbance est mesurée selon les mêmes conditions que l'extrait. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH˙ ont été calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(AB - AS)/AB] \times 100$$

AB : Absorbance du contrôle négatif.

AS : Absorbance de la solution contenant l'extrait à tester.

L'activité anti radicalaire est exprimée en IC_{50}, qui est la concentration anti radicalaire nécessaire pour provoquer 50 % d'inhibition. Une valeur IC_{50} inférieure correspond à une activité anti oxydante importante de l'extrait. Le IC_{50} a été calculé à partir des régressions linéaires des graphes tracés : pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits. L'expérience a été répétée trois fois et les résultats ont été exprimés en moyenne ± Ecart type.

II.7.2 Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur de l'extrait des ions Fe^{III+} est déterminé selon la méthode décrite par *Oyaizu* [306]. Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (0,5 ml) sont

mises avec 2,5 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1 %) et 2,5 ml de solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6). Les mélanges sont incubés pendant 20 minutes à 50 °C. On ajoute ensuite 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10 %). Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ (1 %). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le BHT est utilisé comme contrôle positif. L'expérience a été répétée trois fois et les résultats ont été exprimés en moyenne ± ET.

II.7.3 Capacité anti oxydante totale

La CAT des extraits est évaluée par la méthode décrite par *Prieto* [233]. Cette technique est basée sur la formation d'un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

On mélange 3 ml de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium) avec 0,3 ml d'extrait. Les tubes sont vissés et incubés à 95 °C pendant 90 min. La mesure de l'absorbance se fait après refroidissement à 695 nm contre un blanc.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligrammes équivalents de BHT par gramme de la matière sèche (mg BHT/ g MS). L'expérience est répétée trois fois.

II.8 Etudes des propriétés pharmacologiques

II.8.1 Etude de la toxicité

La première étape dans la recherche pharmacologique débute par l'étude de la toxicité ; en particulier la toxicité aiguë. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à tester la toxicité des extraits chez les rats par voie orale, selon la ligne directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OECD) code 423 et 407. Car c'est la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour l'Homme.

II.8.1.1 Toxicité aigue

Le test de toxicité aigüe a été réalisé selon la méthode décrite par l'OECD [279]. Ce test consiste à administrer des doses uniques aux animaux et observer pour toute manifestation de toxicité, augmentation dans l'activité, salivation, convulsion coma et mort. Ces observations sont faites pendant 14 jours.

Ce test a concerné les extraits hydro-éthanoliques des parties aériennes de *Herniaria hirsuta*, des fleurs de *Opuntia ficus indica* et des stigmates de *Zea mays* aux doses de 250 mg/kg, 500 mg/kg et 2000 mg/kg p.c administrées par voie orale.

Les rats traités (5 par groupes) sont gardés en observation de façon continue depuis le jour de gavage pour noter toute perturbation immédiate. L'observation des variations de poids, de taux de mortalité, de comportement de l'animal et des signes de toxicité est réalisée également durant les 14 jours qui suivent l'exposition afin de déceler d'éventuels effets retardés des extraits.

Les signes de toxicité recherchés sont observés sur le plan expérimental par un aspect général de l'animal, son poids corporel, le poids relatif de ses organes, son comportement, sa somnolence, son agitation, etc.

II.8.1.2 Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est l'étude de l'effet d'une substance quelconque sur des animaux de laboratoire auxquels on administre une dose de façon réitérée, pendant une longue période.

La toxicité à doses répétées correspond aux effets toxiques généraux résultant de l'exposition journalière répétée à une substance sur une durée spécifique [280]. Il peut s'agir d'effets sur le poids ou le gain de poids corporel, sur le poids absolu et/ou relatif des organes et tissus, sur les paramètres urinaires et/ou biochimiques, sur les perturbations fonctionnelles des tissus et organes ou d'altérations pathologiques observables à l'examen macroscopique et microscopique.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des effets qui nécessitent une longue période de latence ou des effets cumulatifs. Les tests de toxicité à doses répétées permettent également de déterminer les organes cibles et le caractère réversible des effets toxiques, ainsi que de définir la relation dose-réponse et le seuil pour chaque effet toxique observé.

Pour ce faire, nous avons travaillé avec les extraits hydro-éthanoliques des parties aériennes de *Herniaria hirsuta*, des fleurs de *Opuntia ficus indica* et des stigmates de *Zea mays* à la dose de 500 mg/kg p.c administré par voie orale. Les animaux (5 par groupe) sont suivis pendant 28 jours pour d'éventuels effets indésirables et pour surveiller une éventuelle mortalité. L'étude de la toxicité subaiguë permet :

- D'évaluer la toxicité d'une substance administrée à plusieurs reprises. Cette toxicité résulte du produit lui-même et/ou de ses métabolites.

- De mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par l'administration réitérée des extraits et d'établir leur apparition en fonction de la posologie.
- De définir les limites de l'innocuité expérimentale.
- D'apprécier le degré de réversibilité des effets toxiques.

II.8.1.3 Poids Relatif des Organes (ROW)

L'effet de l'administration, unique ou répétée, des extraits par voie orale ou locale et leurs effets sur le poids corporel, le comportement, l'aspect et le poids relatif des organes a été évalué chez les rats.

Le poids relatif des organes (ROW) a été calculé par la formule suivante [307] :

ROW = (poids de l'organe/poids corporel) * 1000

II.8.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire : Modèle d'inflammation aigue chez le rat (œdème à la carragénine)

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo* selon la méthode décrite par *Winter* [266]. Cette dernière consiste à diviser les animaux en 4 groupes de 5 rats chacun. Le groupe I servait de groupe témoin recevant une solution saline normale à 0,9 %. Les groupes II et III ont été gavés à des doses de 250 et 500 mg / kg par les extraits hydro-éthanoliques de *Herniaria hirsuta*, *Opuntia ficus indica* et *Zea mays*. Les animaux du groupe IV ont été traités avec 10 mg / kg d'indométacine.

Une heure après l'administration par voie orale, 0,1 ml de carragénine à 0,5 % (dans une solution saline normale) a été injecté par voie sous-cutanée (intradermique) dans la face plantaire de la patte postérieure droite de chaque rat.

La circonférence de la pâte est mesurée avant l'injection de la carragénine, puis au bout de chaque heure à partir de la troisième heure jusqu'à la sixième heure après l'administration de la carragénine. Le degré d'œdème dans la patte arrière pour chaque rat et le pourcentage d'inhibition d'inflammation a été calculé selon la formule suivante :

$$\%\ \boldsymbol{inhibition} = \frac{(\boldsymbol{S_t - S_0})\boldsymbol{controle} - (\boldsymbol{S_t - S_0})\boldsymbol{traité}}{(\boldsymbol{S_t - S_0})\boldsymbol{controle}} \times \mathbf{100}$$

S_0 = circonférence avant injection de la carragénine

S_t = circonférence à un temps donné après administration de la carragénine.

II.8.3 Evaluation de l'activité analgésique

II.8.3.1 Méthode de l'acide acétique

L'effet analgésique a été évalué suivant le nombre de contorsions abdominales induites par l'injection intra péritonéale de l'acide acétique suivant la méthode décrite par *Hernandez* [308], ce qui provoque chez les rats une réaction typique de crampes, réaction caractérisée par de vagues de contractions et d'élongations de la musculature abdominale suivies par l'extension des pattes postérieures.

Les rats sont répartis en 5 groupes : Le groupe I servait de groupe témoin recevant une solution saline normale à 0,9 %. Le groupe II, témoin positif, reçoit le diclofénac à 1 %. Quant aux groupes III, IV et V ils leur ont été administré oralement des extraits hydro-éthanoliques de *Herniaria hirsuta*, *Opuntia ficus indica* et *Zea mays* aux doses de 500 mg/kg - 250 mg/kg et 500 mg/kg p.c successivement. Après une heure et demi, l'acide acétique à 0,7 % est injecté par voie intra péritonéale (IP) à la dose de l0 ml/kg. Chaque rat est ensuite placé dans une enceinte en Plexiglas transparente. Le nombre de contractions abdominales est évalué sur un intervalle de 30 minutes après 5 minutes de l'injection de l'acide acétique.

Le nombre total de contractions abdominales, permettant de calculer, le pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque lot traité par les différentes doses des extraits et d'acide acétique, en comparant la moyenne du lot traité avec celle du lot témoin.
Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante [309] :

$$\%\ \boldsymbol{inhibition} = \frac{\boldsymbol{N_c - N_t}}{\boldsymbol{N_c}} \times \mathbf{100}$$

$\mathbf{N_c}$: Nombre de contorsion du lot contrôle

$\mathbf{N_t}$: Nombre de contorsion du lot traité

II.8.3.2 Méthode de Formalin

La méthode utilisée dans la présente étude est similaire à celle décrite précédemment et est donnée par *De Miranda* [310]. Elle consiste à injecter par voie sous-cutanée 20 µl de formol à 20 % dans la patte postérieure droite de souris placées dans une enceinte transparente. Pendant une durée de 5 min avant cette procédure, chaque souris est autorisée à s'adapter à la zone de test en la laissant librement en mouvement (accoutumance). Le léchage de la patte induit par le formol est considéré comme une indication du comportement nociceptif. A l'aide d'un chronomètre, on enregistre le temps total passé à lécher et à mordre la patte injectée, ce qui permet de quantifier le comportement nociceptif. Cependant, le test au formol chez le

rongeur comprend deux phases successives [311], La réponse nociceptive initiale atteint normalement son maximum 5 minutes après l'injection de formol (phase précoce). Et entre 15 et 30 minutes après l'injection de formol (phase tardive). Ce qui correspond aux réponses chroniques et inflammatoires à la douleur.

Les rats sont répartis en 5 groupes : Le groupe I, servait de groupe témoin recevant une solution saline normale à 0,9 %. Le groupe II, témoin positive revoit du Diclofénac à 1 %, les groupes III, IV et V ont été administré oralement des extraits hydro-éthanoliques de *Herniaria hirsuta*, *Opuntia ficus indica* et *Zea mays* aux doses de 500-250 et 500 mg/kg p.c successivement. Les animaux ont été prétraités par voie intrapéritonéale 30 min au préalable.

II.8.4 Activité anti-lithiasique *in vivo*

Comme chez les humains, la formation chez les rats normaux des calculs urinaires de type oxalo-calcique n'est pas spontanée. La lithiase oxalo-calcique expérimentale chez le rat peut être induite par différentes procédures, soit par injection d'oxalate, soit par addition de la pyridoxine au régime alimentaire ou encore par addition de précurseurs d'oxalate comme l'éthylène glycol.

L'éthylène glycol (EG) dont la formule chimique est $C_2 H_6 O_2$ est un liquide chimique synthétique utilisé dans presque tous les produits liquides pour radiateurs et utilisé comme solvant, émulsifiant ou tensioactif. Ses métabolites comprennent l'acide glycolique, l'acide glyoxylique et l'acide oxalique.

Plusieurs travaux [312-315], ont prouvé que l'addition de l'éthylène glycol à l'eau de boisson à une dose de 0,75 % induits chez les rats mâles la formation des calculs rénaux, formés principalement par des cristaux d'oxalate de calcium, et ce en 14 jours seulement. Quand les rats sont traités par l'éthylène glycol et le chlorure d'ammonium, le dépôt des cristaux rénaux est accéléré. Dans nos expériences nous avons utilisé l'éthylène glycol seul à 0,75 %.

Nous avons opté pour la Cystone qui est un médicament utilisé comme anti-lithiasique, à des doses de 500 et 750 mg / kg / pc. Elle a un effet protecteur contre l'urolithiase induite expérimentalement chez le rat. La cystone est utilisée pour prévenir et faciliter le passage des calculs rénaux de la cystéine [316].

II.8.4.1 Dispositif expérimental

Les animaux ont été hébergés dans des cages métaboliques 3 jours avant le début de l'expérience pour l'adaptation et ont été divisés en sept groupes, chacun contenant six animaux.

- Groupe I (contrôle) : les rats étaient nourris régulièrement et ont reçu seulement de l'eau potable à volonté pendant 30 jours.
- Groupe II (contrôle négatif) : les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans l'eau de boisson à volonté pendant 30 jours.
- Groupe III (groupe EG- Cystone) : les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans de l'eau potable à volonté avec gavage de Cystone 500 mg / kg / pc pendant 30 jours.
- Groupe IV : (Groupe des EG-*Zea mays*) : les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans de l'eau potable à volonté avec gavage de l'extrait hydro éthanolique de *Zea mays* à une dose de 500 mg / kg / pc pendant 30 jours.
- Groupe V : (Groupe des EG- *Opuntia ficus indica*) : les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans de l'eau potable à volonté avec gavage de l'extrait hydro éthanolique de *Opuntia ficus indica* à une dose de 250 mg / kg / pc pendant 30 jours.
- Groupe VI (Groupe des EG- Tanins de *Zea mays*) : les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans de l'eau potable à volonté avec gavage de la fraction de tanins de *Zea mays* à une dose de 76 mg / kg / pc pendant 30 jours.
- Groupe VII (Groupe des EG- Flavonoïdes de *Zea mays*) les rats ont reçu 0,75 % d'EG dans de l'eau potable à volonté avec gavage de la fraction de flavonoïdes de *Zea mays* à une dose de 15 mg / kg / pc pendant 30 jours.

II.8.4.2 Collecte et analyse des urines

Les rats ont été gardés individuellement dans des cages métaboliques pour la collecte d'échantillons d'urine de 24 heures aux jours 0, 7, 14, 21 et 30 du traitement. Le pH et le volume urinaire ont été mesurés immédiatement après le prélèvement.

Les échantillons d'urine recueillis au jour 30 ont été acidifiés par addition d'acide chlorhydrique puis ont été concentrés conservés à 20°C pour la détermination de divers paramètres. L'urine a été analysée pour le calcium, le phosphate et le magnésium.

II.8.4.3 Etude de la cristallurie urinaire

L'urine a été collectée dans tous les groupes après 30 jours d'interventions et un examen au microscope photonique a été effectué pour identifier les cristaux urinaires.

II.8.4.4 Analyses des paramètres biochimiques

Après 30 jours d'expérience, des échantillons de sang ont été prélevés chez les animaux anesthésiés dans tous les groupes. Le sang a été analysé dans un laboratoire d'analyses médicales à Fès pour déterminer la créatinine, l'urée, l'acide urique. La fonction hépatique a été évaluée en mesurant la phosphatase alcaline sérique (ALP), l'alanine aminotransférase (ALT), la gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) et l'aspartate aminotransférase (AST).

II.8.5 Analyse statique

L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA à travers Graphpad prism 8 suivi par le test Tukey, la valeur de $p < 0,05$ a été considérée significative.

Les corrélations entre les paramètres sont assurées par calcul du coefficient de corrélation de Pearson. L'analyse multi variée, comme outil de réduction de dimensions et d'intégration de l'information de plusieurs variables, a été faite par analyse de composante principale sous Multibuplot (Matlab R2017a). Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type.

PARTIE III :

Résultats et Discussion

CHAPITRE I :

Etude ethnopharmacologique des plantes médicinales à vertu anti-lithiasique

I. Introduction

Dans le but de dresser un inventaire des plantes médicinales utilisées traditionnellement dans le traitement de la lithiase rénale et de collecter autant d'informations possibles sur les utilisations thérapeutiques et les recettes rapportées par la population de la région de Fès-Meknès, Nous avons eu recours à une enquête ethnobotanique entreprise au cours des trois dernières années dans la préfecture de Fès à savoir : la commune urbaine de Fès-Médina, dans le centre hospitalier universitaire Hassan II, Sidi Hrazem qui comprend la source thermale et la ville de Skhinat.

II. Enquête ethnopharmacologique

Le Tableau 2 regroupe les résultats de l'enquête ethnopharmacologique réalisée dans la préfecture de Fès. Il affiche l'ensemble des plantes utilisées dans le traitement des calculs rénaux, les modes d'utilisation, les parties utilisées et les fréquences d'utilisation de chaque plante.

Tableau 2: Liste des différentes plantes utilisées traditionnellement dans le traitement de la lithiase rénale, aussi la partie utilisée, le mode d'utilisation et leurs fréquences d'utilisation dans la préfecture de Fès.

Familles	Nom scientifique	Voucher	Nom vernaculaire	PU	MU	FU (%)
Aloeaceae	*Aloe barbadensis*	RAB064442	Sebar صبار	PA	C	0,79
Anacardiaceae	*Pistacia atlantica Desf.*	RAB38238	Betma بطمة	PA	D	1,05
Apiaceae	*Ammi visnaga L.*	RAB76986	Bechnikha بشنيخة	Fr	D	4,74
	Ammodaucus leucotrichus Coss. & Durieu	RAB62313	Kamoun soufi كمون صوفي	G	D	1,05
	Apium graveolens L.	RAB38370	Krafes كرافس	PA	D/IN	1,84
	Carum carvi L.	RAB39451	Karwia كروية	Fr	D/IN	1,05
	Coriandrum sativum L.	RAB76745	Qezborقزبر	Fr/PA	IN/Pw	1,84
	Daucus carota L.	RAB296469	Khizo خيزو	Fr/G	D	1,32
	Foeniculum vulgare Mill.	RAB309676	Nafaa نافع	G	IN	2,11
	Petroselinum sativum Schübler. & Martens	RAB40104	Maadnous معدنوس	F/PA	D/IN	4,21
	Pimpinella anisum L.	RAB1255256	Habaat hlawa حبة حلاوة	Fr	D/IN	0,79
Apocynaceae	*Caralluma europaea Guss.*	RAB005358	Daghmous دغموس	PA	C	0,79

Familles	Nom scientifique	Voucher	Nom vernaculaire	PU	MU	FU (%)
Asteraceae	*Anthemis nobilis L.*	RAB4117421	Babounj بابونج	PA/ FL/F	D	0,79
	Artemisia herba-alba asso.	RAB331471	Chih شيح	G	D	0,79
Brassicaceae	*Lepidium sativum L.*	RAB622089	Hebb rchad حب رشاد	G	D/IN	0,79
	Raphanus sativus L	RAB635844	Fjel فجل	G	D	1,58
Cactaceae	*Opuntia ficus-indica L.*	RAB1264407	Hendi هندية	FL	D/IN	7,11
Camelliaceae	*Camellia sinensis L.*	RAB4511659	Atay أتاي	F	D	0,79
Capparidaceae	*Capparis spinosa L.*	RAB125618	Kbar كبار	Fr	D	1,32
Caryophyllaceae	*Herniaria hirsuta L.*	RAB090814	Herras lhejr هراس لحجر	PA	D/IN	11,84
Euphorbiaceae	*Euphorbia falcata L.*	RAB077696	Hayat nufus حيات نفوس	Pe	D/IN	1,32
Fabaceae	*Ceratonia siliqua L.*	RAB93948	Kharub خروب	Fr	D	0,79
	Glycyrrhiza glabra L.	RAB07693	Araq sus عرق سوس	R	D	1,58
	Medicago sativa L.	RAB111097	Fessa فصة	G	D	0,79
	Ononis natrix L.	RAB091293	Henet reg حنة رغ	PA	D	0,79
	Trigonella foenum-graecum L	RAB152969	Helba حلبة	G	M	1,05
Iridaceae	*Crocus sativus L*	RAB151373	Zaafran lhor زعفران حر	St	D	1,32
Juncaceae	*Juncus acutus L.*	RAB052678	Smar سمار	G	D	1,58
Lamiaceae	*Marrubium vulgare L.*	RAB476943	Merriwa مريوة	PA	D	1,32
	Lavandula dentata L.	RAB191686	Khzama خزامة	PA	D	1,05
	Lavandula multifida L.	RAB448543	Khila خيلة	PA	D	1,32
	Origanum compactum Benth.	RAB250616	Zaater زعتر	F	D/IN	1,84
	Rosmarinus officinalis L.	RAB180597	Azir أزير	F	D	2,63
Lauraceae	*Cinnamomum verum J. Presl*	RAB2011675	Querfa قرفة	PE	D	0,79
Liliaceae	*Allium cepa L.*	RAB464589	Besla بصل	B	D	2,11
	Allium porrum L.	RAB464577	Korat كرات	Pe/B	D	0,79
	Allium sativum L.	RAB464570	Touma ثوم	B	D	1,58
Linaceae	*Linum usitatissimum L.*	RAB111298	Zeriat lketan زريعة كتان	FL	D	0,79

Familles	Nom scientifique	Voucher	Nom vernaculaire	PU	MU	FU (%)
Myrtaceae	*Eucalyptus globulus Labill.*	RAB1180934	Kaliptus كاليبتوس	F	D	1,58
	Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L. M. Perry	RAB232972	Qronfel قرنفل	G	D	0,79
Papaveraceae	*Papaver rhoeas L.*	RAB398937	Belaaman بلعمان	FL/F	D/IN/Ct	1,32
Poaceae	*Agropyrum repens L.*	RAB236362	Njem نجم	RZ/PA	D	2,11
	Cynodon dactylon L.	RAB2249455				0
	Zea mays L	RAB1108434	Dra ذرة	St	IN/D	7,89
Punicaceae	*Punica granatum L.*	RAB1271332	Reman رمان	Pe	IN	1,58
Ranunculaceae	*Nigella sativa L.*	RAB547275	Sanouj سانوج	G	D/IN	1,05
Rhamnaceae	*Zizyphus lotus L.*	RAB357564	Nbeg نبغ	Fr/F	D	6,32
Rosaceae	*Fragaria vesca L.*	RAB508768	Frése lberi فريز	Fr	C	0,79
	Prunus cerasus L.	RAB1209802	Heb lmlouk حب الملوك	Fr	C	0,79
	Rubus fruticosus L.	RAB1192748	Touth ثوث	F/Fr/R	D	0,79
Rubiaceae	*Rubia tinctorum L.*	RAB1108650	Fowa فوة	R	D	0,79
Thymelaeaceae	*Thymelaea lythroides Barratte & Murb.*	RAB262158	Metnan مثان	PA	D/IN	1,05
Urticaceae	*Parietaria officinalis L.*	RAB320763	Hriga melsa حريغة ملسة	PA	IN/D	1,58
	Urtica urens L.	RAB671735	Hriga hercha حريغة حرشة	PA	IN/D	1,58

PU : Partie Utilisée; MU : Mode d'Utilisation ; FU : Fréquence d'Utilisation; PA : Partie aérienne ; Fr : Fruits ; R : Racine ; F : Fleurs ; B : Bulb ; RZ : Rhizome ; St : Stigmate; PE : Plante Entière ; G : Graine ; F : Feuille ; Pe :Péricarpe ; D : Décoction ; In : Infusion ; M : Macération ; C : Cru ; Pw : Poudre ; Ct : Cataplasme.

III. Profil de l'informateur

III.1 Utilisation des plantes médicinales selon le sexe

Les résultats de l'enquête ethnopharmacologique ont montré que l'utilisation des plantes médicinales varie selon le sexe (Figure 11), où les femmes utilisent les plantes plus que les hommes.

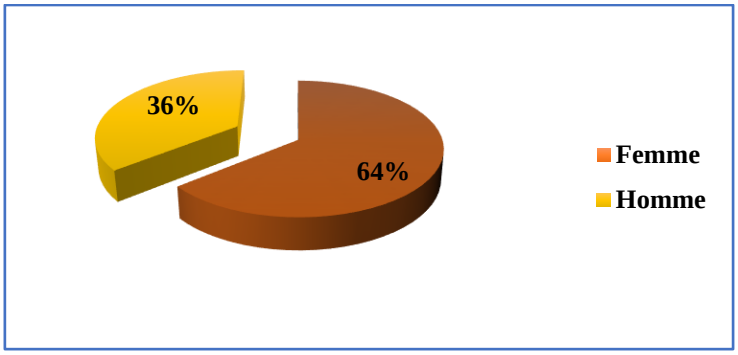


Figure 11: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales selon le sexe

III.2 Utilisation des plantes médicinales en fonction de l'âge

L'enquête ethnopharmacologique nous a permis de constater que l'utilisation des plantes médicinales dans la préfecture de Fès est répandue chez toutes les tranches d'âge (Figure 12). Cependant, les personnes d'âge supérieur à 60 ans montrent un pourcentage d'utilisation des plantes médicinales relativement importante qui est de 24 %. Les résultats obtenus montrent également que les personnes qui appartiennent à la classe d'âge de 40 à 60 ans ont plus recours aux plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. Néanmoins les moins de 20 ans ont un recours aux plantes médicinales négligeable avec un pourcentage moindre à 6 %.

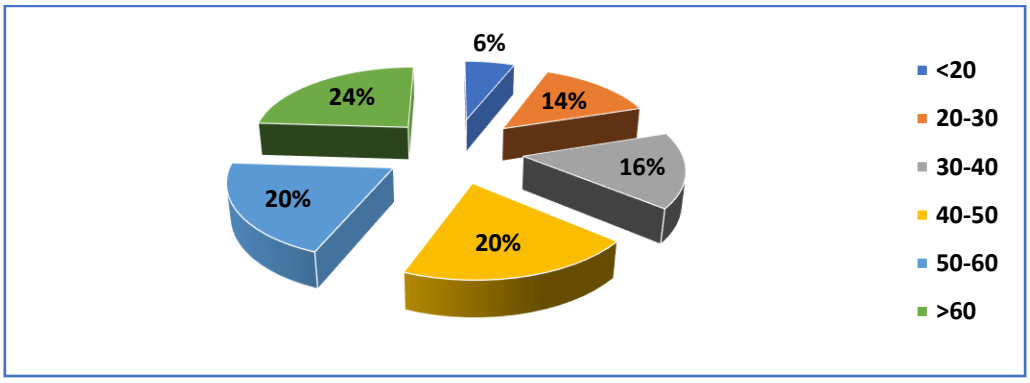


Figure 12: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales selon l'âge

III.3 Utilisation des plantes médicinales en fonction du niveau d'étude

Selon l'enquête la majorité des usagers des plantes médicinales traditionnelles sont les non scolarisés avec un pourcentage de 58 %. Néanmoins, les personnes ayant un niveau d'étude ne dépassant pas le primaire ont un pourcentage d'utilisation non négligeable de 21 %, alors que ceux ayant un niveau d'études secondaires et universitaires utilisent très peu les plantes médicinales avec 12 % et 9 % respectivement.

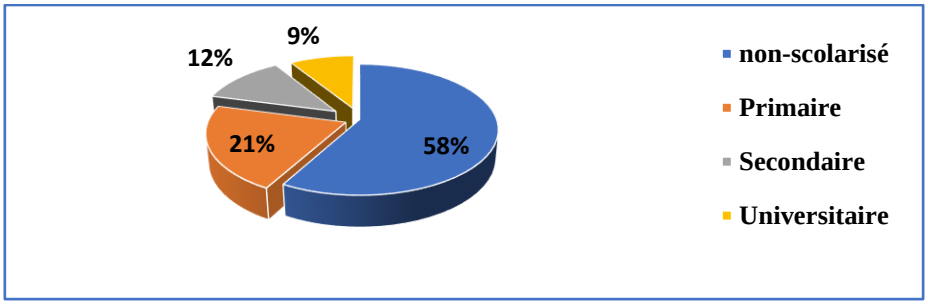


Figure 13: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales en fonction du niveau d'étude

III.4 Utilisation des plantes médicinales en fonction de la situation familiale

Les résultats de l'enquête (Figure 14) nous ont permis de remarquer que les plantes médicinales traditionnelles sont beaucoup plus utilisées par les personnes mariées que par les célibataires.

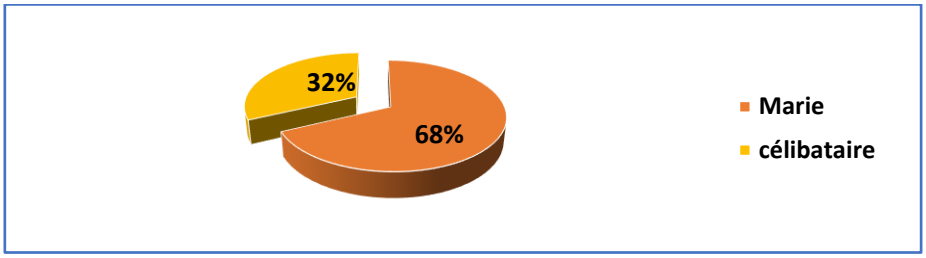


Figure 14: Pourcentage d'utilisation des plantes médicinales en fonction de la situation familiale

IV. Analyse des données en fonction des plantes utilisées

IV.1 Aspect floristique

L'analyse floristique des espèces retenues par l'enquête réalisée a permis d'identifier 54 espèces appartenant à 28 familles botaniques. Le classement des familles fondé sur le pourcentage d'utilisation locale montre une prédominance d'utilisation de sept familles d'espèces : les *Apiaceae* (9 espèces soit 18,95 %), les *caryophyllaceae* (1 seule espèce soit 11,84 %), les *Poaceae* (3 espèces soit 10 %), les *lamiaceae* (5 espèces soit 8,16 %), les *Cactaceae* (1 espèce soit 7,11 %), les *Rhamnaceae* (1 espèce soit 6,32 %), les *Fabaceae* (5 espèces soit 5 %).

IV.2 Parties utilisées

Les parties des espèces utilisées sont principalement : les parties aériennes, le rhizome, les fruits, les stigmates, les fleurs, les plantes entières, les graines, les racines, le péricarpe, les feuilles et les bulbes.

La Figure 15 montre que les parties aériennes (avant fructification) sont les parties les plus utilisées par la population avec un pourcentage de 29,63 %. Les fruits et les graines avec 20,37 % chacun, les feuilles avec 16,67 %, les fleurs avec 7,41 %, les bulbes et les racines avec 5,56 % chacune, la plante entière et le péricarpe avec un pourcentage de 3,70 % chacun, le rhizome et les stigmates avec 1,85 % chacun.

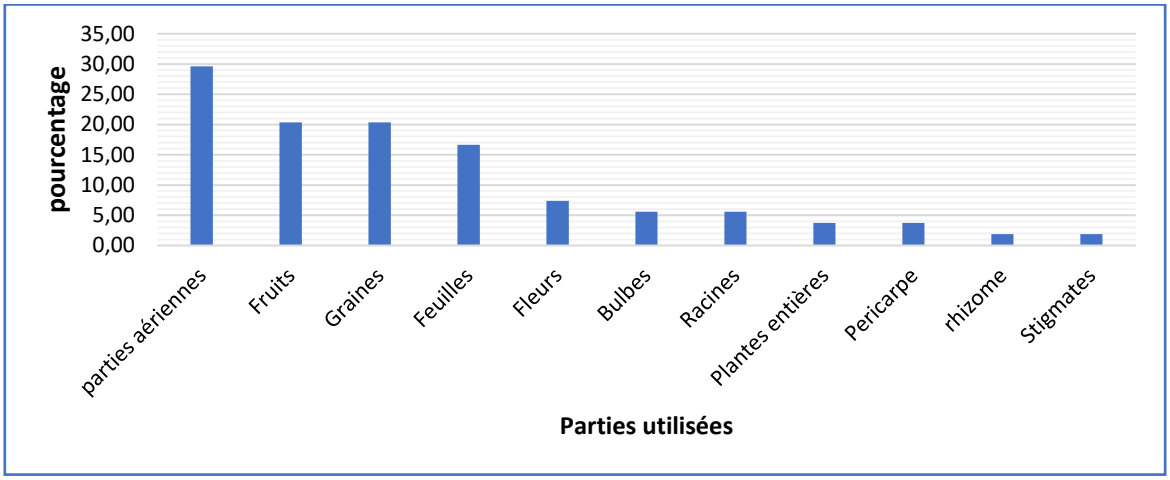


Figure 15: Pourcentage d'utilisation des différentes parties des plantes

IV.3 Mode de préparation

L'enquête révèle plusieurs modes de préparation à savoir : la décoction, l'infusion, la macération, le cataplasme, la poudre ou la plante crue.

La décoction est le mode de préparation le plus utilisé avec 81,48 %, infusion 33,33 %, plantes crues 7,41 %, macération, cataplasme et la plante en poudre ont un pourcentage chacun de l'ordre de 1,85 %.

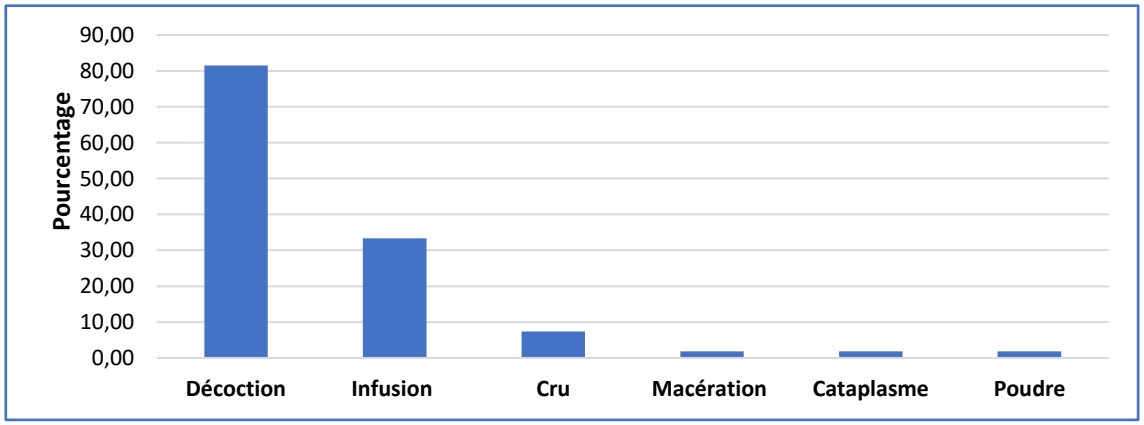


Figure 16: Répartition des différents modes de préparation

IV.4 Plantes médicinales fréquemment utilisées dans le traitement des calculs rénaux

Dans cette étude les résultats du Tableau 2 montrent que la plante la plus utilisée est *Herniaria hirsuta* avec un pourcentage de 11,84 %, suivie de *Zea mays L*. 7,89 %, *Opuntia ficus indica* L 7,11 %, *Zizyphus lotus* L 6,32 %, *Ammi visnaga* L 4,74 % et *Petroselinum sativum* 4,21 %.

IV.5 Plantes retenues par l'étude

A partir de cette étude ethnopharmacologique, cinq plantes ont été sélectionnées : *Herniaria hirsuta, Zea mays L., Opuntia ficus indica* L, *Zizyphus lotus* L et *Ammi visnaga* L. Ce choix a été basé sur :

- ✓ Leur fréquence d'utilisation dans l'usage traditionnel ;
- ✓ Leur abondance ;

V. Discussion

L'enquête ethnopharmacologique a été réalisée dans la préfecture de Fès précisément dans la commune urbaine de Fès-Médina, dans le centre hospitalier universitaire Hassan II, la source thermale de Sidi Hrazem et Skhinat. Cette dernière nous a permis de collecter un certain nombre d'informations que l'on peut répartir en deux parties : La première s'intéresse au profil de l'informateur et la seconde partie aux plantes utilisées traditionnellement par cette population.

Les résultats obtenus montrent que les femmes utilisent les plantes plus que les hommes, ces résultats confirment les données obtenues par d'autres travaux ethnobotaniques menés à l'échelle nationale [176]. Ces travaux avaient indiqué que, de manière générale, les femmes possédaient davantage des connaissances traditionnelles en phytothérapie et qu'elles utilisaient plus de plantes médicinales que les hommes. Il est à mentionner que :

- Les femmes sont davantage connectées aux pratiques traditionnelles ;
- La facilité de transmission de l'information entre les femmes ;
- Les femmes bénéficient davantage des propriétés médicinales pour soulager la douleur de leurs enfants et maintenir la santé de leurs familles [317-321].

L'utilisation des plantes est plus fréquente chez les personnes âgées vu que la connaissance des propriétés et usages des plantes médicinales sont généralement acquises suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. Cette transmission est actuellement en danger parce qu'elle n'est pas toujours assurée [322].

D'autres études ont montré que le savoir de la population sur l'utilisation des plantes médicinales est détenu principalement par les personnes illettrées [170,178,181,323].

Les résultats obtenus montrent que les mariés utilisent les plantes plus que les célibataires. Cela peut être due à la responsabilité des couples envers les membres de leurs familles, cherchant ainsi à satisfaire leurs soins de santé en utilisant des remèdes naturels, efficaces et moins coûteux que les traitements recommandés par le médecin ou le pharmacien. Ce résultat est également obtenu par d'autres études ethnobotaniques prouvant que les personnes mariées utilisent beaucoup plus les plantes médicinales que les célibataires [170,178,181,323].

Le pourcentage élevé de l'utilisation de la partie aérienne par la population peut être expliqué par le fait qu'elle représente le siège de la photosynthèse et parfois du stockage des métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante [324].

La décoction représente le mode d'utilisation le plus fréquent. Ceci montre que la population fait confiance à ce type de préparation et le trouve simplement adéquat pour réchauffer le corps. Par ailleurs, la décoction permet de recueillir le plus de principes actifs atténuants ou annulant l'effet toxique de certaines recettes. L'utilisation de ce type de traitement reste liée au fait qu'il est moins prohibitif.

VI. Conclusion

L'enquête ethnopharmacologique réalisée dans ce travail a révélé une multitude de résultats sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement des calculs rénaux, les parties utilisées et les modes de préparation. Les résultats de l'enquête ont permis d'identifier 54 espèces dont les familles les plus représentées sont les *Apiaceae, les caryophyllaceae et les Poaceae*.

Les résultats de l'enquête montrent que les parties aériennes des plantes constituent la partie la plus utilisée. Ainsi que la décoction et l'infusion sont les modes de préparation les plus pratiqués. Cette étude a permis d'identifier les plantes les plus utilisées dans la préfecture de Fès pour le traitement traditionnel de la lithiase rénale à savoir : *Herniaria hirsuta* L, *Zea mays L.*, *Opuntia ficus indica* L, *Zizyphus lotus* L et *Ammi visnaga* L.

Afin de valoriser et de confirmer le pouvoir thérapeutique des plantes sélectionnées, nous avons décidé d'étudier leurs phytochimies et aussi leurs propriétés antioxydantes.

CHAPITRE II :

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits des plantes de l'étude

I. Introduction

Dans ce chapitre nous avons réalisé un criblage phytochimique des extraits aqueux et hydro-éthanoliques des plantes retenues par l'enquête ethnopharmacologique. Aussi qu'un dosage des phénols totaux et des flavonoïdes. L'activité antioxydante a été réalisée par trois méthodes différentes.

II. Rendement des extraits hydro-éthanoliques par Soxhlet et aqueux par Décoction

Les rendements de l'extraction sont consignés dans le Tableau 3. On remarque que les rendements des extraits hydro-éthanoliques (EHE) dépassent largement ceux des extraits aqueux (EA).

Nous constatons que l'EHE des fruits de *Z. Lotus* enregistre un fort rendement, suivi de l'extrait de la partie aérienne de *H. hirsuta*. Les stigmates de *Z. mays* enregistrent un rendement moindre que les précédents, tandis que les fleurs de *O. ficus indica* ont un rendement de 31,4 % et 23,4 % pour les graines de *A. visnaga*.

L'examen des EA montre que l'extrait des fruits de *Z. Lotus* enregistre le rendement le plus important, suivi de l'extrait des stigmates de *Z. mays*, *H. hirsuta*. Quant aux graines de *A. visnaga* et aux fleurs de *O. ficus indica* elles ont les rendements les plus faibles.

Tableau 3: Rendements des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées

	Rendement d'EHE en (%)	Rendement d'EA en (%)
A. visnaga	23,4	18,3
Z. lotus	41,8	38,5
O. ficus indica	31,4	10,2
Z. mays	33,7	20,7
H. hirsuta	36,9	20,6

III. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique des extraits hydro-éthanoliques a montré l'existence des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des terpènes, des stérols et des coumarines dans tous les extraits de plantes. Il y a cependant une absence totale des saponosides et des mucilages. Les hétérosides stéroïdiques et les triterpènes stéroïdiques sont présents dans toutes les plantes à l'exception de *A. visnaga* et *Z. mays*. Les Glycosides cardiaques sont présents dans les extraits de *Z. mays* et *Z. lotus* et absents dans les autres plantes. Quant aux oses, ils sont présents seulement dans l'extrait de *Z. mays* (Tableau 4).

Tableau 4: Criblage phytochimique des extraits hydro-éthanoliques des plantes étudiées

Plante	T		F	SA	Al	TS	Mc	HS	TH	CO	GC	OH
	Tc	Tg										
A. visnaga	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Z. lotus	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
O. ficus indica	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Z. mays	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
H. hirsuta	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-

T : Tanins ; Tc : Tanins catéchique ; Tg : Tanins gallique ; F : Flavonoïdes ; SA : Saponosides ; Al : Alcaloïdes ; TS : Terpènes et Stérols ; Mc : Mucilages ; HS : Hétérosides Stéroïdiques ; TH : Triterpènes Hétérosides ; CO : Coumarines ; GC : Glycosides Cardiaques ; OH : Oses et Holosides ; + : présence ; - : Absence.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les extraits aqueux sont résumés dans le Tableau 5. La présence des Tanins, des flavonoïdes et des mucilages dans tous les extraits a été détectée. Par contre, on remarque une absence des saponosides, des terpènes et stérols, des triterpènes hétérosides et des oses et holosides. Les alcaloïdes sont présents seulement dans l'extrait de *Z. mays*. Il y a présence des hétérosides stéroïdiques dans tous les extraits de plantes à l'exclusion de l'extrait de *A. visnaga*. Les coumarines sont absentes dans l'extrait de *H. hirsuta*. Quant aux Glycosides cardiaques, ils sont présents seulement dans les extraits de *Z. lotus* et *Z. mays*.

Tableau 5: Criblage phytochimique des extraits aqueux des plantes étudiées

Plante	T		F	SA	Al	TS	Mc	HS	TH	CO	GC	OH
	Tc	Tg										
A. visnaga	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Z. lotus	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
O. ficus indica	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Z. mays	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
H. hirsuta	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

T : Tanins ; Tc : Tanins catéchique ; Tg : Tanins gallique ; F : Flavonoïdes ; SA : Saponosides ; Al : Alcaloïdes ; TS : Terpènes et Stérols ; Mc : Mucilage ; HS : Hétérosides Stéroïdiques ; TH : Triterpènes Hétérosides ; CO : Coumarines ; GC : Glycosides Cardiaques ; OH : Oses et Holosides + : présence ; - : Absence.

IV. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats, du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes des EHE et des EA des différentes plantes étudiées, sont présentés dans les Tableaux 6 et 7.

IV.1 Phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées ont été déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g). La courbe d'étalonnage a été établie avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9998$ (Figure 17).

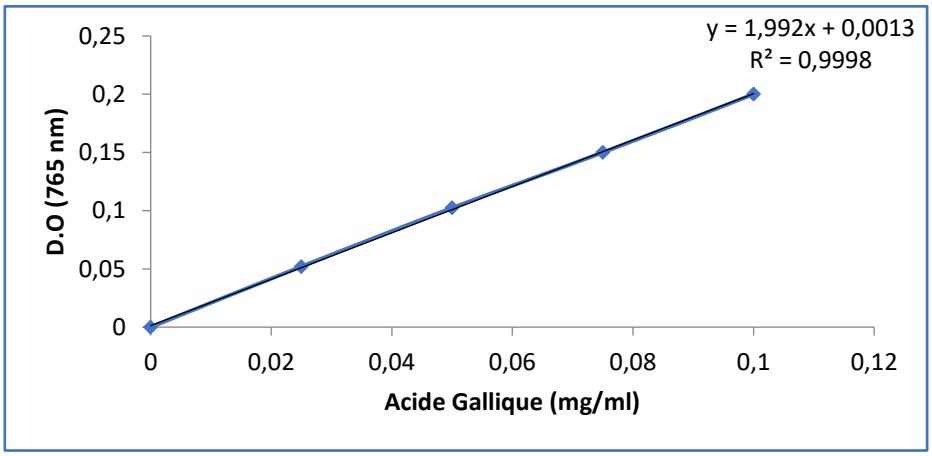


Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 6. Ces résultats montrent que les extrais hydro-éthanoliques ont une teneur en phénols totaux supérieure à celle des extraits aqueux.

Tableau 6: Concentration en phénols totaux des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimée en mg EAG/g extrait

	Extraits hydro-éthanoliques	Extraits aqueux
A. visnaga	63,77 ± 2,45	63,1 ± 1,00
Z. lotus	52,05 ± 0,45	42,52 ± 1,23
O. ficus indica	79,84 ± 4,62	49,54 ± 2,00
Z. mays	70,30 ± 1,45	43,69 ± 3,12
H. hirsuta	67,28 ± 0,89	55,57 ± 5,35

IV.2 Flavonoïdes

La courbe d'étalonnage est établie sur la base d'une gamme étalon de quercétine avec un coefficient de détermination de R^2 = 0,997 (Figure 18). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg Q/g).

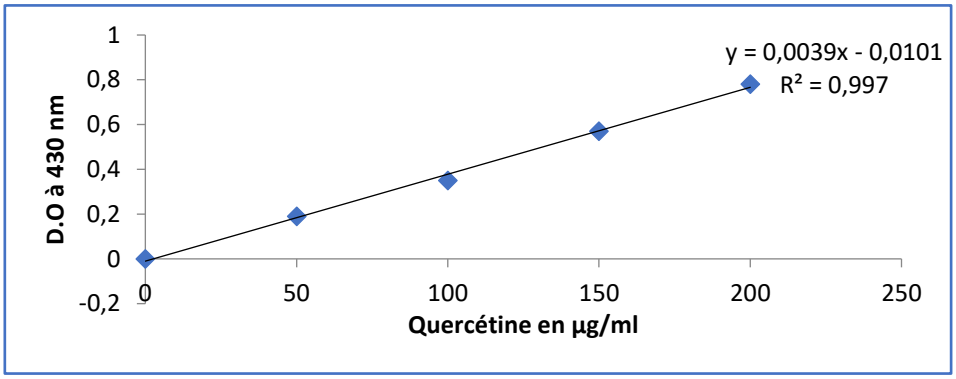


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Le Tableau 7 présente les teneurs des extraits en flavonoïdes. Les résultats montrent que la teneur en flavonoïdes est plus élevée dans les extraits hydro-éthanoliques comparés aux extraits aqueux.

Tableau 7 : Concentration en Flavonoïdes des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimé en mg Q/g extrait

	Extrait hydro-éthanoliques	Extrait aqueux
A. visnaga	7,72 ± 0,08	5,21 ± 0,06
Z. lotus	3,28 ± 0,26	2,10 ± 0,10
O. ficus indica	28,29 ± 0,68	6,23 ± 0,09
Z. mays	25,95 ± 0,36	6,99 ± 1,27
H. hirsuta	13,93 ± 0,12	7,72 ± 0,16

V. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits hydro-éthanoliques et aqueux a été réalisée par trois techniques à savoir : La méthode de réduction du radical libre du DPPH, la mesure du pouvoir réducteur du fer (FRAP) et la capacité antioxydante totale (CAT).

V.1 Piégeage du radical libre du DPPH

L'activité antioxydante des extraits étudiés a été évaluée par le test du radical DPPH permettant de mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Ainsi lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'un atome d'hydrogène, cela donne lieu

à la forme réduite avec une perte de la couleur violette. La décoloration sera proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

L'activité anti-radicalaire des extraits considérés serait exprimée en IC_{50}. Cette activité est présentée comme la concentration de réactif réducteur nécessaire pour réduire à moitié le pourcentage du DPPH en solution [325].

Pour chaque extrait, la IC_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante. Plus la valeur d'IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 8 ci-dessous.

Les résultats du Tableau 8 montrent que les extraits hydro-éthanoliques sont de meilleurs antioxydants que les extraits aqueux. On peut dire que les deux extraits possèdent une activité anti-radicalaire et que la faculté de piéger le radical libre du DPPH par l'extrait hydro-éthanolique est puissante par rapport à l'extrait aqueux. Néanmoins, le pouvoir anti-radicalaire de référence (BHT) reste supérieur à celui des extraits étudiés.

Tableau 8: Valeurs des IC_{50} des extraits hydro-éthanoliques, aqueux et du BHT exprimé en mg/ml

	Extraits Hydro-éthanoliques	Extraits aqueux
A. visnaga	3,19 ± 0,20	8,91 ± 0,22
Z. lotus	6,71 ± 0,88	15,31 ± 0,42
O. ficus indica	3,19 ± 0,07	4,44 ± 0,81
Z. mays	0,67 ± 0,07	3,29 ± 0,18
H. hirsuta	2,82 ± 0,06	8,27 ± 0,28
BHT	0,1702 ± 0,0007	

V.2 Pouvoir réducteur du fer

Les résultats de la Figure 19 montrent que le pouvoir réducteur des deux extraits hydro-éthanoliques et aqueux est proportionnellement dépendant de leur concentration. On note que l'extrait hydro-éthanolique présente une activité réductrice plus importante que celle de l'extrait aqueux. Le pouvoir réducteur des deux types d'extraits reste inférieur à celui de l'antioxydant de référence (BHT).

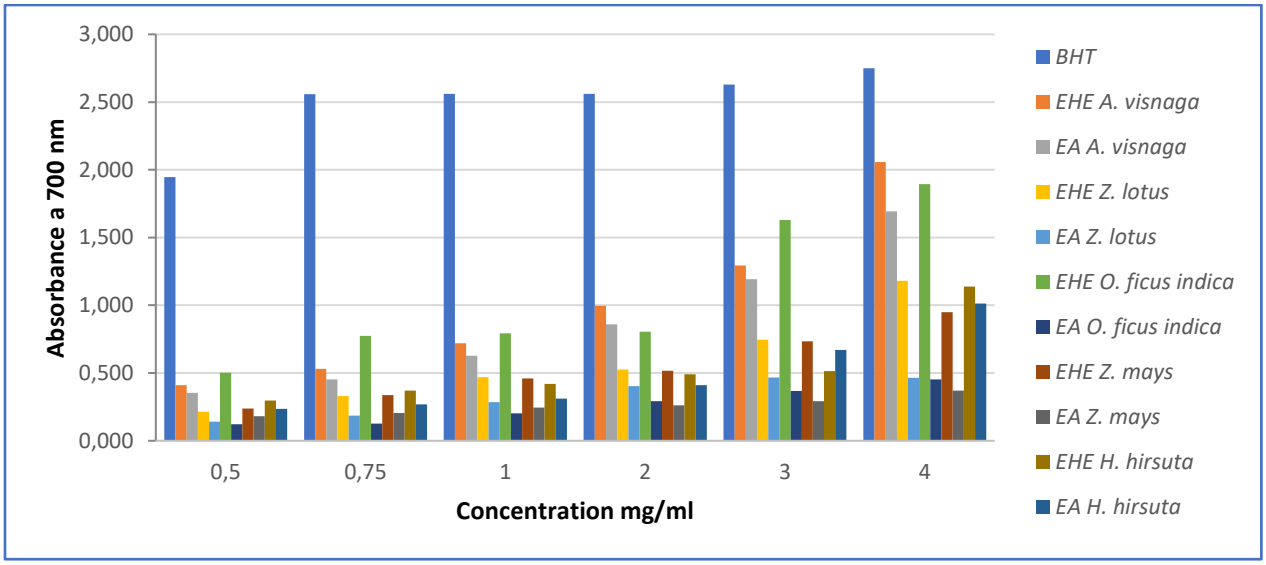


Figure 19: Pouvoir réducteur des extraits hydro-éthanoliques et aqueux comparé à celui du BHT

Les résultats sont exprimés en intensité IC_{50}. Pour chaque extrait, l'IC_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante. Plus la valeur d'IC_{50} est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est forte. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 9 ci-dessous.

Les résultats révèlent que tous les extraits sont des donneurs d'électrons et qu'ils sont capables de réduire les ions Fe^{3+} de manière linéaire en fonction de la concentration.

D'après le Tableau 9, la classification des extraits est comme suite *Z. mays*, *O. ficus indica*, *H. hirsuta*, *A. visnaga* puis *Z. lotus.* Les extraits Hydro-éthanoliques ont toujours une meilleure activité comparée aux extraits aqueux, mais le pouvoir réducteur des deux types d'extraits demeure inférieur à celui de l'antioxydant de référence (BHT).

Tableau 9 : Valeurs des IC_{50} des extraits hydro-éthanoliques et aqueux et du BHT exprimé en mg/ml

	Extraits hydro-éthanoliques	Extraits aqueux
A. visnaga	1,31 ± 0,14	4,15 ± 0,47
Z. lotus	3,64 ± 0,18	5,28 ± 0,46
O. ficus indica	0,91 ± 0,04	2,460 ± 0,005
Z. mays	0,33 ± 0,09	2,35 ± 0,02
H. hirsuta	0,97 ± 0,06	2,56 ± 0,24
BHT	0,11 ± 0,02	

V.3 Capacité antioxydante totale

Il est important de souligner que la capacité antioxydante totale des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant une méthode dite de phosphomolybdène. Cette méthode est basée sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V), par conséquent, la formation d'un complexe vert de phosphate/Mo (V) présentant un maximum d'absorption à 695 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de BHT par un gramme d'extrait testé. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 10.

A l'issue des résultats du Tableau 10, on peut dire que les extraits hydro-éthanoliques présentent une capacité antioxydante totale supérieure à celle des extraits aqueux et que *Z. mays* représente la meilleure teneur en capacité antioxydante totale comparée aux autres extraits de plantes étudiées.

Tableau 10: Capacité antioxydante totale des extraits hydro-éthanoliques et aqueux exprimées en mg BHT/g d'extrait

	Extraits hydro-éthanoliques	Extraits aqueux
A. visnaga	35,41 ± 3,54	22,67 ± 2,27
Z. lotus	30,03 ± 3,00	16,17 ± 1,62
O. ficus indica	52,37 ± 5,24	32,20 ± 3,22
Z. mays	72,79 ± 7,28	42,53 ± 4,25
H. hirsuta	44,94 ± 4,49	26,13 ± 2,16

VI. Corrélation et analyse en composantes principales

Dans les échantillons analysés dans le présent travail (Tableau 11), une forte corrélation positive entre phénols totaux et flavonoïdes a été observée avec une valeur de r = 0,827. Les flavonoïdes et la capacité antioxydante totale (CAT) ont également corrélées positivement avec r = 0,872. Par ailleurs, il y a une corrélation entre les flavonoïdes et le pouvoir réducteur de fer (FRAP) représenté par la valeur négative de r = - 0,785.

D'après l'examen des résultats présentés dans le Tableau 11, on peut remarquer l'existence d'une forte corrélation entre le FRAP et la CAT représentée par la valeur négative de facteur r = - 0,862. Une forte corrélation négative, d'une valeur de r = - 0,832 a également été observée entre la capacité anti-radicalaire DPPH et la CAT.

La relation entre les phénols totaux et les activités antioxydantes pourrait être détectable dans le cas du FRAP et du CAT où une bonne corrélation a été démontrée avec la teneur en phénols totaux présentant des valeurs r de -0,697 et 0,620 respectivement. Le DPPH et les flavonoïdes ont également une bonne corrélation d'une valeur négative de r = - 0.632.

Tableau 11: Coefficients de corrélation entre les composés

	Phénols totaux	Flavonoïdes	CAT	DPPH	FRAP
Phénols totaux	1	0,827**	0,620	-0,552	-0,697*
Flavonoïdes	0,827**	1	0,872**	-0,632*	-0,785**
CAT	0,620	0,872**	1	-0,832**	-0,862**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

En ce qui concerne l'analyse en composantes principales, la Figure 20 illustre l'intégration de l'information de la composition phénolique avec les activités antioxydantes des échantillons étudiés. De ce fait l'ACP est utilisée comme outil performant de réduction des échelles et de concentration de l'information dans un nombre restreint de composantes dites principales.

Les deux premières composantes principales (CP 1 et CP 2) expliquaient 81 % et 11,80 %, successivement, de l'information contenue dans la matrice originale des données. La première composante principale, étant donnée la composante qui garde plus d'information, a corrélé négativement les phénols totaux, les flavonoïdes et la CAT. Par conséquent, une corrélation positive est observée entre la même CP et les IC_{50} des activités antioxydantes du DPPH et du pouvoir réducteur FRAP.

Considérant les similarités des scores (les échantillons), la première composante principale (CP 1) a permis la distinction de deux groupes, dont les échantillons de chacun présentaient des caractéristiques similaires en termes de composition phénolique et d'activités antioxydantes. Un premier groupe, composé par EHE *O. ficus indica*, EHE *Z. mays*, présentaient des contenus élevés en composés phénoliques et donc des IC_{50} de piégeage de radicaux libres basses en comparaison aux autres échantillons. Ce groupe est localisé dans la partie négative du graphique. Le deuxième groupe composé par EA *Z. lotus*, présentait les caractéristiques opposées (contenu faible en composées phénoliques et des IC_{50} élevées). Ces groupes occupaient donc la partie droite et gauche du graphique. Le reste des échantillons se trouve au milieu du graphe et leurs caractéristiques se situent entre les deux groupes qui ont été clarifiés et reposent principalement sur leur emplacement dans le graphe.

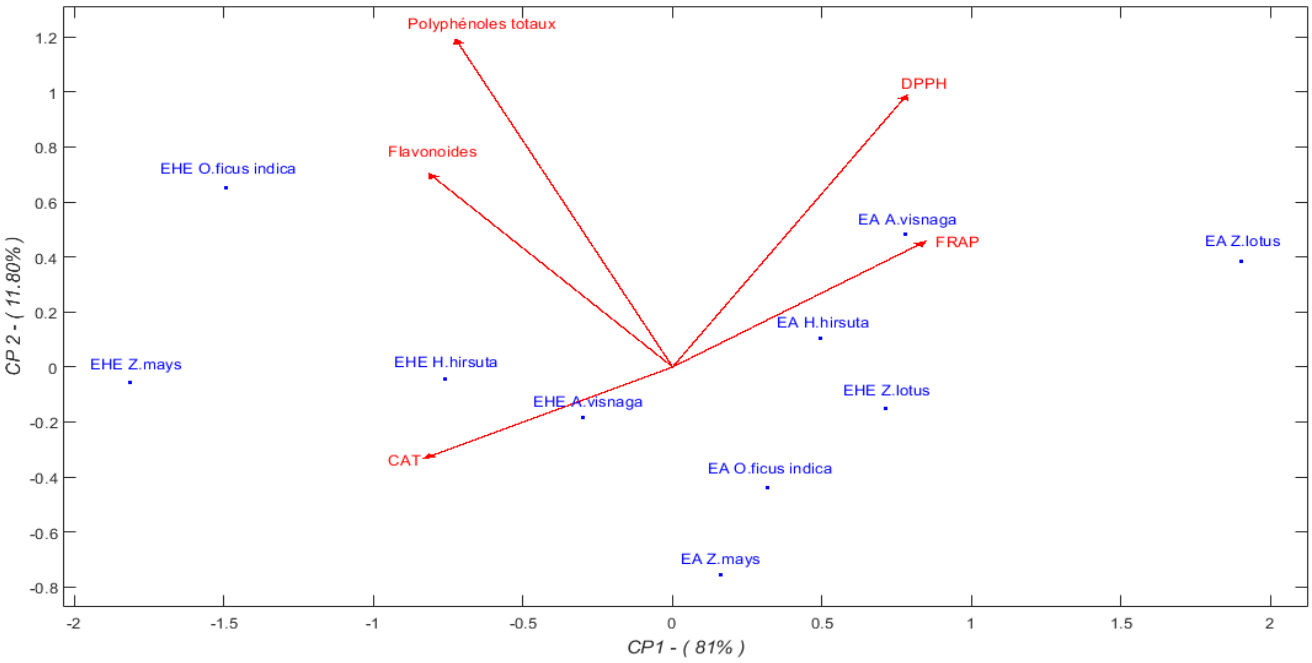


Figure 20 : Analyse en composantes principales de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et des propriétés anti oxydantes des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées

VII. Discussion

Les résultats d'études des différentes plantes choisies nous ont permis de constater que le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, la nature du solvant utilisé dans l'extraction, la polarité, la température et le temps d'extraction [326,327].

On note aussi que l'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique (eau/éthanol) permet d'avoir un rendement supérieur à celui de l'extraction aqueuse. Cela peut être expliqué par l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique en même temps [328,329].

Lors de cette étude les taux en polyphénols sont supérieurs dans les extraits hydro-éthanoliques comparés aux extraits aqueux. Cela peut être expliquer par la présence en quantités importantes des substances solubles dans le mélange eau-solvant et peuvent être les causes essentielles de l'augmentation du rendement correspondant à la méthode d'extraction par Soxhlet [330].

Des études antérieures réalisées sur les teneurs en phénols totaux sur les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *A. visnaga* réalisées par *Wadhwa et al.* [331], ont révélé avoir des teneurs en phénols totaux inférieurs aux teneurs que nous avons obtenus. Concernant les

résultats de *Miguel et al.* [332], ils ont trouvé que l'extrait éthanolique de *A. visnaga* présente un taux de 15 mg / g de matière sèche en polyphénols totaux, ce dernier reste inférieur à nos résultats.

En ce qui concerne *Z. lotus*, *Rsaissi et al.* [333], qui a travaillé sur un extrait méthanolique a trouvé une teneur inférieure à notre extrait hydro-éthanolique (52,05 mg EAG /g extrait) qui est de 52,29 mg (EAG)/ kg. Par contre, *Djemai et al.* [334], a trouvé pour le même extrait de *Rsaissi et al.* [333], une teneur de 5 µg(EAG) /mg.

Les résultats du dosage des phénols totaux trouvés par *Djemai* [335], montrent que les extraits méthanoliques et aqueux de *Z. mays* sont les extraits les plus riches en polyphénols, avec des valeurs de 5,0 et 5,8 mg (EAG)/g.

Dans une étude réalisée par *Li et al* [336] sur cinq variétés du *Zizyphus jujuba*, les phénols totaux dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu dans des extraits polaires obtenus par extraction par le mélange méthanol/eau. Le résultat obtenu pour la variété *Zizyphus jujuba* Sanbianhong est de 5,2 µg EAG/mg d'extrait qui reste très inférieure par rapport aux résultats que nous avons obtenus.

Les résultats obtenus par *Ammar et al.* [337], montrent aussi que les teneurs des extraits hydroalcooliques de *O. ficus indica* sont supérieurs à ceux des extraits aqueux. Ils ont relevé une teneur de l'extrait méthanolique supérieure à notre extrait qui est de 270,9 mg (EAG)/g d'extrait. Cependant, la teneur de notre extrait aqueux est supérieure à la valeur élucidée par ce travail qui est de 44,2 mg (EAG)/g d'extrait.

La valeur de la teneur en phénols totaux de l'extrait hydro-éthanolique des stigmates de *Z. mays* dans notre étude a été estimée supérieure à celle rapportée par d'autres chercheurs [338] et elle est inférieure à celle trouvée par *Liu et al.* [339].

En ce qui concerne les extraits éthanoliques et aqueux de *H. hirsuta, Tepe et al.* [340], ~~a~~ ont trouvés des teneurs de 28,2 et 26,5 mg (EAG)/g d'extrait respectivement.

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent des teneurs plus élevées dans les extraits hydro-éthanoliques, comparés aux extraits aqueux. La même remarque a été faite par *J. Wadhwa et al.* [331]. *Rsaissi et al.* [333], a travaillé sur l'extrait méthanolique de *Z. lotus* a trouvé une teneur inférieure à notre extrait qui est de 30,3 mg (Q)/ kg d'extrait. Par contre, *Djemai et al.* [334], a trouvé pour le même extrait une teneur de l'ordre de 0,83 (Q) µg /mg d'extrait. Ces valeurs restent inférieures à nos teneurs.

Les résultats obtenus sur *O. ficus indica* par *Amar et al.* [337], montrent des teneurs en flavonoïdes pour les extraits méthanolique et aqueux sont supérieures aux résultats obtenus avec nos échantillons qui s'évaluent à 60,81 et 22,50 mg (ERE)/g d'extrait respectivement.

Les extraits alcooliques des stigmates de *Z. mays* réalisés par d'autres chercheurs [339,341], ont mis en évidence des teneurs en flavonoïdes de 69,40 et 119 ,47 µg (RE)/g d'extrait qui sont inférieures à celles que nous avons obtenues.

Concernant l'extrait éthanolique et aqueux de *H. hirsuta,* le travail de *B. Tepe et al.* [340], a montré des teneurs de flavonoïdes de 4,6 et 3,7 mg (EQ)/g d'extrait, qui sont inférieurs à nos résultats.

Les extraits des plantes sont des mélanges de plusieurs composés avec différents groupements fonctionnels, différentes polarités et différents comportements chimiques. Cette complexité chimique pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, la combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents, serait idéale pour une évaluation efficace et complète des potentiels antioxydants chez une ou plusieurs espèces [342]. La nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives [342].

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que l'extrait hydro-éthanolique possède un pouvoir antioxydant supérieur à celui de l'extrait aqueux. L'examen des résultats rapportés par *Bencheraiet et al.* [200], montre que l'extrait butanolique des parties aériennes de *A. visnaga* étaient peu capable de piéger les radicaux DPPH avec un IC_{50} de 8,77 µg / ml comparé au standard (Rutin) avec un IC_{50} de 3,01 µg / ml. L'extrait méthanolique de *A. visnaga* a été testé en utilisant le Trolox comme standard de référence. Le résultat a révélé un IC_{50} de 6 µg / ml, contre 1,5 µg / ml pour le standard [343].

Djemai [335], a évalué l'activité des extraits de *Z. lotus*, l'extrait aqueux représente l'extrait le plus actif, avec un IC_{50} de l'ordre 55 µg /ml suivi par l'extrait méthanolique avec un IC_{50} de 195 µg/ml. L'activité anti-radicalaire de l'extrait méthanolique de *O. ficus indica* a été testé par *H. Alimia et al.* [344] et a trouvé un IC_{50} de 147 µg/ml.

Nos valeurs des extraits de *Z. mays* paraissent similaires à celles trouvées par d'autres chercheurs [338,339], qui confirment que l'extrait hydro-éthanolique manifeste une activité de piégeage supérieure à celle de l'extrait aqueux.

L'activité antioxydante de *O. ficus indica* a été testée par la méthode de FRAP. Ainsi pour *H. Alimia* [344], a montré que l'extrait méthanolique a un IC_{50} de 216 µg/ml. D'autres travaux [337], ont montrés que l'extrait aqueux de *O. ficus indica* est un excellent réducteur du Fe^{3+} que l'extrait par Soxhlet.

La relation entre le taux des polyphénols et l'activité anti oxydante des extraits hydro-éthanoliques et aqueux a été montré par une étude de la corrélation et l'ACP. Ces études nous permettent de remarquer l'existence d'une relation entre les deux composantes. Ainsi, un meilleur taux de flavonoïdes et de phénol totaux nous permet d'obtenir une meilleure activité antioxydante. Ces résultats sont confirmés par d'autres chercheurs qui ont étudié la relation entre l'activité antioxydante et le taux des polyphénols [345-347].

VIII. Conclusion

Nous avons réalisé dans un premier temps une étude phytochimique des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées. On a constaté que nos différents extraits sont riches en polyphénols que ce soit en phénols totaux ou en flavonoïdes.

Dans une seconde partie, l'activité antioxydante des extraits aqueux et hydro-éthanoliques a été évaluée par trois différentes méthodes à savoir : la méthode de réduction de radical libre, la mesure du pouvoir réducteur du fer et la capacité antioxydante totale par le phosphomolybdène. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les extraits hydro-éthanoliques possèdent un pouvoir antioxydant supérieur à celui des extraits aqueux mais toujours inférieurs à l'antioxydant de référence qui est le BHT.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *O. ficus indica* et *Z. mays* présentent les meilleurs taux en polyphénol et en capacité antioxydante. Tandis que les extraits de *H. hirsuta*, de *A. visnaga* et enfin *Z. lotus* sont moins importants.

Finalement, on a montré l'existence d'une relation entre les polyphénols et l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus lors de cette étude nous permettent de conclure que les extraits hydro-éthanoliques sont de meilleurs antioxydants et contiennent plus de polyphénols que les extraits aqueux.

CHAPITRE III :

Effets *in vitro* des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées sur la dissolution des calculs oxalo calciques et cystiniques

I. Introduction

Dans ce travail, nous étudions l'effet des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes et de leurs fractions (tanins et flavonoïdes) sur la dissolution des calculs rénaux les plus fréquents, particulièrement les calculs oxalo-calciques et aussi, les calculs de cystine pour lesquels le traitement parait délicat en raison de leur résistance à la lithotripsie extracorporelle et de leur récurrence fréquente. Pour l'élimination de ces calculs rénaux il s'avère nécessaire plusieurs interventions urologiques. Ainsi différents traitements sont utilisés pour lutter contre la formation de ces calculs, en particulier pour la cystine. Traitement par diurèse, alcalinisation de l'urine, médicaments portant un groupe thiol capable de former des complexes avec la cystine [348-350]. Les traitements médicaux sont souvent mal tolérés avec un taux d'effets secondaires élevé.

Dans ce cadre, nous avons suivi *in vitro* la variation de perte de masse des calculs au cours d'une période d'incubation de huit semaines par différents extraits hydro-éthanoliques et aqueux des parties aériennes de *Herniaria hirsuta L*., des fleurs de *Opuntia ficus-indica* L, des stigmates de *Zea mays L*, des graines de *Ammi visnaga L* et des fruits de *Ziziphus Lotus* L. Aussi nous avons évalué l'efficacité des fractions des tanins et flavonoïdes des plantes qui nous ont donné le meilleur taux de réduction des calculs. Nous avons également évalué l'effet du solvant. Les observations ont été complétées par des mesures de pH des différentes solutions d'extraits et témoins étudiés (citrate de sodium et sérum physiologique).

II. Effet des extraits hydro-éthanoliques et aqueux sur les calculs oxalo-calciques

II.1 Evolution temporelle du taux de dissolution (TD)

L'évolution cinétique du TD des calculs oxalo-calciques pour différents extraits étudiés est présentée sur la Figure 21 (a, b). Les résultats montrent une évolution cinétique croissante du TD. Cette évolution est plus importante pour les extraits hydro-éthanoliques et aqueux comparés aux solutions témoins (Solution physiologique et citrate de sodium).

La comparaison des TD obtenus avec les cinq extraits hydro-éthanoliques (Figure 21, a) montre que l'extrait de *Z. mays* possède un effet supérieur aux autres extraits après deux semaines de contact avec le calcul. Ainsi le TD de *Z. mays* est de 18 % alors qu'il n'est que de 12 % pour l'extrait de *A. visnaga L*, 10 % pour les extraits de fleurs de *O. ficus-indica*, de 8 % pour *H. hirsuta* et de 6 % pour l'extrait de *Z. lotus*. Le citrate de sodium ainsi que la solution physiologique de NaCl donnent un TD de 7 % et 5 % respectivement. Après huit semaines de

contact des extraits hydro-éthanoliques et du calcul, le TD est de 60 % pour *Z. mays*, 51 %, 50 %, 40 % et 20 % pour *H. hirsuta*, *O. ficus indica*, *A. visnaga* et *Z. lotus* respectivement. Cette valeur TD ne dépasse pas 20 % pour les solutions Témoins.

L'évolution du TD des extraits aqueux des plantes étudiées est affichée dans la Figure 21 (b), après deux semaines de contact avec le calcul, le TD de *Z. mays* est de 20 %, alors qu'il n'est que de 14 % pour *A. visnaga* et que *O. ficus indica* est à 10 %. *H. hirsuta* et *Z. lotus* ont le même TD qui est de 8 %. Le citrate de sodium ainsi que la solution physiologique de NaCl ont un TD de 7 % et 5 % respectivement. Après huit semaines, le TD est de 68 % pour l'extrait de *Z. mays*, alors qu'il est de 59 %, 55 %, 50 % et 30 % avec *H. hirsuta*, *O. ficus indica*, *A. visnaga* et *Z. lotus* respectivement. Les solutions témoins ont un TD qui ne dépasse pas les 20 %.

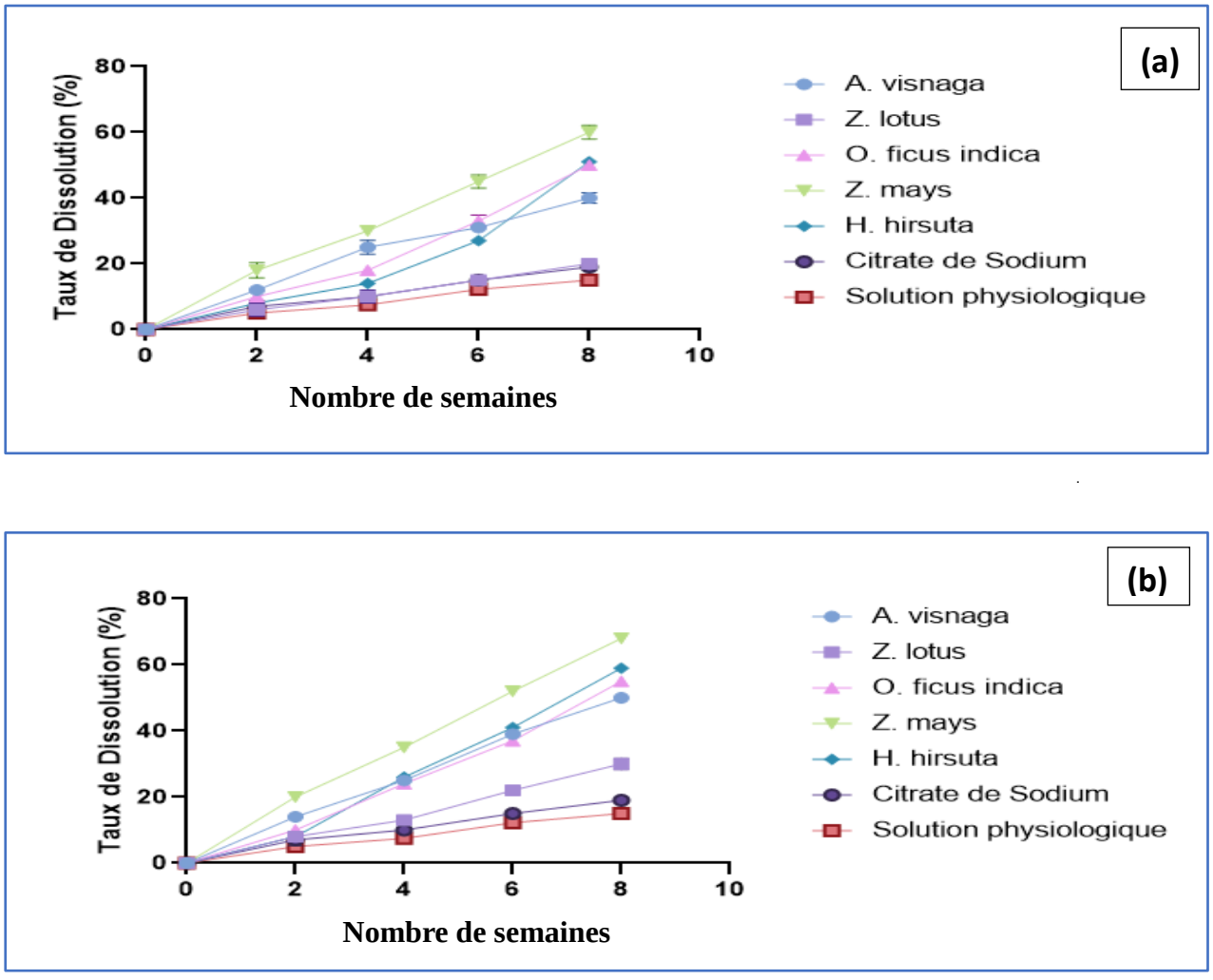


Figure 21: Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques pour les extraits aqueux (b)

II.2 Evolution temporelle du pH

L'évolution du pH est visualisée sur la Figure 22 (a, b). Ces résultats indiquent que le pH initial des solutions est légèrement acide, pour subir une faible augmentation non négligeable sur les huit semaines.

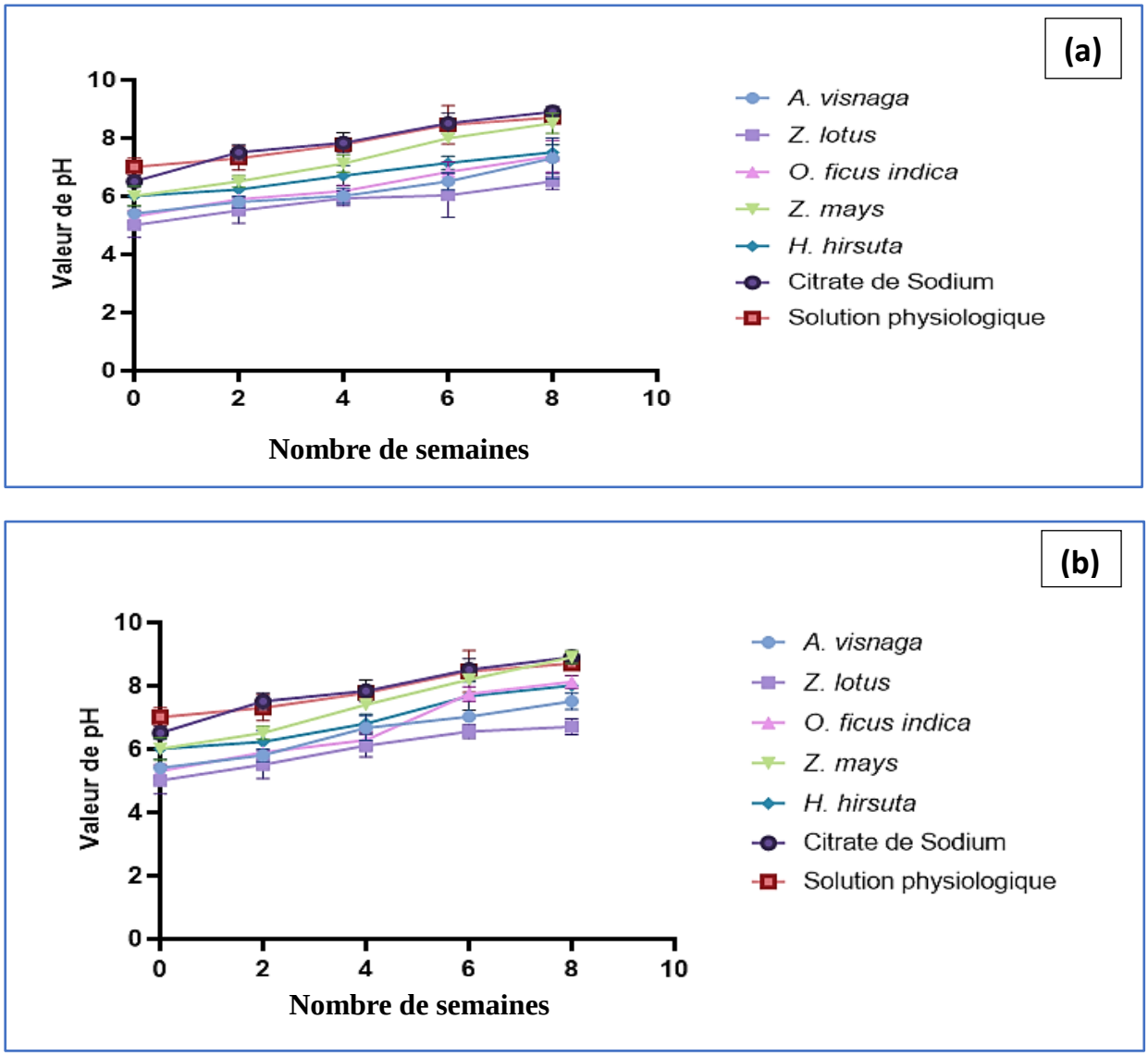


Figure 22: Evolution du pH en fonction du temps en présence des calculs d'oxalo-calcique pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Evolution du pH en fonction du temps en présence des calculs d'oxalo-calciques pour les extraits aqueux (b)

III. Effet des extraits hydro-éthanoliques et aqueux sur les calculs de cystine

III.1 Evolution temporelle du taux de dissolution

L'étude cinétique du TD des calculs de cystine, pour les différents extraits durant 8 semaines est présentée dans la Figure 23 (a, b).

La courbe de la Figure 23 (a) montre aucune différence détectable durant les deux premières semaines pour les extraits hydro-éthanoliques. Après huit semaines, les extraits hydro-éthanoliques présentent quelques différences avec *H. hirsuta* qui a le meilleur taux de dissolution qui atteint les 57 %, 45 %, 38 %, 35 % et 26 % pour *Z. mays*, *O. ficus-indica*, *A. visnaga* et *Z. lotus*, respectivement. Les solutions de contrôle dont le citrate de sodium et la solution physiologique ont un TD inférieur à 20 %.

De la même façon, au bout de deux semaines les extraits aqueux ne présentent aucune différence notable. Mais au bout de huit semaines les TD est de 89 % pour l'extrait de *H. hirsuta* suivie de 76 %, 66 %, 51 % et 25 % pour *Z. mays*, *O. ficus-indica*, *A. visnaga* et *Z. lotus*, respectivement. Les témoins (citrate de sodium et la solution physiologique) présentent une évolution similaire mais ne dépassent pas un TD de 20 %.

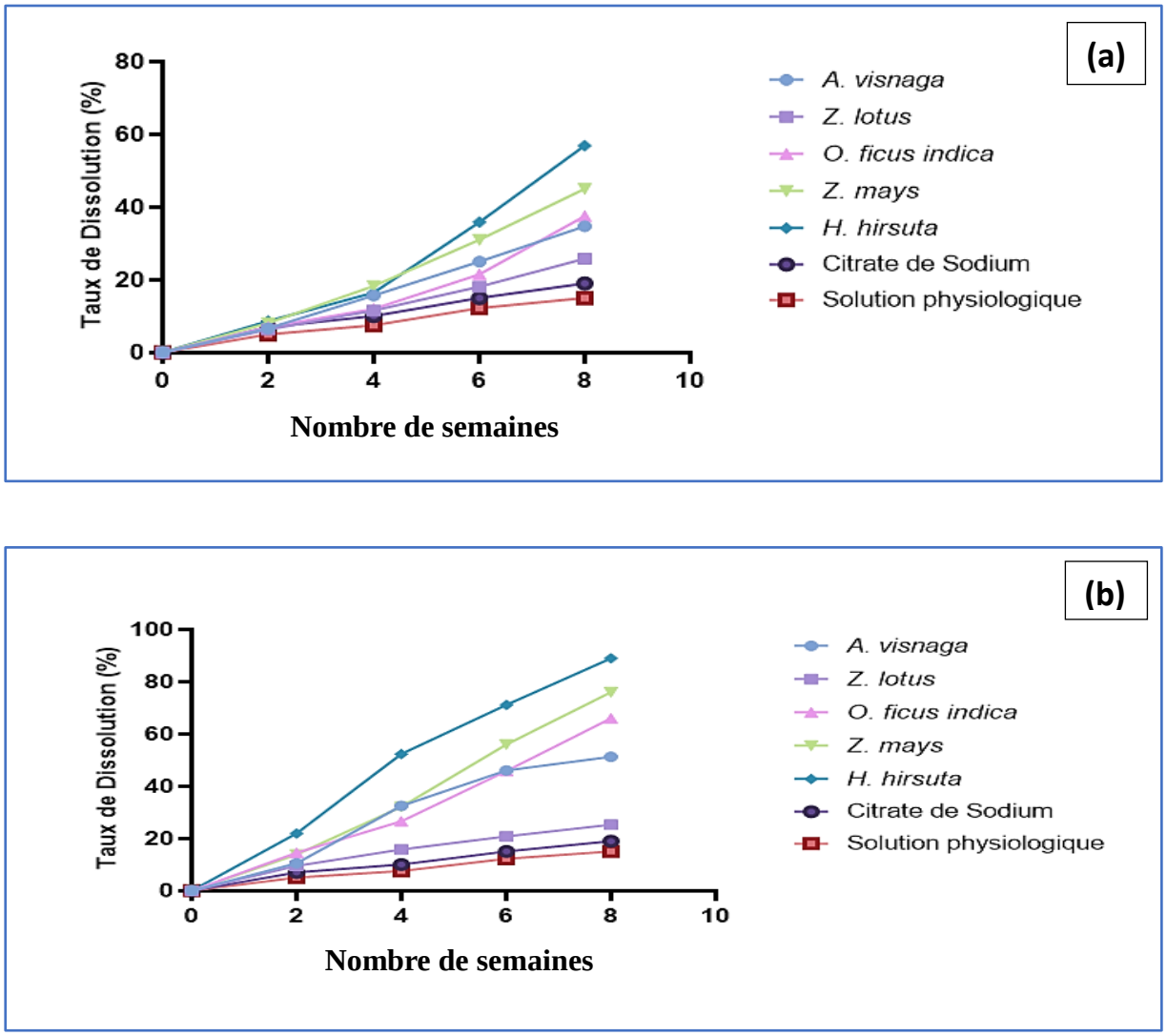


Figure 23: Taux de dissolution des calculs de cystine pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Taux de dissolution des calculs de cystine pour les extraits aqueux (b)

III.2 Evolution temporelle du pH

L'évolution du pH est donnée sur la Figure 24 (a, b). Celle-ci indique que le pH initial des solutions est légèrement acide, allant de 4,3 pour les fleurs de *O. ficus indica* à 7,91 pour la solution de citrate. Le pH subit une augmentation sur huit semaines, allant de 7,86 pour *O. ficus indica* à 10,51 pour le citrate de sodium. Par ailleurs, le pH des extraits de *Z. Lotus* diminue au cours des 8 semaines.

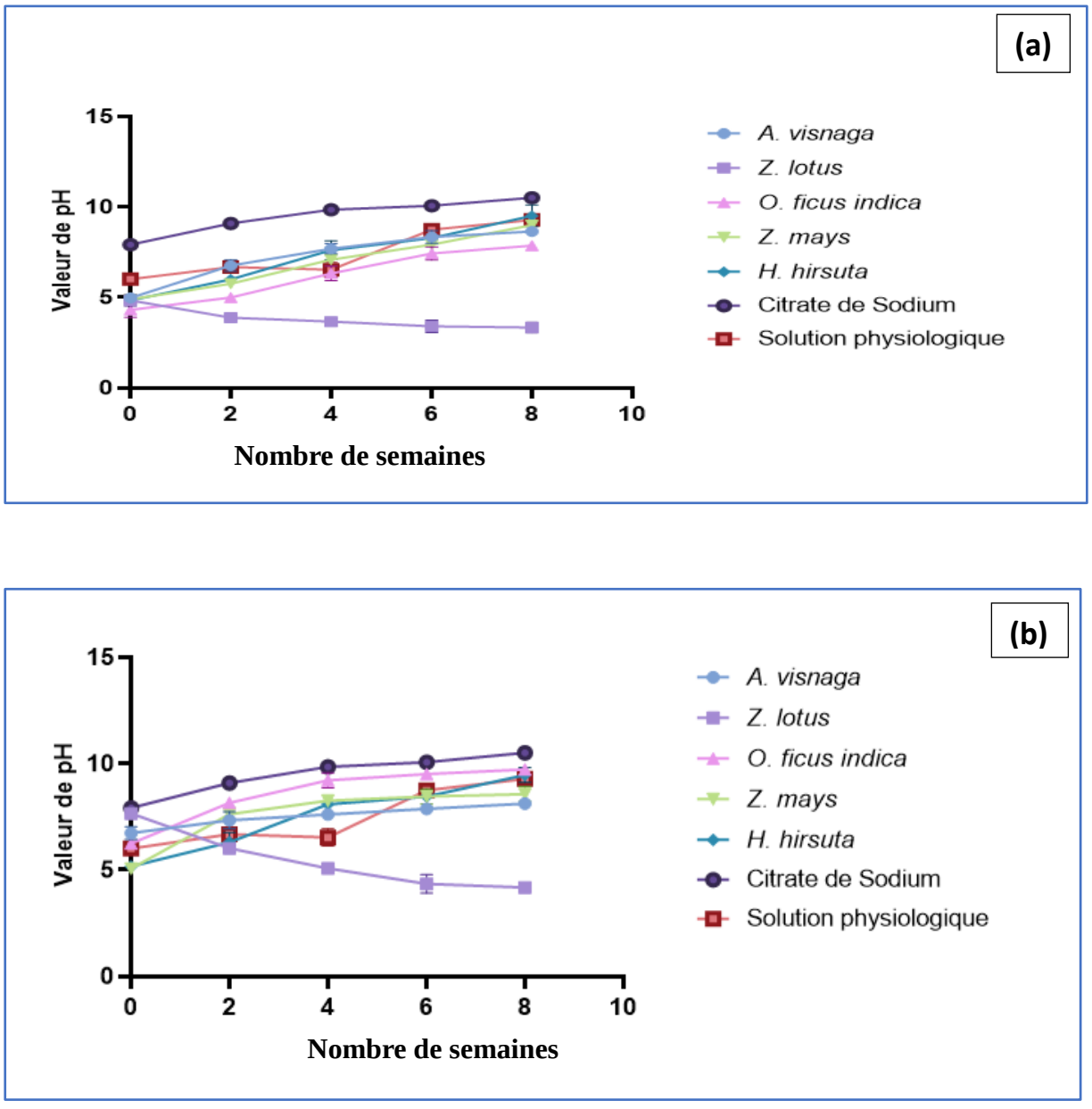


Figure 24: Evolution du pH en fonction du temps en présence de cystine pour les extraits hydro-éthanoliques (a) ; Evolution du pH en fonction du temps en présence de cystine pour les extraits aqueux (b)

IV. Effet des fractions des flavonoïdes et tanins sur les calculs rénaux

Nous avons choisi de réaliser des fractions des trois plantes qui ont la meilleure efficacité de dissolution à savoir les Stigmates de *Z. mays*, les fleurs de *O. ficus indica* et les parties aériennes de *H. hirsuta*. Notre choix se confirme par l'emploi de ceux-ci pour réaliser un fractionnement des tanins et des flavonoïdes.

IV.1 Rendement d'extraction par fractionnement des tanins et flavonoïdes

A l'issue des valeurs du Tableau 12 nous remarquons que le rendement de l'extraction par fractionnement des flavonoïdes de *H. hirsuta* est supérieur à celui de *O. ficus indica* et à celui *Z. mays*. Quant aux fractions de tanins l'extrait de *H. hirsuta* a le rendement plus élevé, suivi de *Z. mays* et de *O. ficus indica*.

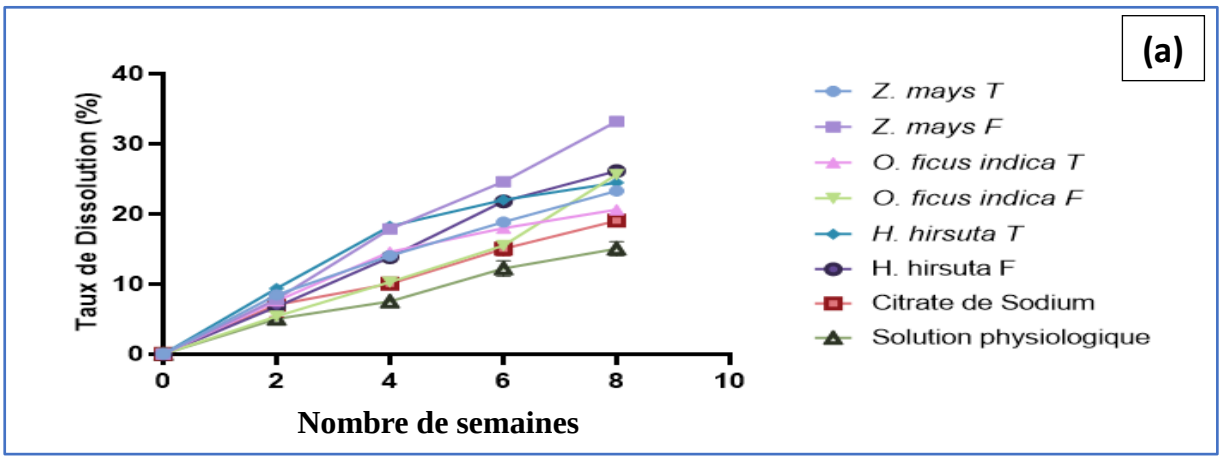
Tableau 12: Rendement des fractions de flavonoïdes et de tanins

	Fraction de flavonoïdes en (%)	Fraction de tanins en (%)
O. ficus indica	0,99	2,97
Z. mays	0,62	3,16
H. hirsuta	2,90	3,85

IV.2 Evolution temporelle du taux de dissolution et du pH sur les calculs oxalo-calciques

Les résultats présents sur la Figure 25 (a, b), montrent une augmentation du TD pour les différentes fractions sur les calculs oxalo-calciques. Le taux de dissolution est négligeable après deux semaines d'incubation. Après huit semaines, le TD est situé entre 15 et 33 % pour toutes les fractions (tanins et flavonoïdes).

L'évolution du pH est présentée sur la Figure 25, b. Elle indique que le pH initial des solutions est situé entre 3,34 et 8. Le pH subit une légère augmentation durant les huit semaines.



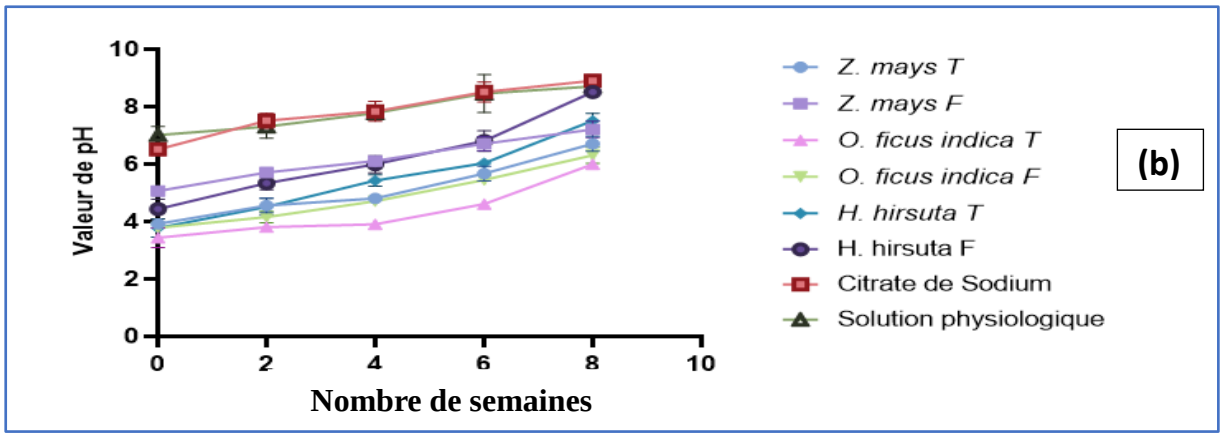


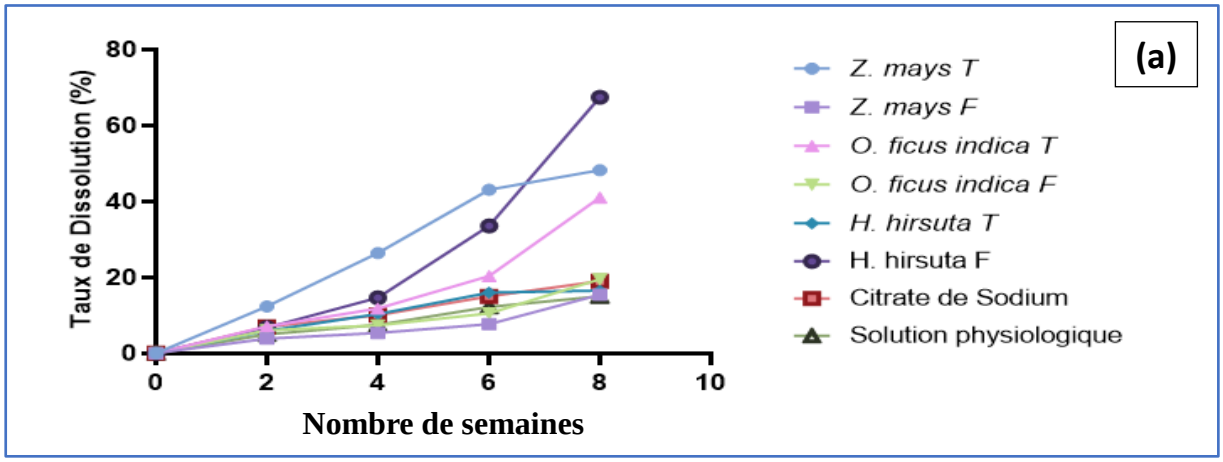
Figure 25 : Taux de dissolution des calculs oxalo-calciques des extraits des tanins et des flavonoïdes (a) ; Evolution temporelle du pH en présence des calculs oxalo-calciques pour les extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (b)

IV.3 Evolution temporelle du taux de dissolution et du pH sur les calculs de cystines

Les résultats de la Figure 26 (a, b), montrent une évolution du TD et du pH des différentes fractions sur les calculs de cystine pendant huit semaines d'incubation.

La comparaison des résultats obtenus après deux semaines montre un TD négligeable. Au bout de huit semaines on remarque une augmentation du TD pour les fractions de tanins concernant les fractions de *O. ficus indica* et *Z. mays*. Pour les fractions de flavonoïdes l'extrait de *H. hirsuta* à le taux le plus élevé.

L'évolution du pH est présentée sur la Figure 26 (b). Elle indique que le pH initial des solutions allant de 3,3 pour la fraction des tanins de *O. ficus indica* à un pH de 8 pour la solution de citrate. Le pH subit une augmentation linéaire durant les huit semaines d'incubation.



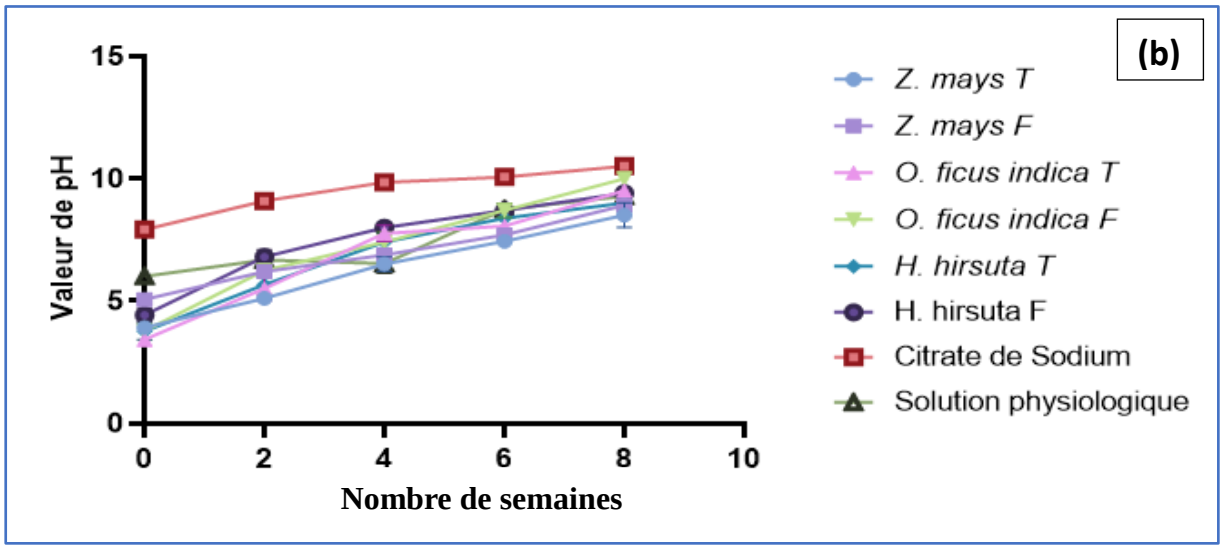


Figure 256: Taux de dissolution des calculs de cystine pour des extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (a) ; Evolution temporelle du pH en présence des calculs de cystine pour les extraits des tanins et des flavonoïdes des plantes étudiées (b*)*

V. DISCUSSION

Les tests *in vitro* effectués sur des calculs oxalo-calciques et cystiniques en présence des différents extraits ont montré une meilleure cinétique de solubilisation des plantes étudiées que celle des témoins (solution physiologique et citrate de sodium).

D'autres études sur la dissolution des calculs de cystine par les plantes utilisées traditionnellement en Algérie contre la lithiase ont été réalisées par *Hannache* [293]. Cette étude s'est portée sur *Arenaria ammophila* (feuilles et tiges), *Parietaria officinalis* (feuilles et fleurs séparément), *Paronychia argentea* (fleurs). Aucun des extraits testés n'a eu d'effet tangible pour dissoudre les calculs de cystine. Le seul qui a semblé avoir un effet solvant non lié au pH était l'extrait de *A. ammophila* avec un TD de 21 % à la fin de l'expérience contre 9 % pour la solution de NaCl.

L'étude de la dissolution des calculs de cystine par les extraits aqueux (infusion) de *Herniaria hirsuta*, *Opuntia ficus-indica*, *Zea mays* et *Ammi visnaga* a été réalisée par *Meiout* [297]. Ces calculs de cystine ont été étudiés sous agitation magnétique. Après huit semaines, la dissolution était totale avec tous les extraits, mais plus rapide avec *Zea Mays* et *Ammi visnaga* alors que le citrate et NaCl réduisaient la masse des calculs de respectivement 18 % et de 20 %. D'après ces résultats on peut dire que l'agitation a joué un rôle dans la dissolution des calculs cystiniques durant cette étude.

Une étude similaire a été faite par *R. El Habbani* [298] qui a testé l'effet des mêmes plantes sur la dissolution des calculs de cystine et d'oxalate de calcium (sans agitation). Après huit semaines de contact, l'extrait aqueux des stigmates de *Z. mays*, montre un TD pour les calculs de cystine de 72 % et 55 % des calculs d'oxalate de calcium. Les extraits de *A. visnaga* solubilisent 67 % des calculs de cystine et 47 % des calculs d'oxalate de calcium. Les extraits de *O. ficus-indica* peuvent atteindre un TD de 64 % et 45 % de la masse totale des calculs de cystine et des calculs d'oxalate de calcium respectivement. Le TD des calculs cystiniques dans les extraits de *H. hirsuta* est de 61 % alors il est de 50 % si on utilise les calculs d'oxalate de calcium.

Le pH durant les huit semaines d'incubation des calculs oxalo calciques et cystiniques montre un passage des solutions d'un état acide a un état basique. Ainsi, pour les calculs oxalo-calciques, le pH des extraits ne dépasse pas 7,5. Par contre pour les calculs de cystines, le pH des extraits a atteint 9,5. Ce qui peut expliquer que le pH ait un effet plus efficace sur la réduction des calculs de cystiniques que sur les calculs oxalo-calciques.

L'étude faite par *R. El Habbani* [298], a montré pour les calculs cystiniques que le pH initial de toutes les solutions est légèrement acide variant entre 5,8 pour l'extrait de fleurs de *Opuntia ficus-indica* à 7,2 pour la solution de citrate. Ce pH croît légèrement de façon linéaire durant les huit semaines variant de 6,6 pour *Herniaria hirsuta* à 7,9 pour le citrate de potassium. Concernant les calculs d'oxalate de calcium le pH initial des solutions est plus ou moins neutres ou légèrement basique variant entre 6 pour l'extrait de fleurs de *Opuntia ficus-indica* à 7,8 pour la solution de citrate. Ce dernier subit une légère augmentation linéaire au cours des huit semaines allant de 7,5 pour *Herniaria hirsuta* à 9 pour le citrate de potassium et la solution physiologique.

La solubilité urinaire de la cystine reste étroitement liée au changement de pH car elle ne dépasse pas 250 mg / L à pH acide, mais peut atteindre 500 mg / L à partir de pH 7,5 [351].

L'un des premiers traitements proposés pour la cystinurie est un traitement diurétique basé sur un régime alimentaire limitant la consommation de méthionine et de sel. Ce résultat montre que l'objectif est de maintenir la cystine soluble en agissant notamment sur la concentration en urine ainsi que sur la valeur du pH. En cas de persistance de la cystine, un traitement supplémentaire par des agents pharmacologiques à base de sulfhydryle (thiol) serait proposé. Cependant, ce traitement a de nombreux effets secondaires qui limitent son utilisation à long terme [352].

L'examen des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées suggère qu'un mécanisme d'action indépendant du pH peut être responsable de la dissolution des calculs de cystine et de l'oxalate de calcium. Cet effet pourrait être lié à la formation de cystine-molécules (tannins ou flavonoïdes) ou oxalate-molécules (tannins ou flavonoïdes), dont la stabilité serait assurée par des liaisons hydrogènes et des liaisons hydrophiles entre les fonctions des molécules actives et les fonctions carboxyliques ou amines de la molécule cystine et une molécule d'oxalate de calcium.

Les résultats du taux de dissolution pour les fractions de tanins et flavonoïdes ont montré un TD inférieur à celui obtenu par les extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées.

Les résultats de la dissolution des calculs oxalo-calciques par les fractions de tanins et de flavonoïdes nous ont permis de constater que l'extrait de *Z. mays* a donné un TD de tanins et de flavonoïdes de 23 % et 33 %, ce qui nous donne un total de 56 %. Cette valeur est proche de celle de l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* avec un TD de 60 %. Concernant l'extrait de *H. hirsuta* le TD de tanins et de flavonoïdes est de 24 % et 26 %, ce qui nous donne un total de 50 % proche de celui de EHE de *H. hirsuta* avec une valeur de 51 %. Pour l'extrait de *O. ficus indica* le TD de tanins et de flavonoïdes est de 20 % et 26 % successivement. Le total obtenu est de 46 % qui est presque équivalent à celui de EHE de *O. ficus indica* avec un TD de 50 %.

Concernant les résultats de la dissolution des calculs de cystine par les fractions de tanins et de flavonoïdes, l'extrait de *H. hirsuta* a donné un TD de tanins et de flavonoïdes de 16 % et 67 %, ce qui nous donne un total de 83 % proche de celui de EHE de *H. hirsuta* avec une valeur de 89 %. Pour l'extrait de *Z. mays* on a obtenu un TD de 48 % et 15 % successivement. Ces résultats nous donnent un total de 63 %, ce qui est proche de celui de EHE de *Z. mays* avec un TD de 75 %. Concernant l'extrait de *O. ficus indica,* le TD de tanins et de flavonoïdes est de 41 % et 19 % successivement. Ce total obtenu (60 %) est proche de celui de EHE de *O. ficus indica* avec un TD de 65 %.

D'après ces résultats on constate que la présence seule de tanins et de flavonoïdes a donné un effet de dissolution moindre que celui de leur présence ensemble dans les extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées. On peut dire que la dissolution des calculs que ce soit cystiniques ou d'oxalate de calcium est due à la présence de plusieurs composés et non d'un principe actif seul.

VI. CONCLUSION

L'ensemble des extraits et des fractions d'extraits des plantes étudiées ont montré une efficacité et un pouvoir de réduction massique meilleur que les témoins sur les calculs d'oxalate de calcium ou de cystine. Ces extraits pourraient donc constituer un traitement curatif et / ou prophylactique chez les patients atteints de lithiase, notamment les patients cystinuriques.

Pour confirmer les effets des extraits des plantes étudiées, des études complémentaires sont nécessaires telles que la toxicité de ces extraits et aussi de vérifier leur effet *in vivo*.

CHAPITRE IV :
Etudes pharmacologiques

A. Etude de la toxicité et de l'activité anti-inflammatoire et analgésique

I. Introduction

Dans cette étape nous nous sommes intéressés à étudier les activités anti-inflammatoires, antalgiques et la toxicité des extraits hydro-éthanoliques de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta*. Notre choix s'est porté sur ces trois extraits du fait qu'ils ont montré les meilleurs résultats dans les tests *in vitro*.

La réalisation d'une étude toxicologique est une étape substantielle afin de cerner tout effet indésirable et de mieux comprendre les sites d'action des substances actives. En effet, la toxicité aiguë et subaiguë a été étudiée selon les guidelines de l'OCDE (N ° 423, N ° 407) afin de vérifier la dose toxique pour chaque extrait de plantes étudiées. Le comportement et le poids des animaux ont été observés après chaque traitement.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée sur un modèle *in vivo* qui est l'inflammation par l'œdème induit par la carragénine aux doses 250 et 500 mg/kg. Quant à l'activité analgésique, elle a été évaluée sur deux modèles *in vivo* de douleur, un modèle périphérique à l'acide acétique et la méthode de Formalin.

Le détail de ces expériences ainsi que la discussion des résultats sont présentés dans les différentes parties de ce chapitre.

II. Etudes toxicologiques

La toxicité des trois extraits hydro-éthanoliques a été réalisée selon deux méthodes :

- La toxicité aiguë a été étudiée aux doses de 250, 500 et 2000 mg/kg de poids corporel des rats par voie orale pendant 14 jours selon les guidelines OCDE.
- La toxicité subaiguë, a été évaluée sur des rats qui ont reçu une dose unique de 500 mg /kg des extraits étudiés pendant 28 jours.

Le comportement des rats a été observé, le poids des animaux et le poids relatifs des organes ont été mesurés.

II.1 Etude de la toxicité aiguë

L'administration orale des EHE de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* aux doses de 250, 500 et 2000 mg/Kg p.c, aux rats, n'a induit aucun signe de toxicité aigüe au cours des 24

heures d'observation qui a concerné le comportement des animaux à savoir la salivation, convulsion coma, agitation et mort...etc. Aussi durant les 14 jours du test. Ces observations ont concerné l'évolution du poids corporel des rats et du poids relatif des organes.

II.1.1 Evolution du poids corporel

Les résultats de la Figure 27 montrent que l'administration par voie orale des extraits pendant 14 jours n'a pas perturbé la croissance des animaux et n'a présenté aucun effet létal. Il ressort que les extraits étudiés n'ont montré aucune modification du poids des rats. Cependant, le poids des rats a augmenté légèrement durant toute la période du traitement. On peut en déduire qu'aucune dose et aucun extrait étudié n'a montré d'effet létal, car aucune moralité ou modification de l'état général n'a été observée chez les rats soumis au traitement aux différentes doses en prise unique.

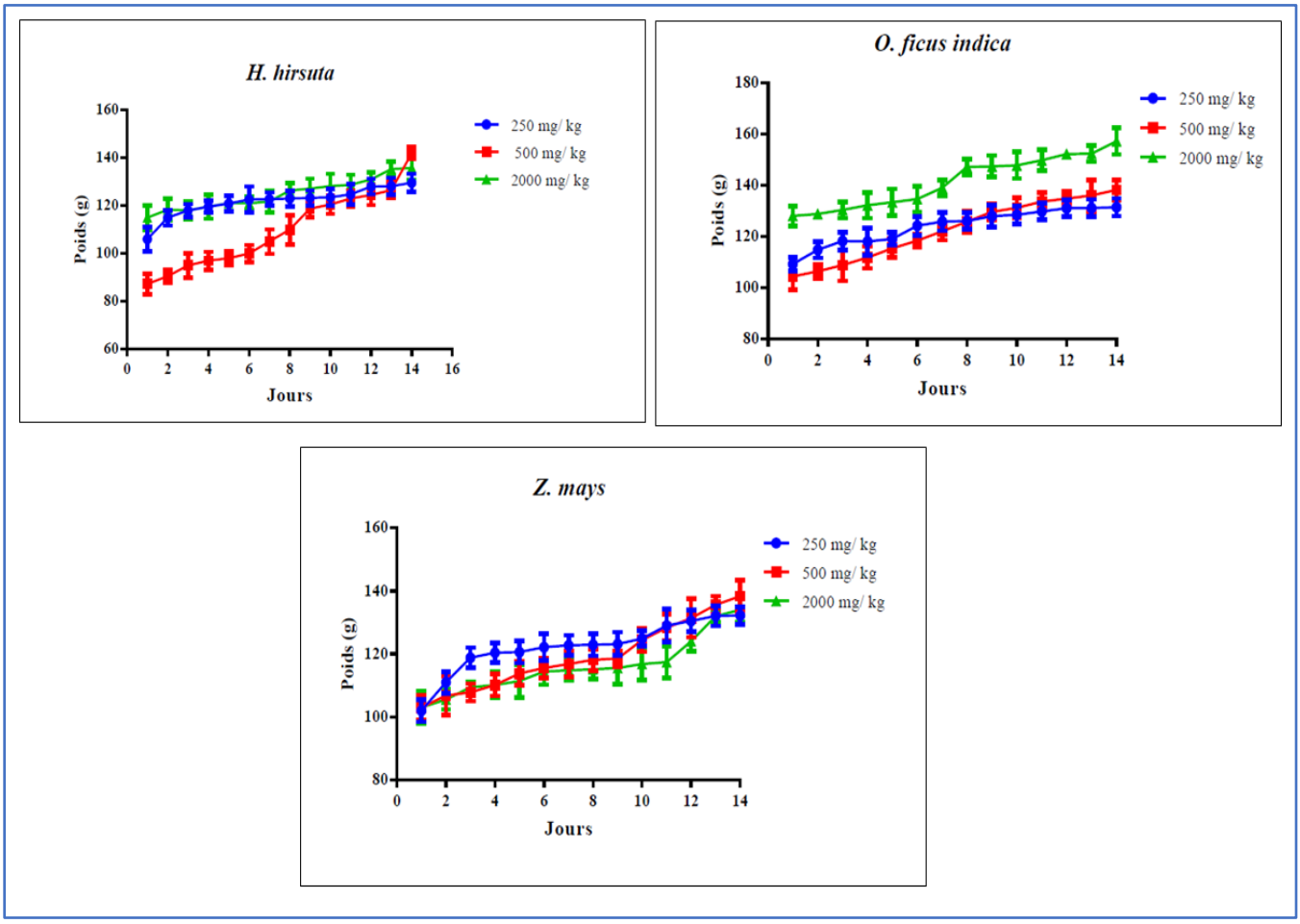


Figure 26: Suivi du poids corporel des rats traités par voie orale aux doses de 250,500 et 2000 mg/kg, Les données sont exprimées en moyenne ± ET ; n=5.

II.1.2 Poids relatifs des organes

Dans cette étude, les effets des extraits étudiés sur le poids relatif des organes (foie, reins, rate) des rats sont résumés dans le Tableau 13. Les poids relatifs des organes prélevés chez les rats à la fin du traitement n'ont pas varié de manière significative.

Tableau 13: Poids relatif des organes chez les lots traités aux doses de 250 - 500 et 2000 mg/kg des extrais des plantes étudiées

	Dose (mg/kg)	Poids (g)	Poids relatifs des organes (ROW)		
			Foie	Reins	Rate
EHE H. hirsuta	250	125,57±1,92$_{ns}$	42,43±2,48 $_{ns}$	7,25±0,51$_{ns}$	2,20±0,16 $_{ns}$
	500	129±6,67$_{ns}$	39,72±1,86 $_{ns}$	9,83±0,36 $_{ns}$	2,50±0,48 $_{ns}$
	2000	142,67±5,11$_{ns}$	28,6±2,71****	7,23±0,25 $_{ns}$	4,90±1,53 ****
EHE O. ficus indica	250	138,22±2,18$_{ns}$	44,09±6,02 $_{ns}$	7,81±1,03 $_{ns}$	2,61±0,07 $_{ns}$
	500	138,47±0,98$_{ns}$	50,13±5,07 $_{ns}$	9,68±0,71 $_{ns}$	2,48±1,09 $_{ns}$
	2000	151,33±3,11$_{ns}$	50,01±8,50 $_{ns}$	8,93±0,38 $_{ns}$	2,06±0,60 $_{ns}$
EHE Z. mays	250	118,6±1,073$_{ns}$	39,29±1,51 $_{ns}$	7,40±0,41 $_{ns}$	2,37±0,24 $_{ns}$
	500	145,33±1,11$_{ns}$	47,67±6,88$_{ns}$	7,45±0,04 $_{ns}$	2,41±0,28 $_{ns}$
	2000	147,33±6,13$_{ns}$	70,25±1,57****	7,53±0,83 $_{ns}$	3,26±0,30 *
Control	0	155±8,37	44,69±5,53	8,61±0,83	2,41±0,34

Valeurs sont exprimées en moyenne ± ET (n=5), ns : non significatif. * p < 0,05 ; **** p <0,0001.

II.2 Etude de la toxicité subaiguë

Durant toute la période du traitement (28 jours), aucune mortalité n'a été enregistrée ni dans le lot des témoins ni dans les lots des rats traités aux différents extraits étudiés.

II.2.1 Evolution du poids

Au cours de la période d'expérimentation, aucun animal n'a manifesté un comportement anormal. La pesée journalière des rats a montré que leur gavage à la dose de 500 mg/kg d'extraits des plantes étudiées pendant 28 jours n'a pas perturbé la croissance des animaux (Figure 28).

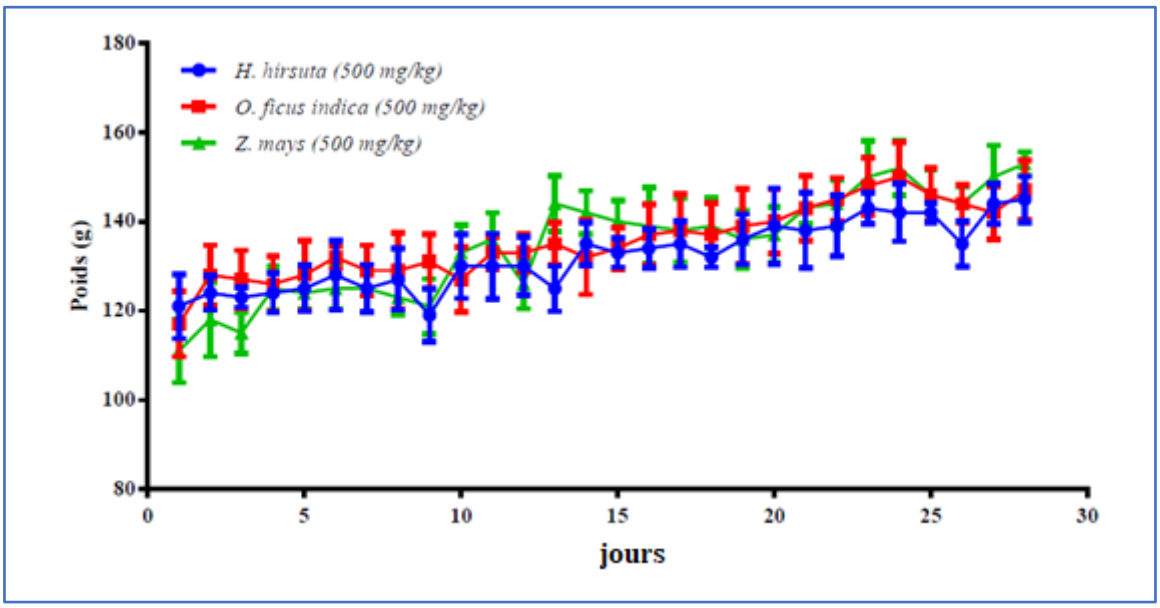


Figure 27 : Suivi du poids corporel des rats traités en administration répétée pendant 28 jours. Les données sont exprimées en moyenne ± ET ; N=5.

II.2.2 Poids relatifs des organes

Lors des mesures du poids relatif des organes des rats traités, nous avons remarqué que l'aspect général de ces organes ainsi que leurs poids sont similaires à ceux des témoins. Cette étude a porté essentiellement sur le foie, les reins et la rate.

Les résultats montrent que le poids relatif des organes prélevés chez les rats à la fin du traitement subaiguë n'a pas varié de manière significative. Aucune toxicité gastrique n'a été mise en évidence après observation macroscopique de l'estomac.

Tableau 14 : Poids relatif des organes chez les lots traités à la dose de 500 mg/ kg des extrais des plantes étudiées

	Dose (mg/kg)	Poids (g)	Poids relatifs des organes (ROW) (g)		
			Foie	Reins	Rate
EHE H. hirsuta	500	130,50 ± 8,87 ns	38,36 ± 9,11 ns	8,35 ± 0,26 ns	2,01 ± 0,11 ns
EHE O. ficus indica		152,28 ± 5,29 ns	40,19 ± 3,86 ns	6,25 ± 0,37 ns	1,91 ± 0,19 ns
EHE Z. mays		148,33 ± 2,22 ns	43,53 ± 5,25 ns	7,28 ± 0,40 ns	2,08 ± 0,15 ns
Control	0	209,05 ± 8,37	44,69 ± 5,53	8,61 ± 0,83	2,01 ± 0,34

Valeurs sont exprimées en moyenne ± ET (n=5), ns : non significatif.

III. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des EHE de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta*, deux doses ont été utilisées par voie orale qui sont 250 et 500 mg/kg. Les résultats obtenus sont comparés au médicament de référence qui est l'indométacine. Les Figures 29, 30, 31 résument l'ensemble des résultats obtenus.

III.1 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *Z. mays*

L'examen des résultats de la Figure 29, montre que les doses 250 et 500 mg/kg de l'EHE de *Z. mays* ont un pourcentage d'inhibition de l'œdème qui augmente durant toute la période de traitement et qui atteint son maximum à 6 h avec un pourcentage de 93,33 % pour les deux doses.

Dans les mêmes conditions, l'indométacine (à la dose de 10 mg/ kg) a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 51,42 % vers les 4 h et 60,48 % à 5 h. l'effet anti-inflammatoire de ce médicament diminue rapidement après 5h pour atteindre 7,14 %.

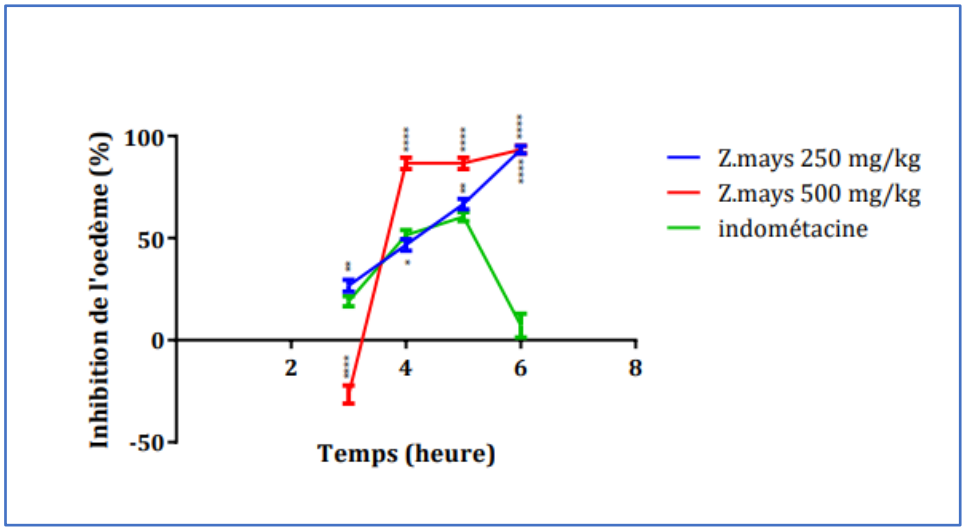


Figure 28: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *Z. mays* aux doses de 250 et 500 mg/kg comparée à l'indométacine

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; **** p <0,0001

III.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE *H. hirsuta*

Les résultats de la Figure 30, montrent que la dose 250 mg/kg de l'EHE de *H. hirsuta* a un pourcentage d'inhibition de l'œdème qui accroit durant toute la période de traitement et qui atteint son maximum à 6 h avec un pourcentage de 86,67 %.

En ce qui concerne les résultats correspondant à la dose de 500 mg/kg, nous observons un maximum d'inhibition de l'ordre de 93,33 % à la sixième heure.

L'indométacine a un maximum de pourcentage d'inhibition de l'ordre de 60,48 % à 5 h. l'effet anti-inflammatoire diminue rapidement après 5h pour atteindre 7,14 %.

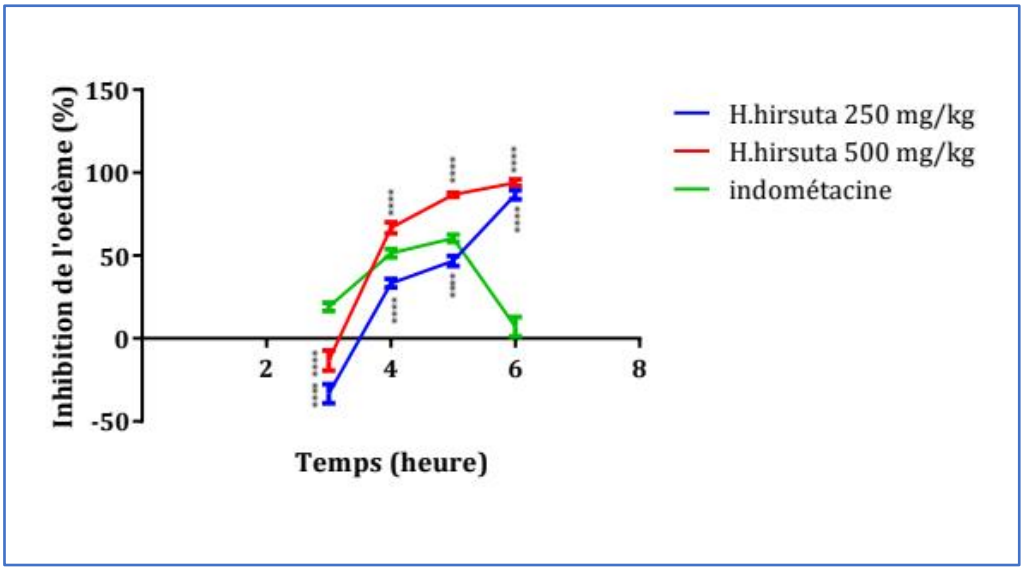


Figure 29: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits hydro-éthanoliques de *H. hirsuta* aux doses de 250-500 mg/kg comparée à l'indométacine

**** p <0,0001

III.3 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des EHE de *O. ficus indica*

L'examen des résultats de la Figure 31, montre que la dose 250 mg/kg de l'EHE de *O. ficus indica* a un pourcentage d'inhibition de l'œdème qui augmente durant toute la période de traitement et qui atteint son maximum à 6 h avec un pourcentage de 93,33 %.

En ce qui concerne les résultats correspondant à la dose de 500 mg/kg, nous observons un maximum d'inhibition de l'ordre de 100 % à la sixième heure.

L'indométacine atteint son maximum d'inhibition de l'œdème pendant la 5ème heure avec un pourcentage de 60,48 %. A la sixième heure après l'injection de la carragénine une chute du pourcentage d'inhibition a été observée à hauteur de 7,14 %.

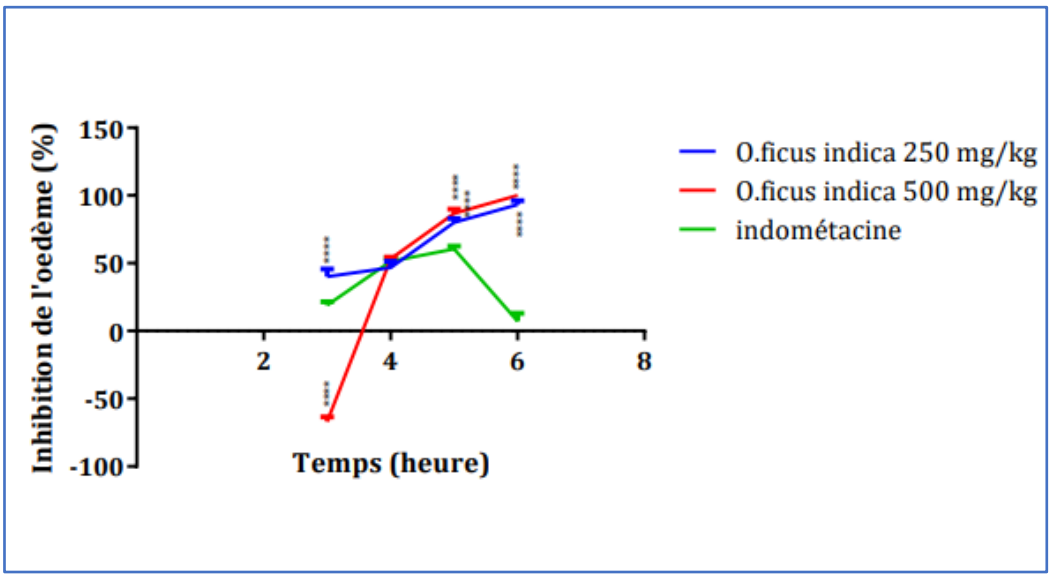


Figure 30: Activité anti-inflammatoire des extraits hydro-éthanoliques de *O. ficus indica* aux doses de 250-500 mg/kg comparée à l'indométacine

**** p <0,0001.

IV. Evaluation de l'activité analgésique

Dans cette étude l'évaluation de l'activité analgésique des extraits étudiés a été réalisée en se basant sur deux modèles *in vivo* de douleur : un modèle périphérique à l'acide acétique et la méthode de Formalin.

Les doses de 500 mg/kg, jugée les plus effectives contre l'inflammation pour les EHE de *Z. mays* et *H. hirsuta*, et la dose de 250 mg/kg pour l'EHE de *O. ficus indica*, ont été étudiées pour leurs éventuelles activités antalgiques.

IV.1 Méthode de l'acide acétique

Les contractions abdominales induites par l'injection de l'acide acétique ont été utilisées pour évaluer l'effet analgésique des extraits étudiés, la Figue 32 montre l'ensemble des résultats obtenus.

Les trois extraits ont montré un nombre de contraction inférieur au Diclofénac avec le classement suivant : EHE *Z. mays* suivie de EHE *O. ficus indica*, EHE *H. hirsuta*, le Diclofénac avec un nombre de contraction de 48 - 50 - 52 et 53 successivement.

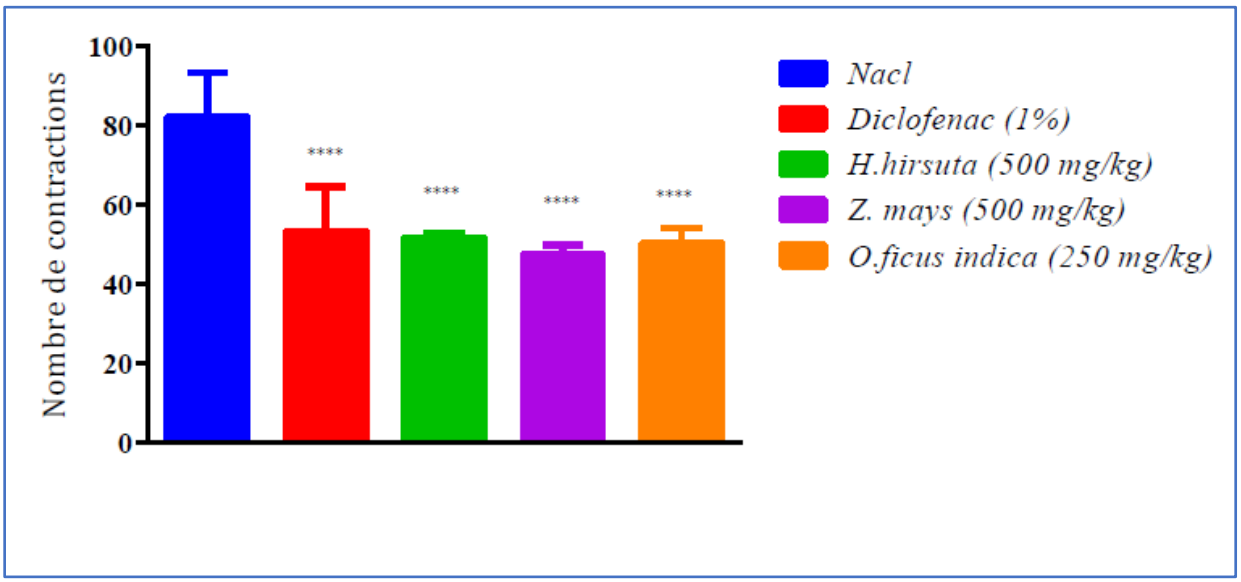


Figure 31: Nombre de contractions abdominales (teste de l'acide acétique) pour les groupes traités par EHE de *Z. mays*, de *O. ficus indica*, de *H. hirsuta* comparé au Diclofénac

**** p <0,0001. a : comparaison entre le groupe témoin négatif et les autres groupes

Les pourcentages d'inhibition de la douleur sont donnés dans le Tableau 15. On constate que les trois extraits inhibent la douleur mieux que le Diclofénac, avec un meilleur pourcentage pour l'EHE de *Z. mays* suivie de l'EHE *O. ficus indica* et l'EHE *H. hirsuta* avec 42, 39 et 37 % successivement et avec 35 % pour le Diclofénac.

Tableau 15 : Evaluation de l'effet analgésique (teste de l'acide acétique) de EHE *Z. mays*, EHE *O. ficus indica*, EHE *H. hirsuta* comparé au diclofénac

	Doses (mg/kg)	Nombre de contactions	% d'inhibition
Témoins	-	82,2±8,56	-
EHE O. ficus indica	250	50,4±0,88	38,69
EHE Z. mays	500	47,6±3,12	42,09
EHE H. hirsuta	500	51,8±7,76	36,98
Diclofénac	1 %	53,4±7,76	35,04

IV.2 Méthode de Formalin

L'étude de l'activité analgésique par la méthode de Formalin consiste à compter le temps où les souris lèchent ou mordent leurs pattes. L'effet analgésique des EHE de *Z. mays* et de *H. hirsuta* à la dose de 500 mg/kg et EHE de *O. ficus indica* à la dose de 250 mg/kg a été évalué.

Les extraits de *Z. mays* et *O. ficus indica* ont montré que le temps de léchage est inférieur au Diclofénac avec 51, 54 et 55 secondes successivement. Par contre, l'EHE *H. hirsuta* avait un temps de léchage supérieur aux témoins positifs avec 57 secondes.

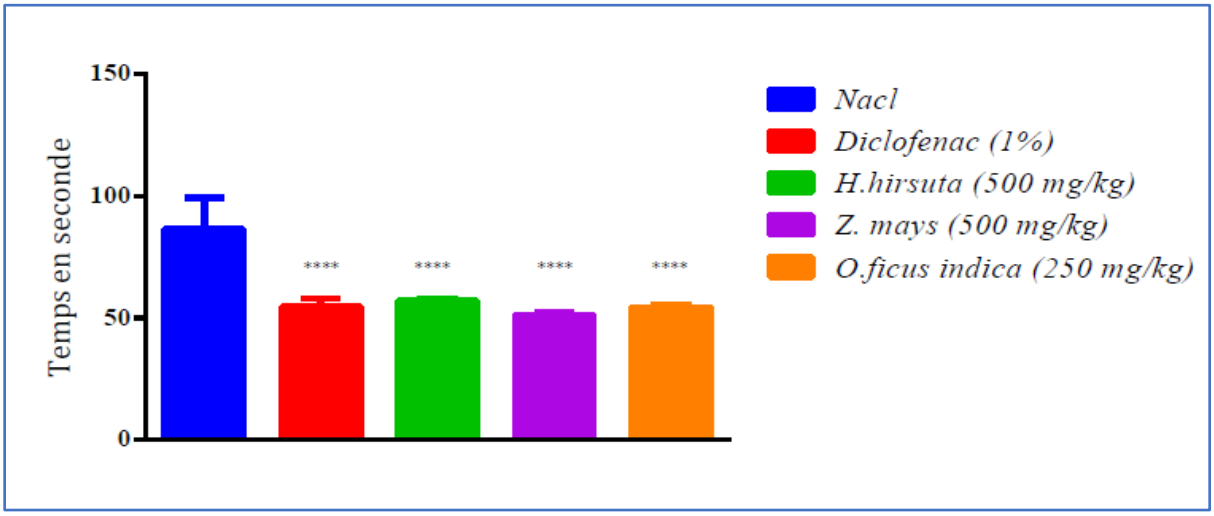


Figure 32 : Temps de léchage de la patte postérieure droite (teste de Formalin) en seconde pour les groupes traités par *Z. mays*, *O. ficus indica*, *H. hirsuta* comparé au Diclofénac

**** p <0,0001

Le pourcentage d'inhibition de la douleur est montré dans le Tableau 16. On constate que *Z. mays* et *O. ficus indica* inhibent la douleur mieux que le Diclofénac, avec un meilleur pourcentage pour l'extrait de *Z. mays* suivi de *O. ficus indica* avec 41 et 37 % successivement. L'extrait de *H. hirsuta* inhibe la douleur moins que le médicament avec 34 %.

Tableau 16: Evaluation de l'effet analgésique (teste de Formalin) des EHE de *Z. mays*, de *O. ficus indica*, de *H. hirsuta* comparé au diclofénac

	Doses (mg/kg)	Temps de léchage en (s)	% d'inhibition
Témoins	-	86,33 ± 12,85	-
EHE *O. ficus indica*	250	54,17 ± 1	37,26
EHE *Z. mays*	500	51,17 ± 1,02	40,73
EHE *H. hirsuta*	500	57 ± 1	33,98
Diclofénac	1	54,5 ± 3,51	36,87

V. Discussion

La première étape dans la recherche pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier la toxicité aiguë. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à tester la toxicité aiguë et subaiguë par voie orale (la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour

l'Homme) des EHE de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* chez les rats et les souris selon la ligne directrice de l'OCDE code N °423 et N °407.

Nos résultats montrent que l'administration orale des EHE de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* aux doses de 250- 500 et 2000 mg/Kg de p.c, n'exercent aucun effet toxique pendant les 14 jours pour la toxicité aiguë et 28 jours pour la toxicité subaiguë pour la dose unique de 500 mg/kg.

D'autres études confirment nos résultats, les travaux de *Hamid R* [353] ont montré que l'extrait aqueux de *H. galabra* n'a aucun effet toxique pour les doses de 5 – 14,5 g/kg pour la toxicité aiguë et 1- 2 et 4 g/kg pour la toxicité subaiguë. Les travaux de *Wang C* [254], sur l'extrait aqueux de stigmates de *Z. mays* aux doses de 0,5 %, 2 % et 8 % pendant 90 jours n'ont montré aucun effet toxique sur les rats.

Lors de cette étude, et afin d'évaluer les activités anti-inflammatoires des EHE de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* le modèle de l'œdème à la carragénine a été utilisé [266]. Dans le modèle d'induction d'œdème chez le rat par la carragénine [253], la phase précoce atteint son pic à 180 minutes. Dans note étude, les extraits ont manifesté leurs effets anti-inflammatoires dans les deux phases mais l'activité a été plus prononcée pendant la phase tardive de l'inflammation. Les résultats obtenus suggèrent que les extraits des plantes testées agissent dans la phase tardive impliquant des métabolites de l'acide arachidonique probablement par l'inhibition de la cyclo-oxygénase [239].

En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, alors que la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5- 3 heures) et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure [355].

L'injection de l'acide acétique ou du formol est une méthode utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique des extraits étudiés. La douleur provoquée par cette injection est due à la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine et des prostaglandines. Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire [356].

Les EHE des plantes étudiées ont inhibé la douleur de manière significative et dose-dépendante. Cet effet analgésique pourrait être lié à l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques de la douleur [356].

De plus, de nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes sont responsables de l'effet analgésique et anti-inflammatoire et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes, qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [357-358]. En effet, la quercétine a été décrite dans l'implication des récepteurs alfa-2 adrénergiques [359] et D2 dopaminergique [360] dans la médiation de l'activité antalgique. Il a été démontré aussi que les catéchines ont des propriétés analgésiques [361].

VI. Conclusion

La présente étude s'intéresse à l'étude toxicologique et l'évaluation des activités anti-inflammatoires et analgésiques des extraits hydro-éthanoliques de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta*. En effet, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée sur un modèle *in vivo* de l'œdème induit par la carragénine sur la patte postérieure droite des rats *Wistar* aux doses de 250 mg/kg et 500 mg/kg. L'activité analgésique a été quant à elle évaluée sur deux modèles *in vivo* de douleur, un modèle à l'acide acétique et la méthode de Formalin.

La toxicité aiguë et subaiguë des extraits hydro-éthanoliques par voie orale n'a révélé aucun effet toxique sur le comportement général de l'animal et sur le poids relatif des organes. Il n'y a pas eu de mort au cours des 14 jours d'observation pour la toxicité aiguë et 28 jours d'observation pour la toxicité subaiguë.

L'activité anti-inflammatoire aux doses de 250 et 500 mg/kg pour les EHE de *Z. mays*, *H. hirsuta* et *O. ficus indica* montre de meilleurs résultats comparés à l'indométacine.

Dans le test analgésique, les extraits de *Z. mays* et *H. hirsuta* à la dose de 500 mg/kg et la dose de 250 mg/kg pour l'extrait de *O. ficus indica* ont montré un effet analgésique meilleur que celui du Diclofénac 1 %.

Ces résultats montrent que nos extraits administrés par voie orale agissent à la fois sur les symptômes inflammatoires et sont d'intéressants analgésiques sans effets indésirables.

B. Etude de l'activité anti-lithiasique *in vivo*

I. Introduction

Le rein est l'un des organes vitaux de l'organisme qui élimine les déchets métaboliques tels que l'urée, la créatinine et l'ammoniac. Il maintient également un équilibre entre le volume de liquide extracellulaire, la concentration d'électrolytes inorganiques dans le liquide extracellulaire, l'osmolarité de liquide extracellulaire, l'équilibre acide-base et la pression artérielle.

De plus, les reins jouent un rôle dans la production de la vitamine D et des hormones. Si les reins sont endommagés, ils ne peuvent plus exécuter correctement la fonction d'excrétion, ce qui entraîne une accumulation de déchets métaboliques qui provoque la formation de calculs [362].

La formation des calculs rénaux a tendance à récurer. Le taux de récidive des calculs rénaux est d'environ 15 % la première année et peut atteindre 50 % dans les 5 ans et jusqu'à 75 % d'ici 10 ans suivant le type de calcul initial. En 25 ans, pratiquement chaque patient a formé au moins un calcul de plus [363-364].

La récurrence de la lithiase urinaire représente un problème grave, par conséquent son traitement est fortement recommandé. L'utilisation de la méthode de la lithotripsie par ondes de choc extracorporelles (LEC) peut provoquer des lésions rénales aiguës, une diminution de la fonction rénale, des hémorragies, une hypertension et une augmentation de la récurrence des calculs [312].

En outre, certains médicaments utilisés pour prévenir et traiter la pathologie lithiasique ne sont pas efficaces chez tous les patients et ont souvent des effets indésirables [365]. Ainsi, un traitement alternatif utilisant la phytothérapie a été suggéré [282,283].

Dans cet objectif, la présente étude est consacrée à évaluer les effets des EHE de *O. ficus indica* et de *Z. mays* et ses fractions (tanins et flavonoïdes) en tant qu'agent préventif contre la formation de calculs rénaux. Notre choix s'est porté sur ces extraits du fait qu'ils ont montré la meilleure activité anti-inflammatoire et analgésique.

Ainsi l'évaluation de l'activité anti-lithiasique a été réalisée selon une induction de l'oxalate de calcium *in vivo* par l'utilisation de l'éthylène glycol. Les tests ont concerné sept groupes qui sont :

- G I : Groupe contrôle ;
- G II : EG ;
- G III: EG+ Cystone (500 mg/kg);
- G IV: EG+ EHE *Z. mays* (500 mg/kg);
- G V: EG+ EHE *O. ficus indica* (250 mg/kg);
- G VI: EG+ *Z. mays* T (76 mg/kg);
- G VII: EG+ *Z. mays* F (15 mg/kg).

Pour chacun de ces groupes nous avons déterminé des paramètres concernant l'urine, la cristallurie urinaire et des paramètres biochimiques hématologiques.

II. Effet des extraits sur les urines

II.1 Evolution du volume urinaire

L'examen de l'administration chronique d'une solution aqueuse à 0,75 % (v / v) d'EG a provoqué une augmentation significative du volume urinaire chez les rats (Figure 34). Cependant au début de l'expérience, tous les groupes ont un volume urinaire presque similaire. Durant les 4 semaines on remarque une augmentation du volume urinaire pour tous les groupes à part le groupe de contrôle. L'augmentation du volume urinaire a été le plus marqué chez les groupes G IV et G V qui a été de 7,8 et 10,70 ml, suivi de G VII, G VI, G III, G II et G I avec des augmentations successives de 7,8 - 6,8 - 6,6 - 5,6 - 3,7 et 0,9 pour le groupe de contrôle.

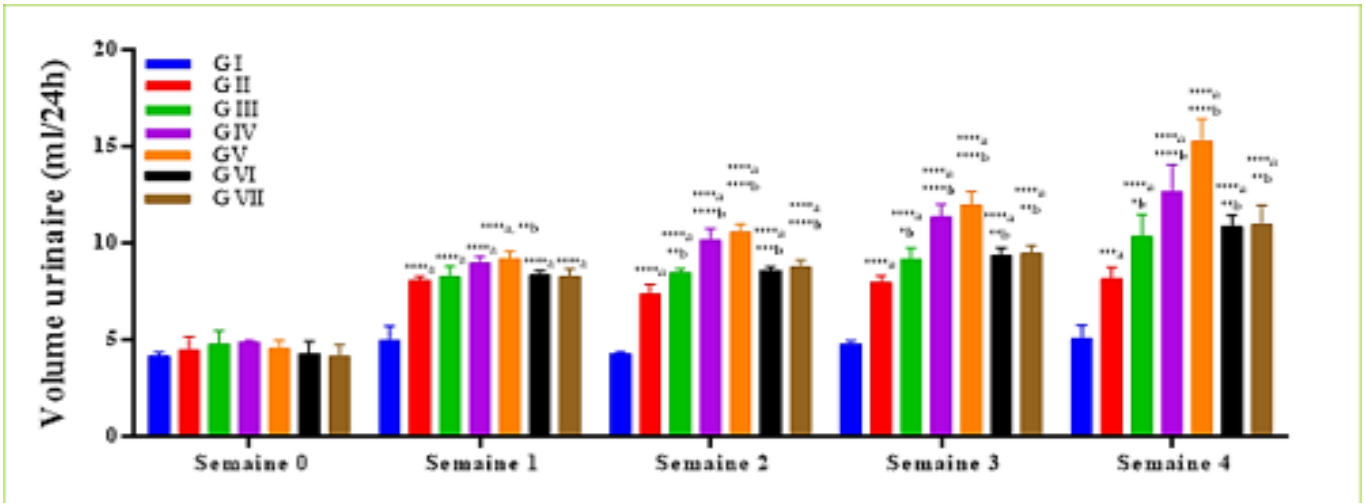


Figure 33: Evolution du volume urinaire en (ml/24h) en fonction du temps chez les groupes étudiés

G I : Groupe contrôle ; G II : EG ; G III : EG+ Cystone (500 mg/kg) ; G IV : EG+ EHE *Z. mays* (500 mg/kg) ; G V : EG+ EHE *O. ficus indica* (250 mg/kg) ; G VI : EG+ *Z. mays* T (76 mg/kg) ; G VII : EG+ *Z. mays* F (15 mg/kg) ; *a :* comparaison entre le groupe normal et tous les groupes ; b : Comparaison entre le groupe EG et tous les groupes. *** p <0,01 ; *** p < 0,001; **** p < 0,0001*

II.2 Variation du pH urinaire

La variation du pH urinaire est montrée sur la Figure 35. On remarque que le pH au début de l'expérience est neutre pour tous groupes. Le pH augmente légèrement durant les 4 semaines, pour tous les groupes étudiés.

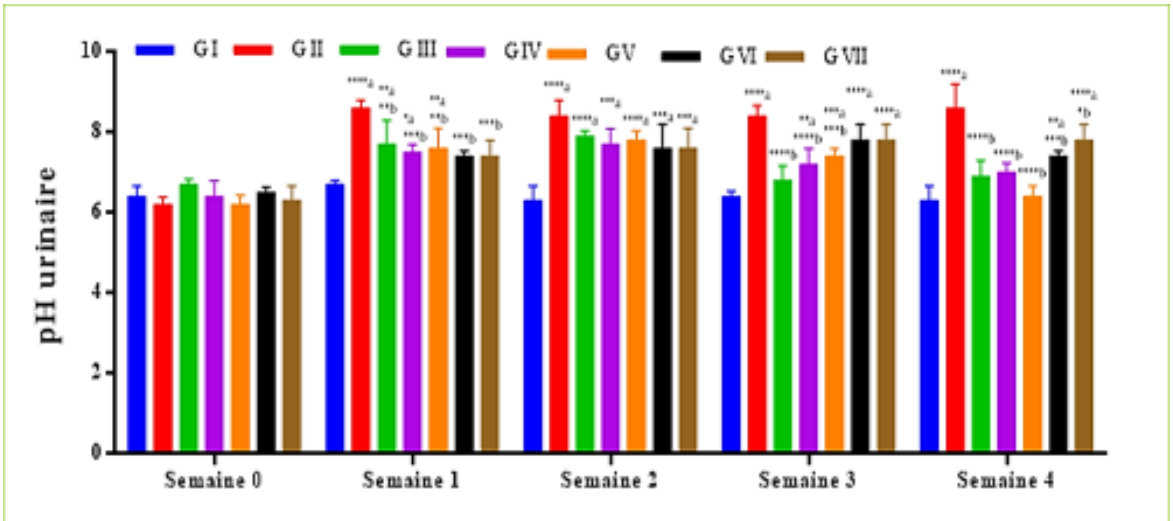


Figure 34: Variation du pH urinaire durant les 4 semaines d'étude pour les groupes étudiées

G I : Groupe contrôle ; G II : EG ; G III : EG+ Cystone (500 mg/kg) ; G IV : EG+ EHE *Z. mays* (500 mg/kg) ; G V : EG+ EHE *O. ficus indica* (250 mg/kg) ; G VI : EG+ *Z. mays* T (76 mg/kg) ; G VII : EG+ *Z. mays* F (15 mg/kg) ; *a :* comparaison entre le groupe normal et tous les groupes ; b : Comparaison entre le groupe EG et tous les groupes. **p < 0.05; ** p <0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001*

II.3 Evolution des cations Ca^{2+}, Mg^{2+} et PO_4^{3-}

L'administration de l'EG dissout dans de l'eau potable que consomment les rats a montré une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium et du phosphate et une diminution de l'excrétion urinaire du magnésium (Figure 36) pour le G II. Cependant, pour les groupes III, IV, V, VI, VII on note une diminution de l'excrétion de calcium et du phosphate et une augmentation de l'excrétion urinaire du magnésium par rapport au G II.

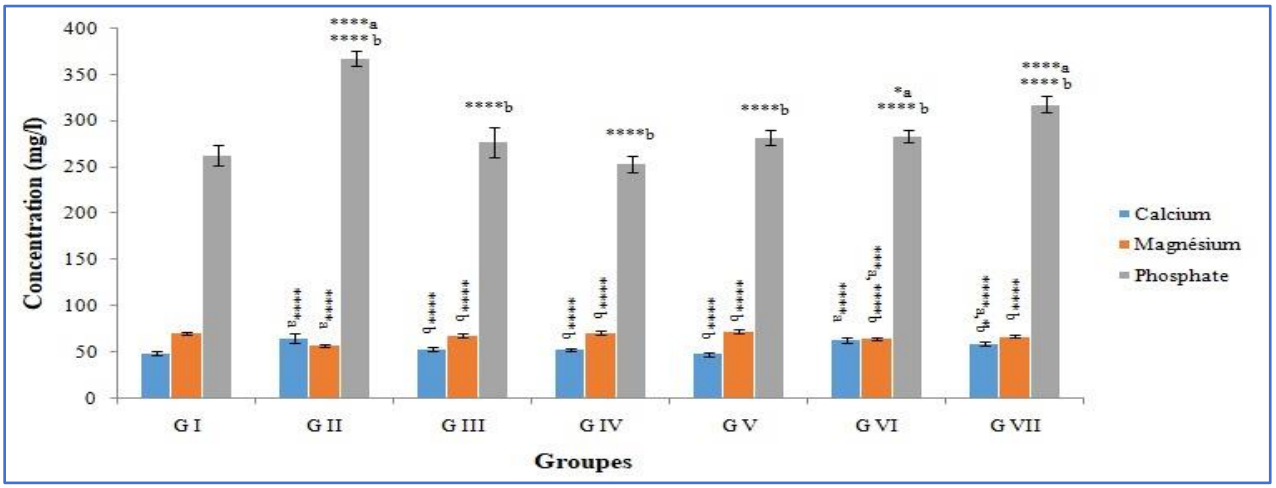


Figure 35: Effet des extraits, des fractions d'extraits et de la cystone sur la concentration urinaire du calcium, du phosphate et du magnésium exprimé en mg/l après 30 jours de traitement

G I : Groupe contrôle ; G II : EG ; G III: EG+ Cystone (500 mg/kg); G IV: EG+ EHE *Z. mays* (500 mg/kg); G V: EG+ EHE *O. ficus indica* (250 mg/kg); G VI: EG+ *Z. mays* T (76 mg/kg); G VII : EG+ *Z. mays* F (15 mg/kg); *a :* comparaison entre le groupe normal et tous les groupes ; b : Comparaison entre le groupe EG et tous les groupes.*$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

III. Cristallurie urinaire

Le suivie par microscope optique durant l'expérience de la cristallurie urinaire des rats appartenant aux différents groupes G I, G II, G III, G IV, G V, G VI, G VII nous a permis de révéler que les cristaux étaient absents dans l'urine des animaux témoins, alors que dans le groupe G II un grand nombre de cristaux variés ont été observés dans les échantillons d'urine. Concernant les groupes G III, G IV, G V, G VI et GVII le nombre de cristaux ainsi que leurs tailles à diminuer en comparaissant avec le groupe G II.

IV. Analyse des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques ont été réalisés sur les différents groupes étudiés et les résultats sont affichés dans le Tableau 17.

Concernant la fonction rénale, les résultats obtenus montrent que le groupe G II a augmenté les taux de créatinine, d'urée et d'acide urique par rapport au contrôle normal (G I). Cependant, l'administration simultanée des extraits, fractions d'extrait et de la Cystone a significativement diminué la créatinine, l'urée et l'acide urique par rapport au groupe G II. Le

groupe G IV montre une diminution des paramètres comparés au groupe témoin positive (G III).

A propos de la fonction hépatique, le groupe G II a augmenté les taux de l'AST, ALP, ALT et la GGT par rapport au contrôle normal. Cependant, l'administration simultanée des extraits, fraction d'extrait et de la Cystone a significativement diminué l'AST, ALP, ALT et la GGT par rapport au groupe G II. De plus le G IV a davantage diminué les paramètres comparés au groupe G III.

Tableau 17: Evaluation des paramètres biochimiques des lots traités avec les extraits de plantes et fraction étudiées comparé aux témoins

		G I	G II	G III	G IV	G V	G VI	G VII
Fonction rénale	Urea	0,3 ± 0,03	0,45 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,34 ± 0,19	0,36 ± 0,31	0,38 ± 0,04	0,4 ± 0,04
	Creatinine	4 ± 0,40	5,4 ± 0,51^{*a}	4,25 ± 0,24	4,2 ± 0,55^{*b}	4,4 ± 1,15	4,1 ± 0,33^{*b}	4,25 ± 0,41
	Acide urique	11 ± 2	27,33 ± 1,15 ^{****a}	18 ± 2^{****a,} ^{****b}	13,25 ± 1,26^{****b}	14,8 ± 2,33^{**a,} ^{****b}	17 ± 2^{***a,} ^{****b}	18,75 ± 1,54^{****a,} ^{****b}
Fonction hépatique	AST	137,4 ± 2,57	175,33 ± 3,60^{****a}	145,67 ± 8,15^{****b}	138,1 ± 6,67^{****b}	140,22 ± 4,67^{****b}	142,89 ± 5,37^{****b}	144,31 ± 8^{****b}
	ALT	39,6 ± 1,27	50 ± 0,38^{*a}	40,11 ± 2,72^{*b}	38,25 ± 1,79^{**b}	39,33 ± 4,33^{*b}	42,67 ± 6,29	46,75 ± 9,36
	ALP	303,6 ± 8,34	570,3 ± 15,32^{****a}	335 ± 13,84^{**a,} ^{****b}	310,67 ± 10,33^{****b}	322,33 ± 12,33^{****b}	340,75 ± 8,57^{***a,} ^{****b}	366,25 ± 4,62^{****a,} ^{****b}
	GGT	2,4 ± 1,02	4 ± 1,15	3,33 ± 0,58	3 ± 2,83	3,75 ± 1,40	3 ± 2,50	3,75 ± 1,41

G I : Groupe contrôle ; G II : EG ; G III : EG+ Cystone (500 mg/kg) ; G IV : EG+ EHE *Z. mays* (500 mg/kg); G V: EG+ EHE *O. ficus indica* (250 mg/kg); G VI: EG+ *Z. mays* T (76 mg/kg); G VII : EG+ *Z. mays* F (15 mg/kg) ; *a :* comparaison entre le groupe normal et tous les groupes ; b : Comparaison entre le groupe EG et tous les groupes.**p < 0,05; ** p <0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001*

V. Discussion

L'effet préventif de nos extraits a été recherché chez des rats rendus lithiasiques par l'administration de l'éthylène glycol par voie orale à raison de 0,75 %. Les résultats des effets de l'EG ; démontrés dans la présente étude, sont similaires aux résultats rapportés par [366-373]. L'administration chronique de solution aqueuse contenant 0,75 % (v / v) d'EG à des rats mâles a augmenté les taux de calcium, d'urée, de créatinine et d'acide urique [366-373].

B. Etude de l'activité anti lithiasique *in vivo*

L'acide glycolique, précurseur de l'acide oxalique et produit du métabolisme de l'EG, augmente considérablement l'incidence de la lithiase d'oxalate [374]. D'autres études ont montré que l'EG augmente également les taux sériques de créatinine, d'acide urique et d'azote uréique du sang indiquant une atteinte rénale [367,373].

Dans la présente étude, l'administration chronique d'EG dans de l'eau de boisson a entraîné une augmentation significative du volume urinaire chez le rat. Des études rapportées dans [366-373] montrent le même effet par l'administration de l'EG.

Les extraits et fractions d'extraits étudiés sont plus efficaces que la Cystone dans l'augmentation de l'excrétion urinaire. Cette augmentation réduit la concentration urinaire en calcium ainsi que la sursaturation et la cristallisation. Cependant, l'administration des extraits à provoquer une augmentation prononcée du volume urinaire sans augmentation des déchets dans le sang. Par conséquent, ils pourraient prévenir des lésions rénales.

Durant l'étude de la variation du pH urinaire, on a noté une légère augmentation du pH pour tous les groupes par rapport aux G I et ceci pendant toute la durée du traitement.

Nos résultats ont montré une augmentation des niveaux de calcium et du phosphate et une diminution de l'excrétion du magnésium dans les échantillons d'urine de 24 heures du groupe traité par l'éthylène glycol. En outre, cette augmentation facilite la formation de calculs de phosphate de calcium et, finalement, de calculs d'oxalate de calcium. Ceci a été confirmé par l'examen microscopique.

Les extraits étudiés montrent une réduction de l'excrétion urinaire du calcium et du phosphate et une augmentation de l'excrétion urinaire du magnésium par rapport au groupe G II traité par l'EG. L'administration des extraits a permis une prévention de la formation des calculs. Le traitement à la cystone a également montré le même effet.

Une augmentation du calcium et du phosphate urinaire provoque la nucléation et la précipitation d'oxalate de calcium et de phosphate de calcium [375]. En plus, une augmentation de l'oxalate inorganique induit la formation de calculs en formant des cristaux de phosphate de calcium, qui induisent un dépôt d'oxalate de calcium.

Il a été constaté que le magnésium est un puissant inhibiteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium et réduit le potentiel de précipitation [376,377].

B. Etude de l'activité anti lithiasique *in vivo*

L'examen microscopique des cristaux urinaires dans les échantillons d'urine a révélé que ces derniers étaient absents dans l'urine des animaux témoins, alors que dans le groupe de traitement par EG, un grand nombre de cristaux variés ont été observés. Le traitement avec les extraits de *O. ficus indica*, *Z. mays*, fractions de tanins et flavonoïdes ou Cystone a réduit le nombre de cristaux ainsi que la taille des cristaux.

En ce qui concerne l'évaluation des paramètres biochimiques l'EG a augmenté l'excrétion urinaire de l'acide urique de la créatinine et de l'urée. Les cristaux d'acide urique adsorbent les composés organiques et participent à la formation de calculs d'oxalate de calcium [378].

L'extrait de *Z. mays* (500 mg/kg/pc) est l'extrait le plus efficace parmi ceux étudiés. La capacité de *Z. mays* à réduire l'excrétion urinaire d'acide urique pourrait aider à dissoudre les calculs préformés et aider également à prévenir la formation de nouveaux calculs [367, 378].

La fonction hépatique a été surveillée par la mesure des taux sériques d'ALT, AST, GGT et d'ALP. L'éthylène glycol a augmenté les enzymes hépatiques, qui ont été normalisées par les extraits étudiés, fractions d'extraits ou Cystone.

Il a été démontré que les antioxydants possèdent un effet protecteur contre la néphrotoxicité et la néphrolithiase induites par l'EG [367, 379, 380]. L'activité antioxydante de *Z. mays* pourrait avoir un effet préventif chez les rats traités à l'EG.

VI. Conclusion

En conclusion, l'éthylène glycol a montré une augmentation de l'excrétion urinaire de cristaux et de minéraux impliqués dans la formation de calculs urinaires. Cette excrétion a été nettement évitées avec l'utilisation des extraits de *O. ficus indica*, *Z. mays* et ces fractions, notamment les tanins, flavonoïdes ou de la cystone.

L'extrait de *Z. mays* a montré un meilleur résultat par rapport à la Cystone et ceci durant toute l'étude dans la prévention des calculs rénaux. Par conséquent, ce travail pourrait ouvrir la voie à l'utilisation de cet extrait dans la prévention de la formation des calculs.

Conclusion Générale

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail est de recenser les plantes médicinales et aromatiques utilisées traditionnellement par la population de la région de Fès- Meknès dans le traitement de la lithiase rénale d'une part. D'autre part, étudier le pouvoir antioxydant, les propriétés pharmacologiques ainsi que l'efficacité des extraits des plants étudiées dans la réduction massique des calculs rénaux par les extraits des plantes retenues lors de l'enquête ethnopharmacologique.

Dans une première partie, nous avons réalisé une enquête ethnopharmacologique afin de relever les plantes anti-lithiasiques dans la préfecture de Fès à savoir : la commune urbaine Fès-Médina, le centre hospitalier universitaire Hassan II et la source thermale (Sidi Hrazem et Skhinat). Les résultats de l'enquête montrent que les parties aériennes des plantes retenues constituent la partie la plus utilisée et que la décoction représente le mode de préparation le plus pratiqué dans les sites de l'étude. Dans ce travail, les plantes sélectionnées sont les plus citées lors de l'enquête ethnopharmacologique : *H. hirsuta*, *Z. mays*, *O. ficus indica*, *A. visnaga* et *Z. lotus*. Ces plantes ont fait l'objet d'un criblage phytochimique et d'un dosage préalable des polyphénols.

Les résultats obtenus relatifs à l'évaluation des activités antioxydantes par les techniques de DPPH, FRAP et CAT montrent que tous les extraits hydro-éthanoliques et aqueux sont dotés d'un pouvoir antioxydant très important. Les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *Z. mays* présentent le meilleur taux en polyphénols et en pouvoir antioxydant.

Nous avons montré l'efficacité de la dissolution des extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes étudiées ainsi que de leurs fractions (tanins et flavonoïdes) sur les deux types de calculs rénaux l'oxalate de calcium et la cystine. Les extraits aqueux et hydro-éthanoliques de *Z. mays* ont montré le meilleur taux de dissolution des calculs d'oxalate de calcium. Quant aux calculs cystiniques, les extraits aqueux et hydro-éthanoliques de *H. hirsuta* ont montré le meilleur taux de dissolution. Les fractions de tanins et de flavonoïdes ont montré un taux de dissolution moins important que celui des extraits hydro-éthanoliques correspondants. Ceci pourrait être interprété par un effet synergique des deux familles de polyphénols.

Dans l'étude des activités anti-inflammatoires, analgésiques et de la toxicité (aiguë et subaiguë) nous nous sommes focalisés sur les extraits hydro-éthanoliques de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* du fait qu'ils ont montré les meilleurs résultats de dissolution lors des tests *in vitro*.

Conclusion générale

L'étude de la toxicité aiguë montre que l'administration par voie orale de ces extraits aux doses de 250 - 500 et 2000 mg/Kg, p.c, ne présente aucun effet toxique durant les 14 jours d'essai. Le même résultat a été obtenu lors de l'étude de la toxicité subaiguë et ceci pour la dose de 500 mg/kg par voie orale pendant 28 jours.

Les extraits de *Z. mays* et de *H. hirsuta* à la dose de 500 mg/kg et l'extrait de *O. ficus indica* à la dose de 250 mg/kg, p.c ont montré un fort potentiel anti-inflammatoire dépassant même celui de l'anti-inflammatoire de référence qui est l'indométacine.

L'évaluation de l'activité analgésique des extraits étudiés a montré que l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* a le pourcentage d'inhibition de douleur le plus élevé pour les deux méthodes testées.

Ces résultats montrent que ces extraits administrés par voie orale agissent à la fois sur les symptômes inflammatoires et sont des nociceptifs sans effets indésirables observés aux doses étudiées.

L'étude de l'extrait hydro-éthanolique de *O. ficus indica* et de l'extrait de *Z. mays* et ses fractions (tanins et flavonoïdes) sur l'induction des calculs d'oxalate de calcium a été réalisé sur des rats *Wistar* mâles par l'utilisation de l'éthylène glycol. Les résultats obtenus montrent leur efficacité sur la prévention de la formation des calculs rénaux par rapport au médicament (cystone).

En conclusion, nos travaux confirment l'efficacité des vertus thérapeutiques des plantes sélectionnées par l'enquête ethnopharmacologique réalisée sur la population de la région Fès-Meknès.

Le meilleur résultat a été attribué à l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* qui est doté d'un pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, analgésique ainsi qu'un taux important de dissolution des calculs d'oxalates de calcium. Cet extrait pourrait constituer un traitement curatif et/ou prophylactique chez les patients atteints de lithiases ; notamment les patients atteints de calculs oxalo- calciques.

Vu l'importance de ce travail on pourrait dire que ces résultats vont ouvrir certainement la voie à l'utilisation de l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* dans la néphropathie en milieu clinique.

Conclusion générale

En perspectives, d'autres recherches sont en cours dans le but de :

- Approfondir l'étude de l'activité antibactérienne principalement sur des souches responsables de l'infection urinaire.
- Optimiser la meilleure dose pharmacologique efficace et sécuritaire.
- Evaluer par des essais cliniques l'efficacité des extraits étudiés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Keïta.O, (2006). Etude de la lithiase urinaire infectée au service d'urologie du centre hospitalier universitaire du point G. Thèse en Médecine, Faculté de médecine de pharmacie et d'ondontostomatologie, Université de Bamako.

[2] Stamatelou K.K., Francis M.E., Jones C.A., Nyberg L.M. Jr, Curhan G.C. (2003). Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994, Kidney Int., 63:1817-1823.

[3] Daudon M, reveillaud RJ (1985). Morphological typing of calcium oxalate calculi and etiopathogenic finding. Ann Urol 19:299-309.

[4] Daudon M, Bader CA, Jungers P (1993). Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. Scanning microsc 7: 1081-1106.

[5] Jungers P, cathala N, Dussol B, Daudon M, (1999). (a) traitement médicale de la lithiase calcique primitive. Prog urol 9: 38-42.

[6] Nieto A (1985). Plantas medicinales con accion diurécia. Panorama actual del medicamento 80:24.

[7] Kourilsky.O. (2014). Lithiase rénale. Néphrologie et troubles hydroélectrolytiques, Elsevier Masson ; 166-184.

[8] Johnson C.M., Wilson D.M., O'fallon W.M., Malek R.S., Kurland L.T. (1979). Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota, Kidney Int; 16: 624.

[9] Daudon M, (2005). Epidémiologie actuelle de lithiase rénale en France. Ann urol 39 :209-231.

[10] Daudon M., Traxer O., Lechevallier E., Saussine C (2008). La lithogenèse, Progrès en urologie ; 18 :815-827.

[11] Jungers P., Daudon M., Conort P, (1999). Lithiase rénale. Diagnostic et traitement, Chap. 2 : Mécanisme de la lithogenèse, Paris, Flammarion Médecine-Sciences., 1999 ; 17-34.

[12] Thongbooker V, Semangoen T, Chutipongtanate S. (2006). Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. Clinica chmica acta 367 : 120-131.

[13] Daudon M., Cohen-Solal F., Jungers P. (2000). Mécanismes de la lithogenèse et de la cristallurie, Biologie & Santé ; 1(1) :50-65.

[14] Atmani F., Opalko F.J., Khan S.R. (1997). Cellular membranes present in the whole human urine promote heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals. In: Jungers P., Daudon M.: (eds). Renal Stone Disease. Crystallization process, pathophysiology, metabolic disorders and prevention, Paris, Elsevier; 143-144.

[15] Sheng X, Jung T, Wesson JA, Ward MD. (2005). Adhesion at calcium oxalate crystal surfaces and the effect of urinary constituents. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 267-272.

[16] Kok D.J., Papapoulos S.E., Bijvoet O.L. (1990). Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation, Kidney Int; 37:51- 6.

[17] Berland Y, Dussol B. (1993). Les inhibiteurs glycoprotéiques de la formation des calculs urinaires. Nephrol 14: 183 -187.

[18] Daudon M., Hennequin C., Bader C., Jungers P., Lacour B., Druecke T. (1995). Inhibitors of crystallization, Adv Nephrol Necker Hosp; 24:167-216.

[19] Koka RM, huang E, Lieske JC. (2000). Adhesion of uric acid crystals to the surface of renal epithelial cells. Am J physiol renal physiol, 278 : 989-998.

[20] Daudon M., Traxer O., Jungers P. (2012). Lithiase urinaire, 2e ed., Lavoisier, Paris: Médecine-Sciences; 672 pages.

[21] Daudon M, (1989). Methodes d'analyse des calculs et des cristaux urinaires, classification morpho-constitutionnelle des calculs, in : Jungers P., Daudon M. : A le Duc, lithiase urinaire, Paris, Flammrion Medecine- science ; 35-113.

[22] Prien EL., Frondel C, (1947). Studies in urolithiasis; the composition of urinary calculi, J Urol ;57(6):949-94.

[23] Saupe E, (1931). Rongen diagramme von menschiiichen korkengeweben und kondrementen, Fortsh Geb Rontgenst; 44:204-211.

[24] Daudon M., Protat M.F., Réveilland R.J., Jaescke-Boyer H, (1983). Infrared spectrometry and Raman microprobein the analysis of urinary calcui, kidney Int; 23:842-850.

[25] Nguyen Q.D., Daudon M, (1997). Infrared and Raman spectra of calculi, Paris Elsevier; pp 348. 16.

[26] Balla A.A., Salah A.M., Khattab A.H., Kambal A., et al, (1998). Mineral composition of renal stones from the Sudan, Uro Int; 61:154-156.

[27] Jing Z., Guozeng W., Ning J., et al, (2010). Analysis of urinary calculi composition by infrared spectroscopy: a prospective study of 625 patients in eastern China, Urol Res; 38:111-115.

[28] Daudon M., Protat M.F., Réveillaud R.J, (1978). Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge : avantages et limites de la méthode, Ann. Biol. Clin; 36:475-489.

[29] Maurice-Estepa L., Levillain P., Lacour B., Daudon M, (2000). Advantage of zero-crossing-point firstderivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry, Clin Chim Acta; 298(1-2):1-11.

[30] Hong T.D., Phat D., Plaza P et al, (1992). Identification of urinary calculi by Raman laser fiber optics spectroscopy, Clin Chem, 38:292-298.

[31] Kodati V.R., Tu A.T., Nath R., Turumin J.L, (1993). Analysis of urinary calculi of mixed and unusual composition: Raman spectroscopic investigation, Applied Spectroscopy; 47:334-337.

[32] Kaloustian J., El-Moselhy T.F., Portugal H, (2003). Determination of calcium oxalate (mono and dehydrate) in mixture with magnesium ammonium phosphate or uric acid: the use of simultaneous thermal analysis in urinary calculi, Clin Chim Acta; 334:117-129.

[33] Rodgers A.L, (1985). The application of physico-chemical procedures in the analysis of urinary calculi, Scan Electron Microsc; (Pt 2):745-58.

[34] Krambeck A.E., Lingeman J.E., Mcateer J.A., William J.C, (2010). Analysis of mixed stones is prone to error: a study with US laboratories using micro CT for verification of sample content, Urol Res: 38, 469-475.

[35] Daudon M, (1993). Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat, Euro biol; 27 :35-46.

[36] Shuber G, Brien G, (1981). Crystallographic investigations of urinary calcium oxalate calculi. Int urol nephrol 13:249-260.

[37] kim KM, Resau J, chung J, (1984). Scanning electron microscopy of urinary stone as a diagnostiqc tool. Scanning E microsc IV : 1819-1831.

[38] Daudon M., Réveillaud R.J, (1984). Whewellite et weddellite : vers des étiopathologénies différentes. Intérêt du typage morphologique des calculs, Néphrologie; 5 :195-201.

[39] Daudon M., Réveillaud R.J., Jungers P, (1985). Piridxilate-associated calcium oxalate urinary calculi: a new metabolic drug-induced nephrolithiasis, Lancet; 8441,1338.

[40] Estépa L., Daudon M, (1997). Contribution of Fourier transform infared spectroscopy to the identification of urinary stone and kidney crystal deposits, Biospectroscopy; 3:347-69.

[41] Daudon M., Bounxouei B., Santa Cruz F., Leite Da Silva S., Diouf B., Angwafoo III F.F., Talati J, Desrez G, (2004). Composition des calculs observés aujourd'hui dans les pays non industrialisés, Prog Urol ; 14 :1151-1161.

[42] Griffith D.P, (1987). struvite stone, Kidney int; 13:372-82.

[43] Bertrand D,(2004). Les lithiases rénales, Springer-Verlag France, Paris : pp 54-55.

[44] Jungers P., Daudon M., Le Duc A, (1989). Lithiase urinaire, Flammarion Médecine-sciences, Paris ; 158-95.

[45] Algood C.C.B., Sood N., Fairchild T., Mayo M.E, (1983). Experimental study of ureteral calculus disease: effects of calculus size, obstruction and hydration, J Urol; 130: 999-1004.

[46] Shokeir A.A, (2001). Renal colic: pathophysiology, diagnosis and treatment, Eur Urol; 39:241-9.

[47] Buzelin J.M, (2000). Points d'actualité et interview : prise en charge des coliques néphrétiques de l'adulte dans les services d'accueil et d'urgences, Progres FMC; 1 :25-6.

[48] Manfredini R., Gallerani M., Cecilia O., Boari B., Fersini C., Ortaluppi F, (2002). Circadian pattern in occurrence of renal colic in an emergency department: analysis of patients' notes, BMJ; 324,7340:767.

[49] Cohen R.A., Brown R.S, (2003). Clinical practice. Microscopic hematuria, N Engl J Med; 348: 2330-38.

[50] Foxman B, (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs, American Journal of Medicine; 113:5S-13S.

[51] Rakototiana A.F., Ramorasata A.J. C., Rakotomena S.D., Rantomalala Y.H, (2011). Anurie obstructive : à propos de 42 cas consécutifs, Revue d'Anesthésie-Réanimation et de Médecine d'Urgence ; 3,1 :32-34.

[52] Cass A.S, (1992). In situ extracorporeal shock wave lithotripsy for obstrucying ureteral stones with acuterenal, J Urol; 148:1786-7.

[53] Lardon R., Lacroix B., Lorin S., Mottet N. (2012). Néphrolithotomie percutanée : faut-il passer du décubitus ventral au décubitus dorsal, Progrès en urologie ; 22 :154-158.

[54] Fall B., Mouracade P., Bergerat S., Saussine C, (2014). L'urétéroscopie souple-laser dans le traitement des calculs du rein et de l'uretère : indications, morbidité et résultats, Progrès en urologie ; 24 : 771-776.

[55] Pires C., Machet F., Dahmani L., Irani J., Dore B., Gaucher O, (2003). Sensibilité de la radiographie de l'abdomen sans préparation par rapport à la tomodensitométrie dans l'évaluation des fragments résiduels après NLPC, Progrès en Urologie ; 13,4 :581-584.

[56] Bruneton J., (1999). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, TEC&DOC (Editions), 3ème édition, pp. 497-538.

[57] Bruneton, J. (2008). Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 3ème éd., Paris, pp. 1120.

[58] Ramakrishna A and Ravishankar G A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. 6(11), 1-12.

[59] Merghem R. (2009). Eléments de biochimie végétale. Bahaeddine Editions: 95-121.

[60] Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.J. Acta. biologica. szegediensis. 47 (1-4):119-125.

[61] Crozier A., Clifford M. N, Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites, Blackwell Publishing, Oxford UK. P 348. ISBN: 978-1-405-12509-3.

[62] Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L and Zhang Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves. Food Chem Toxicol. 49: 2689-2696.

[63] Naczk M and Shahidi F. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press. P 567. ISBN 9780367395094.

[64] King A., and Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. Jof the American dietetic association.99:213-218.

[65] Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies?. Biomed.pharmacother. 56: 200-207.

[66] Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275.

[67] Khanbabae K and Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Definition. Journal of Royal Society of Chemistry. 18 : 641-649.

[68] Paris M et Hurabielle. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.

[69] Bruneton J., (2009). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, TEC&DOC Lavoisier, 4ème édition, Paris, pp. 307-308, 559-561, 937-938.

[70] Judd Walter S, Campbell Christopher S, Kellogg Elizabeth A, Stevens Peter, (2002). Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université ,84-87 ,396-399.

[71] Beretz A, Cazenave JP, (1991). Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. Planta Med 57 (7): S68-72.

[72] Shih CM, Lin H, Liang YC, et al. (2004). Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 496 (1-3): 41-8.

[73] Youdim KA, McDonald J, Kalt W, et al. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). J Nutr Biochem 13 (5): 282-8.

[74] Asongalem EA, Foyet HS, Ngogang J, et al. (2004). Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. J Ethnopharmacol 91 (2-3): 301-8.

[75] Cruz T, Gálvez J, Ocete MA, et al. (1998). Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. Life Sci 62 (7): 687-95.

[76] Friesenecker B, Tsai AG, Intaglietta M, (1995). Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. Int J Microcirc Clin Exp 15 (Suppl): 17-21.

[77] Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC, (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev 52: 673-751.

[78] Pelzer LE, Guardia T, Juarez AO, et al. (1998). Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. Farmaco 53 (6): 421-4.

[79] Sánchez de Medina F, Vera B, Gálvez J, et al. (2002). Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. Life Sci 70 (26): 3097-108.

[80] Yongmoon H. (2005). *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on Candida albicans-caused arthritic inflammation. Int Immunopharmacol 5 (6): 1049-56.

[81] Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, et al. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. Farmaco 40 (11): 709-12.

[82] Bors W, Michel C, Stettmaier K, (1997). Antioxidant effects of flavonoids. Biofactors 6: 399-402.

[83] Cao G, Sofic, E, Prior RL, (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radic Biol Med 22: 749-60.

[84] Korkina LG, Afanas'ev IB, (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. Adv Pharmacol 38: 151-63.

[85] Miller AL, (1996). Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. Alt Med Rev 1996 1 (2): 103-11.

[86] Montoro P, Braca A, Pizza C, et al. (2005). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food Chem 92: 349-55.

[87] Jassim SA, Naji MA, (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plantperspective. Appl Microbiol 95 (3): 412-27.

[88] Jiang Du, Zhen-Dan He, Ren-Wang Jiang, et al. (2003). Antiviral flavonoidsfrom the root bark of *Morus alba* L. Phytochemistry 62 (8): 1235-8.

[89] Sokmen M, Angelova M, Krumova E, et al. (2005). *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geraniumsanguineum* L. Life Sci 76 (25): 2981-93.

[90] Taguri T, Tanaka T, Kouno I, (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol Pharm Bull 27 (12): 1965-9.

[91] Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M, (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata.* Lett Appl Microbiol 39 (1): 60-4.

[92] Wei F, Ma SC, Ma LY, et al. (2004). Antiviral flavonoids from the seeds of *Aesculus chinensis*. J Nat Prod 67 (4): 650-3.

[93] Yadava RN, Tiwari L, (2005). A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma* O. Kuntze. J Asian Nat Prod Res 7 (2): 185-8.

[94] Ghedira K., (2005). Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytotherapie, 3, pp. 162-169.

[95] O'Kennedy, R., and Thornes, R.D. (ed) (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

[96] Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol Re, 12 (4) : 564- 582.

[97] Fylaktakidou K, CHadjipavlou-Litina D J, Litinas K E, and Nicolaide DN. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. PubMed. ;10(30):3813-33.

[98] Min Mao PC, Mouscadet J F, Leh H, Auclair C, Yih Hsui L. (2002). Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. Chemical and pharmaceutical.50: 1634-1637.

[99] Miyake Y, Murakam A., Sugiyama Y, Isobe M, Koshimizu K, Ohigashi H, Agric J. (1999). Identification of Coumarins From Lemon Fruit (Citrus Limon) as Inhibitors of in Vitro Tumor Promotion and Superoxide and Nitric Oxide Generation. PubMed. 47 (8): 3151-3157.

[100] Sashidhara KV, Kumar A, Kumar M, Sarkar J, Sinha S. (2010). Synthesis and antihyperlipidemic activity of novel coumarin bisindole derivatives. Bioorganic et Medicinal Chemistry Letters.20: 6504-6507.

[101] Sashidhara K V, Kumar A, Kumar M, Sarkar J, Sinha S. (2010). Synthesis and anti hyperlipidemic activity of novel coumarin bisindole derivatives. Bioorganic et Medicinal Chemistry Letters. 20,7205–7211.

[102] Massimo Curini A, Francesco Epifano C, Federica Maltese A, Maria Carla Marcotullio A, Sylvia Prieto Gonzales B and Juan Carlos Rodriguez B. (2003). Synthesis of Collinin, an Antiviral Coumarin. CSIRO PUBLISHING. 56 : 59-60.

[103] Dridi F. (2015). S ynthèse et caractérisation des dérivés quinoniques. Application du tannage et test biologiques. Boumerdès: Faculté des Sciences de l'Ingénieur.

[104] El-Agrody A M, Abd El-Latif MS. El-Hady N A, Fakery AH, Bedair AH. (2001). Heteroaromatization with 4-Hydroxycoumarin Part II: Synthesis of Some New Pyrano [2,3-d] pyrimidines, [1,2,4] triazolo[1,5-c] pyrimidines and Pyrimido[1,6-b]- [1,2,4] triazine Derivatives.Molecules. 6: 519-527.

[105] Yu J, Wang L, Walzem R L, Miller E G, Pike L M, Patil B, Agric J. (2005). Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins.Agicultural and Food Chemistry. 53: 2009-2014.

[106] Campos Toimil M, Orallo F, Santana L, Uriarte E. (2002). Synthesis and Vasorelaxant Activity of New Coumarin and Furocoumarin Derivatives.Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 12:783-786.

[107] Rosenthal G A, Barenbaum M R. (1992). Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, 2nd edition,: New York : AcademicPress.

[108] Hadacek, F, Müller C, Werner A, Greger H. and Proksch P, (1994). Analysis, isolation and insecticidalactivity of linearfuranocoumarins and othercoumarinderivativesfrom Peucedanum ostruthium (Apiaceae: Apioideae). Journal of Chemical Ecology. 20: 2035-2054.

[109] Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K and Vuorela P. (2000). Antimicrobialactivity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. Journal of Ethnopharmacology. 73 (1-2) :299-305.

[110] Rachid A., (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethno-pharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (Ficus carica) et de coloquinte (Citrullus colocynthis) chez le rat Wistar, Thèse de doctorat. Université abou Bekr Belkaid Tlemcen.

[111] Grenby, T.H., (1991). Intense sweeteners for the food industry: an overview. Trends Food Sci. Technol. 2, 2–6.

[112] Kitagawa, I., (2002). Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. Pure Appl. Chem. 74, 1189–1198.

[113] Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G.A., Legger, L., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., Roozen, J.P., Voragen, A.G.J., (2006). b. Bitterness of saponins and their content in dry peas. J. Sci. Food Agric. 86, 1225–1231.

[114] Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., (1987). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26, 27–135.

[115] Attia AA. (1999). Triterpenoidal saponins from the aerial parts of Zygophyllum coccineum L. and Zygophyllum fabago L. Pharmazie, 54, 931–934.

[116] Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S. Ohgitani, T. Yoshikawa, M., (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. Biological Chemistry,381, 67–74.

[117] Sparg, S. G., M. E. Light and J. van Staden (2004). "Biological activities and distribution of plant saponins." Journal of Ethnopharmacology 94(2–3): 219-243.

[118] Petit, P.R., Sauvaire, Y.D., Hillaire-Buys, D.M., Leconte, O.M., Baissac, Y.G., Posin, G.R., Ribes, G.R., (1995). Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behaviour and plasma cholesterol. Steroids 60, 674–680.

[119] Uematsu, Y., Hirata, K., Saito, K., (2000). Spectrophotometric determination of saponin in Yucca extract used as food additive. J. AOAC Int. 83, 1451–1454.

[120] Beecher G.R., Khachik F. (1992). Qualitative Relationship of Dietary and Plasma Carotenoids in Human Beings. Beyond Deficiency: New Views on the Function and Health Effects of Vitamins. Academy of Sciences, New York. 669 (1) : 320-321.

[121] Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. Pp : 91-96.

[122] Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species, Arch. Biochem. Biophys, 385 (1): 13–19.

[123] El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J. Mortensen, V., Phillip, D.M., Truscott, T.G. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, Arch.Biochem. Biophys, 430 (1) : 37–48.

[124] Britton, G. (2008). Functions of intact carotenoids. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 189-212.

[125] Tapiero, H., D. M. Townsend, et al. (2004). "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies." Biomedicine and Pharmacotherapy 58: 100-110.

[126] Krinsky, N. I. and E. J. Johnson, (2005). "Carotenoid actions and their relation to health and disease." Molecular Aspects of Medicine 26(6): 459-516.

[127] Stahl, W. and H. Sies, (2005). "Bioactivity and protective effects of natural carotenoids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1740(2): 101-107.

[128] Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (2009). Nutrition and health. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG. Carotenoids: Volume 5.

[129] Rock, C. L. (2009). Carotenoids and cancer. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG. pp 269-286.

[130] Stahl, W. and H. Sies, (2003). "Antioxidant activity of carotenoids." Molecular Aspects of Medicine 24(6): 345-351.

[131] Malecky M., (2007). Métabolisme des terpénoides chez les caprins, Thèse de Doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).

[132] McCalley, D.V., (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. Journal of Chromatography A, 967, 1–19.

[133] Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D., (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups Review. Journal of Chromatography A, 967, 85–113.

[134] Bhat S. V., Nagasampagi B. A., Sivakumar M., (2005). Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India., Ch. 4 : 237.

[135] Iserin P., Masson M., et Restellini J.P., (2007). Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins. Ed Larousse, pp14.

[136] Guy G, (1997). Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse. Édition L'Harmattan paris. P 428. SBN : 2-7384-5643-X.

[137] Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.-F., (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Phytothérapie, 6: 160-164.

[138] Conner D.E. (1993). Naturally occuring compounds. In P. Davidson & A. L. Branen, Antimicrobials in foods. New York, NY: Marcel Dekker, 441-468.

[139] Benjilali B. (2005). Extraction des Plantes Aromatiques et Médicinales Cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique. Corporation LASEVE. pp, 17-59.

[140] AFNOR, (1980). Association Française de Normalisation, Tour Europe, Cedex 7 - 92080 Paris.

[141] L.R. Hernandez Ochoa, (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale, Institut National Polytechnique de Toulouse, thèse.

[142] A. Marrouf, G. Tremblin, (2009). Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences. P 484. ISBN 978-2-7598-0446-7.

[143] Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007). Solvent free microwave extraction of Elletaria cardamomum L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Journal of Food Engineering. 79, pp.1079–1086.

[144] Wang L., Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology, 17, pp.300 – 312.

[145] Meredith R. (1998). Engineers Handbook of Industrial Microwave Heating. The institution of Electrical Engineers, London. P 380. ISBN: 978-0852969168.

[146] M. Romdhane, (1993). Extraction solide liquide sous ultrasons, INPT, thèse de doctorat.

[147] Wood J.A., Bernards M.A., Wan W., Charpentier P.A. (2006). Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide, J. Supercrit. Fluids. 39, 40-47.

[148] Carlson L.H.C., Machado R.A.F., Spricigo C.B., Pereira L.K., Bolzan A. (2001). Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids. 21, pp.33-39.

[149] Penchev P. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.

[150] Sofowera A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris : 384.

[151] Pierre M., Lis .M (2007). Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1: 463.

[152] Danielski L., Campos L.M.A.S., Bresciani L.F.V., Hense H., Yunes R.A., Ferreira S.R.S. (2007). Marigold (Calendula officinalis L.) oleoresin: Solubility in SC-CO_2 and composition profile. Chemical Engineering and Processing. 46, pp.99–106.

[153] Reighard T.S., Olesik S.V. (2006). Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 26, pp.1-39.

[154] Thomas Michel. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides). Alimentation et Nutrition. Université d'Orléans. NNT : 2011ORLE2032.

[155] Delphin Justin Rabehaja Rakotondragaby, (2013). Production et analyse d'huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales de Madagascar. Caractérisation par RMN13C, CPG(Ir) et CPG-SM. Chimie organique. Thèse de Doctorat de l'Université Pascal Paoli. NNT : 2013CORT0005.

[156] Bellakhdar J. (2008). Hommes et Plantes au Maghreb. Eléments pour une méthode en ethnobotanique. Plurimondes. Ed. Lulu & Lefennec. pp. 145-147.

[157] Schultes R.E. (1972). From witch doctor to modern medicine: searching the American tropics for potentially new medical plants, Arnoldia, 32,5, pp. 198-219.

[158] Balick M.J. (1990). Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest; in: Chadwick D.J & Marsh J., Bioactive compounds from plants (Ciba Foundation Symposium n°154), Chichester, Wiley, pp. 22-32.

[159] Cox P.A. (1994). the ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. In : Chadwick D.J & Marsh J., Ethnobotany and the search for new drugs (Ciba Foundation Symposium n°185), Chichester, Wiley, pp. 25-36.

[160] Elisabetsky E. (1986). New direction in ethnopharmacology, Journal of Ethnobiology, 6, 121-128.

[161] Browner C.H., Ortiz de Montellano B.R., Rubel A.J. (1988). A methodology for cross-culural ethnmedical research. Current anthropology, 29, 681-702.

[162] Lipp F.J. (1989). Methods for ethnopharmacological field work, Journal of Ethnopharmacology, 25, 139-150.

[163] Elisabetsky E. et De Moraes J.A.R. (1990). Ethnopharmacology : a technological development strategy. In : Ethnobiology : Implications and applications. Preceedings of the first Congres of ethnobiology, Vol. 2, pp. 111-118.

[164] Fleurentin J., Canallion P., Mazars G., Dos santos J., Younos C., (1990). Ethnopharmacologie, sources, méthodes, objectifs (Actes du premier Colloque européen d'Ethnopharmacologie, Metz, 23-25, paris , Ed. ORSTOM, 493 p.

[165] Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle, Paris, Ibis Press, 764 p.

[166] Boukhiraa S., Mansouri L. EL., Bousta D., (2013). Ethnobotanical studies of some medicinal and cosmetic plants used in the province of Sefrou, Middle Atlas of Morocco. The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine. Photon. 120, 661-670.

[167] Bammi J., et Douira A. (2002). Les plantes médicinales dans la forêt de L'achach (plateau central, Maroc). Acta Botanica Malacitana 27: 131-145.

[168] Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology. 35: 123-143.

[169] Benabid A. (2000). Morocco flora and ecosystems. Evaluation and preservation of biodiversity, ed: Ibis Press, Paris. 359.

[170] Benkhnigue O., Zidane L., Fadli1 M., Elyacoubi H., Rochdi1 A. et Douira A. (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Botanica. 53 : 191-216.

[171] Bouayyadi L., El Hafian M., Zidane L. (2015). Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. Journal of Applied Biosciences. 93: 8760 – 8769.

[172] Bousta D., Boukhira S., Aafi A., Ghanmi M., El Mansouri L. (2014). Ethnopharmacological Study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region), International Journal of Pharma Research and Health Sciences, 2 (1): 75-79.

[173] El-Hilaly J., Hmammouchi M., Lyoussi B. (2003). Ethnobotanical Studies and Economic Evaluation of Medicinal Plants in Taounate Province (Northern Morocco). Journal of Ethnopharmacology. 149–158.

[174] Ennabili A., Gharnit N., Maach Y., El Meskaoui A., Bousta D. (2006). Exploitation des plantes médicinales et alimentaires du bassin versant de l'oued Laou (nord-ouest du Maroc). J bot Soc Bot France. 36 : 71-79.

[175] Khabbach A, M. Libiad, A. Ennabili, D. Bousta, (2012). Medicinal and cosmetic use of plants from the province of Taza, Northern Morocco. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11 (1), 46 - 60.

[176] Mehdioui R., Kahoudji A. (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bull Inst Scient (Rabat), section Sciences de la Vie. 29: 11 - 20.

[177] M. Ghourri, L. Zidane, A. Douira. (2013). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien), Int. J. Biol. Chem Sci ; 7(4):1688-1700.

[178] A. Khouchlaa · M. Tijane · A. Chebat · S. Hseini · A. Kahouadji. (2017). Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de la lithiase urinaire au Maroc. Phytothérapie. 15 :274-287.

[179] Salhi S, Fadli M, Zidane L et Douira A. (2010). Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). Lazaroa ; 31 : 133-46.

[180] Hseini S et Kahouadji A. (2007). Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). Lazaroa ; 28 :79-93.

[181] Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M et Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). Lejeunia 2009 ; N° :186.

[182] Bellakhdar J. (2006). Plantes médicinales au Maghreb et soins de base précis de phytothérapie moderne. Ed le Fennec, pp. 13- 23.

[183] M. Stefova, S. Kulevanova, and T. Stafilov. (2001). "Assay of flavonols and quantification of quercetin in medicinal plants by HPLC with UV-diode array detection". In: Journal of liquid chromatography & related technologies 24.15, pp. 2283–2292.

[184] A.N. Mbark et al. (1999). "New glycosides from Herniaria fontanesii". In: Studies in Plant Science. 6, pp. 314–319.

[185] G. Reznicek et al. (1993). "The first two spectroscopically confirmed saponins from Herniaria glabra L." In: Pharmazie 48.6, pp. 450–452.

[186] Newal CA, Anderson LA, (1996). A Guide for Health-care Professionals. Pharmaceutical Press. Phillipson JD. Herbal Medicine, London. P 432. ISBN-13: 978-0853692898.

[187] Pedretti M, (1980). L'Erborista Moderno Manuale teóricoprático di fitoterapia com spiegazione dell'effeto farmacologico dele piante medicinali. Studio Editorial, Milan. p. 327-328.

[188] Velazquez DVO, Xavier HS, Batista JEM, de Casro- Chaves C. (2005). *Zea mays* L. Extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. Phytomedicine. 12: 363- 369.

[189] Kaur G, Alam MS, Jabbar Z, Javed K, Athar M. (2006). Evaluation of antioxidant activity of Cassia siamea flowers. Journal of Ethnopharmacology. 108: 340–348.

[190] Grases, F., J.G. March, M. Ramis, and A. Costa-Bauza. (1993). The influence of Zea mays on urinary risk factors for kidney stones in rats. Phytotherapy Research. 7: 146–149.

[191] T.E. Moussa-Ayoub et al. (2014). Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus Opuntia ficus-indica Food Research International. 64, 864–872.

[192] R. Ibanez-Camacho, R. Roman-Ramos, (1979), Hypoglycemic effect of Opuntia cactus, Arch. Invest. Med. (Mex) 10, 223–230.

[193] A. Trejo-Gonzalez, G. Gabriel-Ortiz, A.M. Puebla-Perez, M.D. Huizar-Contreras, M.R. Munguia-Mazarigos, C.E. Mejia-Arreguins, (1996). A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fulginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats, J. Ethnopharmacol. J. 55, 27–33.

[194] E.M. Galati, M.T. Monforte, M.M. Tripodo, A. d'Aquino, M.R. Mondello, (2001). Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaeceae): ultrastructural study, J. Ethnopharmacol. 76. 1-9.

[195] E.B. Lee, J.E. Hyun, D.W. Li, Y.I. Moon, (2002). Effects of *Opuntia. ficus-indica* var. *Saboten* stem on gastric damages in rats, Arch. Pharm. Res. 25 :67–70.

[196] N.H. Lee, J.-S. Yoon, B.H. Lee, B.W. Choi, K.H. Park, (2000). Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition, and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*, Kor. J. Pharmacogn. 31: 412–415.

[197] E.-H. Park, J.H. Kahng, E.-A. Paek, (1998). Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect, Arch. Pharm. Res. 21, 30–34.

[198] E.-H. Park, J.H. Kahng, S.H. Lee, K.H. Shin, (2001). An anti-inflammatory principle from cactus, Fitoterapia 72: 288–290.

[199] Ali esmail Al Snafi, (2013). Chemical constituents and pharmacological activities of Ammi majus and ammi visnaga a review. Int. J. Pharm & Ind. Res. Vol.-03(03), 257-265.

[200] Bencheraiet, R., Kherrab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z. and Jay, M. (2011). Flavonolsand antioxidant activity of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae). Rec. Nat. Prod. 5: 52-55.

[201] Quinby, M.W. (1953). *Ammi visnaga* Lam.-A medicinal plant. Econ. Bot. 7: 89-92.

[202] Semyari, H., Owlia, P., Farhadi, S. and Tabrizi, S.M. (2011). Evaluation of antimicrobial effect of *Ammi visnaga* against oral streptococci. J. Microbiol. Antimicrob. 3: 126-129.

[203] Misra, H.O., Lal, R.K., Gupta, A.K., Kumar, B., Misra, A.N., Sarkar, S., Gupta, V., Singh,S., Gupta, P., Zaim, M. and Singh, V.R. (2013). Genetic variability, character association and path analysis for economic traits in Bishop's weed (*Ammi visnaga* L.) Lam. Ind. Crop. Prod. 49: 593-597.

[204] K. Ghedira, (2013). Zizyphus lotus (L.) Desf. (Rhamnaceae) : jujubier sauvage, Phytothérapie ; 11 :149-153.

[205] Bellakhdar J, (1978). Médecine traditionnelle et toxicologie ouestsaharienne. Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Édition Technique Nord-Africaine, Rabat. P 55-77.

[206] Abdel-Zaher A.O., Salim S.Y., Assaf M.H. et Abdel-Hady R.H. (2005). Antidiabetic activity and toxicity of Zizyphus spina-christi leaves. J. Ethnopharmacol, 101:129-138.

[207] Suksamrarn S., Suwannapoch N., Aunchai N., Kuno M., Ratananukul P., Haritakum R., Jansakul C. et Ruchirawat S. (2005). Ziziphine N, O, P, new antiplasmodial cyclopeptides alkaloids from Zizyphus oenoplia var. brunoniana. Tetrahedron, 61 :1175- 1180.

[208] Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K: (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr Med Chem, 10(23):2495-2505.

[209] Fridovich I, (1978). The biology of oxygen radicals. Science, 201(4359) : 875-880.

[210] Sies H, Cadenas E, (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 311(1152):617-631.

[211] Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO, (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. Science, 119(3097):623-626.

[212] Gilbert DL, (2000). Fifty years of radical ideas. Ann N Y Acad Sci , 899:1-14.

[213] Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, Unio tumidus, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol Environ Saf 38, 122-131.

[214] Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. Biochem.77 : 147- 161.

[215] Jacques B., and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses. Paris : 217-219-220-223-225.

[216] Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. Free Radic. Res. Commun. 19 : 141-158.

[217] Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 108-115.

[218] Atawodi S.E. (2005). Antioxidant potential of African plants. African J. of Biotec. 4 (2): 128-133.

[219] Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M. Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence medhod. AAPS Pharm Sci. 5 (2) : 5.

[220] Gutteridge, J.M., Halliwell, B., (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 15, 129-135.

[221] J. Haleng and al, (2007). Le stress oxidant, Rev Med Liege; 62: 10: 628-638.

[222] Brand-Williams W, Cuvelier MF, Berset C, (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. Technol. Leb ; 28 : 25–30.

[223] Hennebelle T. (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamialés productrices d'antioxydants : Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota

pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées). Thèse de Doctorat en Chimie organique et Macromoléculaire de l'Université de Lille1.

[224] Niki, E., (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radic. Biol. Med. 49, 503-515.

[225] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231–1237.

[226] Miquel-Becker E., Niessen L.R. & Skibsted L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: foods quality or health effects. Food Research and Technology. 219 : 561-571.

[227] Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural Food Chemistry, 49, 4619–4626.

[228] Benzie I.F.F., and Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239 (1) : 70-76.

[229] Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolationprocedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science Food and Agriculture, 77 : 140 - 146.

[230] Portes E. (2008). Synthèse et Etudes de étrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de doctorat. № γ695. Université Bordeaux I. β44p.

[231] Hussain A.I. (2009). Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Doctorale thesis, Pakistan. 257.

[232] Moon J-K., and Shibamoto T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J. Agric. Food Chem. 57 (5): 1655-1666.

[233] Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). "Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E", Analytical Biochemistry, 269, pp. 337 – 341.

[234] Castro L., Freeman B.A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. Nutrition. 170: 161-165.

[235] Siddhuraju P., Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp) seed extracts. Food Chem. 101: 10-19.

[236] Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI, (1987). The deoxyribose method: a simple ‘‘test tube’’ assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem; 165:215–219.

[237] Ryan, G. B., & Majno, G. (1977). Acute inflammation. A review. The American journal of pathology, 86(1), 183.

[238] Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. African Journal of Biotechnology, 6(25).

[239] Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. The Journal of clinical investigation, 118(2), 413-420.

[240] Queiroz A C, Daysianne Periera de Lira, Thays de Lima Matos Freire Dias, Everton Tenorio de Souza, Crolina Barbosa Brito DA Matta, (2010). «The antinociceptive and anti-inflammatory activities of Piptadenia stipulacea Benth. (Fabaceae) » ; Journal of Ethnopharmacology ; Vol 128 ; pp : 377-383.

[241] Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.

[242] Medzhitov, R. (2010). Inflammation (2010). New adventures of an old flame. Cell, 140(6), 771-776.

[243] Dieng C. (1993). Contribution à l’étude de Khaya senegalensis (DESR.) A.JUSS (Meliaceae). Thèse pharmacie, Dakar, 10, 109 P.

[244] Bayes O.M. (1997). Contribution à l’étude de l’activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de Balanites aegyptiaca L. (Zygophyllaceae). Thèse pharmacie, Bamako. 67 p.

[245] Revillard H. (2001). « Immunologie » ; De Boeck Université 4ème Edition; p : 600.

[246] Charles, N. S., Peter, A. W. & Derek, W. G. (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.

[247] Stevens A., Lowe J., Barbara Y. (2004). Anatomie pathologique générale et spéciale. Édition De Boeck .4e Édition. Bruxelle, P 25.

[248] Meyer R.A., Campbell J.N. & Raja S.N. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. Edinburgh, Chruchill-Livingstone.

[249] Capron F., (1998). Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. Revue du praticien 20, 2273-2276.

[250] Diouf A. (1991). Etude des médiateurs et leurs rôles physiopathologiques. Thèse Pharmacie, Dakar ; 44 P.

[251] Kidd B.L. & Urban L.A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. British Journal of Anaesthesia, 87, (1), 3-11.

[252] Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue medicale de Liege*, *56*(6), 433-42.

[253] Male D., Roitt Y., Brostoff J., Roth D.B. (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: Immunologie. Eds, Masson (France): 155.

[254] Rankin JA. (2004). Biological mediators of acute inflammation. AACN Clin Issues. 15: 3 -17.

[255] Vonkeman, H.E., Van de Laar, M.A.F.J., (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. Semin. Arthritis Rheum. 39, 294-312.

[256] Yvan T., (1997). Pharmacologie. 8ème Edit. Masson. Paris-Milan-Barcelone ; 388 p.

[257] Touitou Yvan. (1996). Pharmacologie. Diplôme d'Etat d'Infirmier (e), 7eme édition Paris. 407p.

[258] Jick, H. (1994). Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet*, *343*(8900), 769- 772.

[259] Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009). NSAID prescribing precautions. *American family physician*, *80*(12), 1371-8.

[260] Blain, Jouzeau, Netter and Jeandel. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. Rev Méd Interne. 21: 978-88.

[261] Bony E. (2010). Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (Astrocaryum vulgare M.). Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier 2 Sciences et Techniques du Languedoc.

[262] Henzen, C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes : risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum.* (Vol. 19, pp. 442-6).

[263] Van Arman C.G. (1974). Anti-inflammatory drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 16, 900-904.

[264] Cohen Y. (1997). Les anti-inflammatoires, in Abrégé de pharmacologie. Ed.4 Masson, Paris, 465 p.

[265] Coyen Y. (1990). Les médiateurs chimiques de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie. Ed.3 Masson, Paris, 333-350.

[266] Winter C.A., Risley E.A., Nuss C.W. (1962). Carrageenan-induced oedema in hind paw of rats-an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of Society Experimental Biology Medicine 111, 544-547.

[267] Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W., (2001). Animal models of nociception. Pharmacological Reviews, 53, 597-652.

[268] Wright S., (1973). Physiologie appliquée à la médicine » ; Flammarion Médicine-Sciences, 12 éme éd. Paris ; p : 606.

[269] Besson J.M. (1990) : « Le nocicept » ; ion Moniteurs des pharmacies et des laboratoires ; pp : 8- 13.

[270] Melzack R. (1997). L'aspect multidimensionnel de la douleur. In (L. Brasseur, M. Chauvin & G. Guilbaud). Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques. Paris, Maloine, p. 1-3.

[271] Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S. (2004). Afferent pathways: a neuroanatomical review. Brain research, 1000, 40-56.

[272] Traoré M.C. (2006). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysmenorrhee au Mali. Thèse de Doctorat. Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto –Stomatologie. Université de Bamako.

[273] Boureau, Doubrère, (2016). « DOULEUR », Encyclopædia Universalis. http://www.universalis.fr/encyclopedie/douleur/.

[274] Colot M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Masson. 1 vol. 137 p.

[275] Dupont C. (1987). Le cout des études toxicologiques d'un nouveau médicament. Lett. Pharma. ; 1 : 1.

[276] Claude JR. (1985). Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. Sem. Hop. Paris.

[277] Antonius, G.F., Kochhar, T.S., Jarret, R.L., Syder, J.C. (2006). Antioxidants in hot pepper: variation among accesions. Journal of Environmental Science and Health. Part B (41);1237-1243.

[278] Buenz EJ. (2006). Developed countries should be the focus for effectively reducing chronic disease. J. Epidemiol. Community Health ; 60(7) : 562-3.

[279] OCDE (2002), Essai n° 423 : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071018-fr.

[280] OCDE (2008), Essai n° 407 : Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070691-fr.

[281] Grases F, Costa-Bauzà, (2000) Fitoterapia de la lithiasis renal : entre el mito y la realidad. Medicina clinica 115: 779-782.

[282] Anubhav Nagal, Rajeev K Singla, (2013). Herbal Resources with Antiurolithiatic Effects: A Review, Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences; 3(1): 6-14.

[283] Garimella TS, Jolly CI, Narayanan S, (2001). In vitro studies on antilithiatic activity of seeds of Dolichos biflorus Linn. And rhizomes of Berginia ligulata Wall. Phytotherapy research; 15: 315-355.

[284] Kumaran MGS, Prasad SR and Mitra SK, (2007). Evaluation of efficacy and safety of cystone syrup in lower ureteric calculus. Indian J. Clin. Prac; 18: 31-36.

[285] Yasin Bayira, Zekai Halici, Mevlut Sait Keles, Suat Colak, Ahmet Cakir, Yusuf Kaya, Fatih Akay, (2011). Helichrysum plicatum DC. subsp. plicatum extract as a preventive agent in experimentally induced urolithiasis model, Journal of Ethnopharmacology 138: 408– 414.

[286] P. Vanachayangkul, N. Chow, S. R. Khan, Veronika Butterweck, (2011). Prevention of renal crystal deposition by an extract of Ammi visnaga L. and its constituents khellin and visnagin in hyperoxaluric rats, Urol Res: 39:189–195.

[287] P. Vanachayangkul et al. (2010). An aqueouse xtract of Ammi visnaga fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells Phytomedicine 17: 653–658.

[288] Yu-Sen Zhong, Chen-HuanYu, Hua-ZhongYing, Zhi-YuanWang, Hua-FangCai, (2012). Prophylactic effects of Orthosiphon stamineus Benth. Extracts on experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in rats, Journal of Ethnopharmacology 144 :761–767.

[289] Vyas BA, Vyas RB, Joshi SV, Santani DD, (2011). Anti-urolithiatic Activity of Whole-Plant Hydroalcoholic Extract of *Pergularia daemia* in Rats, J Young Pharm ;3(1): 36-40.

[290] Saeidi Jafar, Lotfi Mehri, Bozorgi Hadi and Mehrzad jamshid, (2012). The antiurolithiasic and hepatocurative activities of aqueous extracts of *Petroselinum sativum* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats, Scientific Research and Essays Vol. 7(15), pp. 1577-1583, 23.

[291] Surachet Woottisin et al, (2011). Effects of Orthosiphon grandiflorus, Hibiscus sabdariffa and Phyllanthus amarus Extracts on Risk Factors for Urinary Calcium Oxalate Stones in Rats, the journal of urology, Vol. 185, 323-328.

[292] Ajij Ahmeda, AbdulWadud, NasreenJahan, AliaBilal, SyedaHajera, (2013). Efficacy of Adiantum capillus veneris Linn in chemically induced urolithiasis in rats. Journal of Ethnopharmacology 146 : 411–416.

[293] B. Hannache, D. Bazin, A. Boutefnouchet, M. grass, (2012). Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique, Progres en urologie : 22, 577—582.

[294] A. Amar, D. Harrache, F. Atmani, G. Bassou, F. Grillon, (2010). Effet de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine, Phytothérapie : 8 :342–347.

[295] Rabie Kachkoul, Tarik Sqalli Houssaini, Radouane El Habbani, Youssef Miyah, Mohamed Mohim, Anissa Lahrichi. (2018). Phytochemical screening and inhibitory activity of oxalocalcic crystallization of Arbutus unedo L. leaves. Heliyon: 4: e01011.

[296] Sarmistha Saha, Ramtej J. (2013). Verma, Inhibition of calcium oxalate crystallisationin vitro by an extract of Bergenia ciliata, Arab Journal of Urology :11, 187–192.

[297] Meiouet F., El Kabbaj S., Daudon M. (2011). Étude In Vitro De L'activité Litholytique De Quatre Plantes Médicinales Vis-A-Vis Des Calculs Urinaires De Cystine, Progrès En Urologie ; 21 : 40- 47.

[298] R. El Habbani, A. Chaqroune, T. Sqalli Houssaini, M. Arrayhani, A. Lahrichi, (2015). Contribution to the Study of the Mass Reduction of Stones by Some Medicinal Plants, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, Vol. 4, Issue 4.

[299] Abdel-Aal, E.A., Yassin, A.M.K. and El-Shahat, M.F. (2016). 'Inhibition of nucleation and crystallisation of kidney stone (calcium oxalate monohydrate) using *Ammi Visnaga* (khella) plant extract', *Int. J. Nano and Biomaterials*, Vol. 6, No. 2, pp.110–126.

[300] Kachkoul R, et al. (2018). The study of the inhibitory effect of calcium oxalate monohydrate's crystallization by two medicinal and aromatic plants: Ammi visnaga and Punica granatum. Prog Urol. 28(3) :156-165.

[301] ROYAUME DU MAROC Ministère de l'Intérieur Direction Générale des Collectivités Locales, haut-commissariat du plan, (2017), la région Fès-Meknès, monographie générale. https://www.hcp.ma/region-fes/Annuaires-et-Monographies_r2.html.

[302] Diallo A., (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineense WILLD. (Myrtaceae), Thèse de pharmacie. Faculte de Medecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (Fmpos). Université de Bamako.

[303] Akkol E.K., Goger F., Kosar M., Baser K.H.C. (2008). "Phenolic composition and biological activities of Salvia halophile and Salvia virgate from Turkey", Food Chemistry, Vol. 108, pp. 942 – 949, November.

[304] Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F., Trotin F. (2000). "Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (FagopyrumesculentumMoench) hulls and flour", Journal of Ethnopharmacology, 72, pp. 35 – 42.

[305] F. Sahin, R. C¸akmakc¸i, and F. Kantar, (2004). Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N2-fixing and phosphate solubilizing bacteria," *Plant and Soil*, vol. 265, no. 1-2, pp. 123– 129.

[306] Oyaizu M. (1986). "Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine", Japan. J. Nutr, 44, pp. 307 – 315.

[307] Ramadan A., Soliman G., Mahmoud S.S., Nofal S.M. and Abdel-Rahman R.F. (2012). Evaluation of the safety and antioxidant activities of Crocus sativus and Propolis ethanolic extracts. J. Saudi Chem. Soc. 16: 13-21.

[308] Hernandez-Perez M., and Rabanal R.M. (2002). Evaluation of the antinflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. pannosa in mice. J. Ethnopharmacol. 81: 43-47.

[309] Marzouk Zohra, Ehsen Haloui, Nadia Fenina, Abderrahman Bouraoui, Mahjoub Aouni: (2010). «Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from Southern Tunisia»; Journal of Ethnopharmacology; Vol 128(1, 2); pp: 15-19.

[310] G.F.B. De Miranda, J.C. Vilar, I.A. Nunes Alves, S.C.H. Cavalcanti, and A.R. Antoniolli, (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of

Tabebuia avellendae lor. Ex griseb. Inner bark aqueous extracts", B.M.C. Pharmacology, pp. 1-6.

[311] S. Hunskaar, and K. Hole (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain", Pain, vol. 30, pp. 103-114.

[312] Selvam P, Kalaiselvie P, Govindaraj A, Murugan VB, Sathishkumar AS, (2001). Effect of A. lata leaf extract and vediuppu on theurinary risqué factors of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperxaluria. Pharmacol Res. 43: 89-93.

[313] khan SR, (1991). Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. Am J Kidney Dis 17: 398-401.

[314] Huang HS, Ma MC, Chen J, Chen CF, (2002). Change in the oxidant-intioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. J Urol. 167 :2584-2593.

[315] Cruzan G, Corley RA, Hard GC, Metens JJWM, McMartin KE, Snellings WM, Gingell R, Deyo JA, (2004). Subchronic toxicity of ethylene glycol in wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites. Toxicol Sci. 81: 502-511.

[316] Mitra SK, Gopumadhavan S, Venkatarangannna MV, et al. (1998). Effect of cystone, a herbal formulation, on glycolic acid-induced urolithiasis in rats. Phytother Res ;12 : 372e374.

[317] Hamdani, S.E., (1984). Médecine traditionnelle a Boujaad. Thèse de Pharmacie. Fac. Med. Pharm. Rabat.

[318] El Beghdadi, M., (1991). Pharmacopée traditionnelle du Maroc. Les plantes médicinales et les affections du syste`me cardio-vasculaire. Thèse de Pharmacie. Fac. Med. Pharm. Rabat.

[319] Jaouad, L., (1992). Enquête ethnobotanique : la part de la médecine traditionnelle dans les différentes couches socio-économiques de la population de Casablanca. Thèse de Pharmacie. Fac. Med. Pharm. Rabat.

[320] Nabih, M., (1992). Secrets et vertus thérapeutiques des plantes médicinales utilise ´es en médecine traditionnelle dans la province de Settat. Thèse de Pharmacie. Fac. Med. Pharm. Rabat.

[321] Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology 58, 45–54.

[322] Anyinam C, (1995) Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. Soc Sci Med. 4 :321–9.

[323] El Yahyaoui O, Ait ouaaziz N, Sammama A, et al. (2015). Étude ethnobotanique : plantes médicinales commercialisées à la province de Laâyoune : identification et utilisation. Int J Innov Appl Stud 12:533–41.

[324] Bigendako-Polygenis, M.J. & Lejoly, J. (1990). La pharmacopée traditionnelle au Burundi. Pesticides et médicaments en santé animale. Pres. Univ. Namur. Pp. 425-442.

[325] P. Molyneux. (2004). “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”. In: Songklanakarin J. Sci. Technol. 26.2, pp. 211–219.

[326] Stalikas CD. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. J Sep; 30:3268e95.

[327] Lee T.Y., Mai L.M., Wang G.J., Chiu J.H., Lin Y.L., Lin H.C. (2003). Protective mechanism of salvia miltiorrhiza on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. J. Pharmacol. Sci. 91: 202–210.

[328] Chatha SAS, Anwar F, Manzoor M, et al. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. Grasas Aceites; 57:328e35.

[329] Sultana B, Anwar F, Ashraf M. (2009). Effect of extraction solvent/ technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules; 14:2167e80.

[330] Békro Y.A, Janat a, békro M, Boua B. B, trabi F.H and Éhilé E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de caesalpinia benthamiana (baill.) herend et zarucchi (caesalpiniaceae). *Sciences & nature*. vol 4 n° 2: 217 – 225.

[331] J. Wadhwa, A. Nair, R. Kumria, (2011). Pharmaceut. Ther. Curr. Drug. Deliv., 10, 198-207.

[332] Miguel M., Bouchamaa N., Aazza S., Gaamoussi F., & Lyoussi B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants. *Fresenius Environ Bull*, *23*, 1375-88.

[333] Rsaissi.N, EL KAMILI, B. Bencharki, L. Hillali& M. Bouhache, (2013). Antimicrobial activity of fruits extracts of the wild jujube "*Ziziphus Lotus* (L.) Desf. International Journal of Scientific & Engineering Research, Volume 4, Issue 9. ISSN 2229-5518.

[334] Djemai Zoughlache S., Yahia M., Hambaba L., Abdeddaim M., Aberkan M C., Ayachi A. (2009). 'Etude de l'activité biologique d'extraits du fruit du Zizyphus lotus L'. TJMPNP ; 2: 10-23.

[335] Djemai zoughlache soumia, (2009), Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. thèse en biochimie appliqué. Algérie.

[336] Li J-W, Fan L-P., Ding S-D., Ding X-L. (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry, 103*: 454-460.

[337] Imene Ammar, Monia Ennouria, Hamadi Attiaaa, (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (Opuntia ficus-indica L.) flowers are modified according to the extractionmethod. Industrial Crops and Products. 64, 97–104.

[338] Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology. 32: 43-49.

[339] Liu, J.; Wang, C.; Wang, Z.; Zhang, C.; Lu, S.; Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chem, 126*, 261–269.

[340] B. Tepe, O. Eminagaoglu, H. A. Akpulat, and E. Aydin, (2007). "Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of Salvia verticillata (L.) subsp. verticillata and S. verticillata (L.) subsp. amasiaca (Freyn & Bornm.) Bornm," *Food Chemistry*, vol. 100, no. 3, pp. 985–989.

[341] Alam, E.A. (2011). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Egyptian *Maydis stigma* (*Zea mays* hairs) rich in some bioactive constituents. *J. Am. Sci, 7*, 726–729.

[342] Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Emin Duru M., Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. Food Chemistry, 103, pp. 623–630.

[343] Jaradat.N A and al, (2015), Phytochemical Screening and in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial Aactivities of the entire khella plant (Ammi visnaga.L.) a member of palestinian Flora. IJPR,, 7,137-143.

[344] Hichem Alimia, Najla Hfaiedh, Zouhour Bouoni, Mohsen Sakly, Khémais Ben Rhouma. (2011). Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of*Opuntia ficus indica f. inermis* flowers extract in rats. environmental toxicology and pharmacology. 3 2, 406–416.

[345] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. Food Sci Nutr. 2018; 00: 1–10.

[346] Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry, 105(2), 822–828.

[347] Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., … Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. Molecules, 17(9), 11199–11215.

[348] Adams DH, Abernathy BB. (1996). Laser ureterolithotripsy for cystine calculi. AORN ;64:924-30.

[349] Tekin A, Tekgul S, Atsu NA, et al. (2001). Cystine calculi in children: the results of a metabolic evaluation and response to medical therapy. J Urol; 165:2328—30.

[350] Parvex P, Rozen R, Dziarmaga A, Goodyer P. (2003). Studies of urinary cystine precipitation in vitro: ontogeny of cystine nephrolithiasis and identification of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid as a potential therapy for cystinuria. Mol Genet Metab ;80 :419—25.

[351] Jungers P. (2004). La lithiase cystinique. In: Dore B, editor. Les lithiases rénales. Paris: Springer-Verlag. p. 137- 44.

[352] Daudon M. (2000). L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant, Arch PCdiatr ; 7 :855-65.

[353] Hamid Rhiouani, Jaouad El-Hilaly, Zafar H. Israili , Badiâa Lyoussi. (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents Journal of Ethnopharmacology. 118; 378–386.

[354] Cuina Wang, Tiehua Zhang, Jun Liu, Shuang Lu, Cheng Zhang, Erlei Wang, Zuozhao Wang, Yan Zhang, Jingbo Liu. (2011). Subchronic toxicity study of corn silk with rats. Journal of Ethnopharmacology 137. 36– 43.

[355] Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. (1969). 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the Biphasic development of carrageenan oedema in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 166, pp. 96-103.

[356] Frederico AV, Higor FL, Elson AC, et al., (2009). Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L., Brazil. J Pharmaceut Sci 45: 437–442.

[357] Rylski M., Duriaz-Rowinska H., Rewerski W. (1979). The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. Acta Physiol Pol. 30, pp.385-392.

[358] Duke J.A. (1992). Handbook of Biological Active Phytochemicals and their Active Phytochemicals and their Activities. CRC Press, Boca Raton, FL. 208. ISBN 9780849336706.

[359] Kaur R., Singh D., Chopra K. (2005). Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. Journal of Medicine & Food. 8, pp. 529–532.

[360] Naidu P.S., Singh A., Kulkarni S.K. (2003). D2-dopamine receptor and alpha2-adrenoreceptor-mediated analgesic response of quercetin. Indian J Exp Biol. 41, pp. 1400-1404.

[361] Zhang Y., Jia Y.Y., Guo J.L., Liu P.Q., Jiang J.M. (2013). Effects of (-)-gallocatechin-3-gallate on tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. Int J Mol Sci. 14, pp. 9779 – 9789.

[362] Centers for Disease Control and Prevention. (2017). National Chronic Kidney Disease Fact Sheet. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.

[363] Leye A, Jaeger P, Robertson W, *et al*. (2007). Renal stone disease. J. *Medicine*, 35(8): 415-419.

[364] Tiselius HG (2003). Epidemiology and medical management of stone disease. BJU Int 91:758–767.

[365] Ruml LA, Pearle MS, Pak CYC, (1997). Medical therapy. Calcium oxalate urolithiasis. Urol. Clin. North Am. 24: 117-33.

[366] Tyl RW, Price C, Marr C, et al. (1993). Developmental toxicity evaluation of ethylene glycol by gavage in New Zealand white rabbits. Fundam Appl Toxicol; 20: 402-412.

[367] Ashok P, Koti BC, Vishwanathswamy AH. (2010). Anti-urolithiatic and antioxidant activity of Minusops elengi on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. Indian J Pharmacol; 42: 380-383.

[368] Nizami AN, Rahman MA, Ahmed NU, et al. Whole Lee, (2012). a macrophylla ethanolic extract normalizes kidney deposits and recovers renal impairments in an ethylene glycol-induced urolithiasis model of rats. Asian Pac J Trop Med; 5: 533-538.

[369] Shah J, Patel B, Patel S, et al. (2012). Antiurolithiatic and antioxidant activity of Hordeum vulgare seeds on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. Indian J Pharmacol ; 44 : 672-677.

[370] Tugcu V, Kemahli E, Ozbek E, et al. (2008). Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. J Endourol; 22: 2723-2731.

[371] Varalakshmi P, Shamila Y, Latha E. (1990). Effect of Crataeva nurvala in experimental urolithiasis. J Ethnopharmacol; 28: 313-321.

[372] Kalyani P. (2010). Protective effect of the hydro-alcoholic extract of Rubia cordifolia roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. Food Chem Toxicol; 48:1013-1018.

[373] El Menyiy et al. (2016). Protective Effect of Propolis in Proteinuria, Crystaluria, Nephrotoxicity and Hepatotoxicity Induced by Ethylene Glycol Ingestion. Archives of Medical Research. 47. 526-534.

[374] Berman LB, Schreiner GE, Feys J. (1957). The nephrotoxic lesion of ethylene glycol. Ann Intern Med; 46:611-619.

[375] Robertson G, Peacock M. (1980). The course of idiopathic calcium disease: hypercalciuria or hyperoxaluria. Nephron; 26:105-110.

[376] Kohri K, Garside J, Blacklock NJ. (1988). The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. Br J Urol; 61:107-115.

[377] Rushton HG, (1982). Spector M. Effects of magnesium deficiency on intratubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluric rats. J Urol; 127:598-604.

[378] Roger K, Low MD, Stoller ML. (1997). Uric acid nephrolithiasis. Urol Clin North Am; 24:135-148.

[379] Selvam R. (2002). Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. Urol Res; 30:35-47.

[380] Bijarnia RK, Kaur T, Aggarwal K, et al. (2008). Modulatory effects of N-acetylcysteine on hyperoxaluric manifestations in rat kidney. Food Chem Toxicol; 46:2274-2278.

Annexe

Annexe 1

Modèle-questionnaire d'Enquête Ethnopharmacologique

Fiche n° : **Date :**

1- **Renseignement sur l'informateur**

- Sexe : Femme □ Homme □
- Age :
- Situation familiale : Célibataire □ Marie □
- Niveau académique : Néant □ Primaire □ Secondaire □ Universitaire □
- Région :
- Métier : Herboriste □ Guérisseur □ Autres :
- Comment vous avez eu ces remèdes ?

  Par un membre de la famille □ ou autre personne □

- Livres (quels livres de médecine arabe possède-t-il ou quels auteurs se réfère –t-il ou à quels auteurs se réfère-t-il à l'occasion ?

- Qui consultez-vous en cas de maladie ?

  - Personnel médical □
  - Guérisseur □
  - Autres □

2- **Renseignement sur le praticien :**

- Sexe : Femme □ Homme □
- Age :
- Région :
- Depuis quand exerce-t-il le métier de guérisseur ?
- Qu'il a formé ?
- S'il s'agit d'un praticien lettré, quels livres possède-i-il ?
- Est-il polyvalent ou exerce une spécialité dans le traitement d'une maladie ?
- A-t-il formé quelqu'un ?

3- **Renseignement sur le produit :**

3-1 Simple :

- Nom vernaculaire :
- Nom scientifique :
- Usage de la plante : Therapeutique □ Cosmétique □ Autres □
- Plante seule □ Association possible (de plantes) □ :

- Parties utilisées : Tige □ Fleurs □ Fruits □ Graine □ Ecorce □ Rhizome □ Bulbe □ Feuilles □ Plante entière □
- Autres combinaisons :
- Forme d'emploi : Tisane □ Poudre □ Huiles essentielles □ Huiles grasses □ Extrait (teinture, solution, gélule) □ :
- Mode de préparation : Infusion □ Décoction □ Cataplasme □ Cru □ Cuit □ Autres □ :
- Dose utilisée : Pincée □ Poignée □ Cuillerée □
- Dose précise : Quantité en g / verre :
- Quantité en g/ litre :
- Mode d'administration : Oral□ Massage □ Badigeonnage □ Autres □ :
- Posologie : nombre de prise par jour.
    - Pour les enfants : 1fois/jour □ 2fois/jour □ 3fois/jour □ Autres □ :
    - Pour les personnes âgées : 1fois/jour □ 2fois/jour □ 3fois/jour □ Autres □ :
    - Pour les Adultes : 1fois/jour □ 2fois/jour □ 3fois/jour □ Autres □ :
- Durée d'utilisation (durée de traitement) :
    - Un jour □ Une semaine □ Un mois □ Jusqu'a la guérison □
- Signes de guérison :
- Conditions et modalités de la récolte saison, période du jour, site géologique)
- Traitement reçu par le produit : (séchage, pulvérisation)
- Technique de conservation de la plante
- Nombre de personne (connues) ayant utilisé se remède ?
- Nombre de personnes guéries ?
- En cas de non guérison que faire ?

3-2 Mixture : (recette)

- Indications :
- Effets secondaires :
- Posologie et mode d'administration :
- Préparation du remède :
- Associations :
- Nombre d'année vécus dans la région source de ces recettes (formulations

Les activités scientifiques durant la formation de doctorat

➢ Articles scientifiques :

- ***Kenza Ammor***, *Fatima Mahjoubi, Dalila Bousta, Radouane Elhabbani, Abdellah Chaqroune.* « ***In vitro* litholytic activity of extracts and phenolic fractions of some medicinal plants on urinary stones** ». Mediterranean Journal of Chemistry. 2020, 9(6), 468-477.

- ***Kenza Ammor***, *Dalila Bousta, Sanae Jennan Fatima Ez-zahra Amarti Rida Lagzizir Abdellah Chaqroune and Fatima Mahjoubi.* « **Study of Antioxidant, Anti-inflammatory, anti-antinociceptive activities and toxicity of stigmata of *Zea* mays extracts from Morocco**». Phytothérapie. 2019.10.3166/phyto-2019-0209.

- ***Kenza Ammor***, *Dalila Bousta, Sanae Jennan, Bahia Bennani, Abdellah Chaqroune, and FatimaMahjoubi.* « **Phytochemical Screening, Polyphenols Content, Antioxidant Power, and Antibacterial Activity of *Herniariahirsuta* from Morocco** ». The Scientific World Journal. Volume 2018, Article ID 7470384, 7 pages.

- ***Kenza Ammor***, *Bousta Dalila, Jennan Sanae, Chaqroune Abdellah, Mahjoubi Fatima.* « **Total Polyphenol Content and Antioxidant Power of *Ammi visnaga* from Morocco** ». Der Pharma Chemica, 2017, 9(4):73-78.

- *Sarra Aourabi, Majid Driouch,* ***Kenza Ammor***, *Mouhcine Sfaira, Mohamed Ebn Touhami and Fatima Mahjoubi.* « **Evaluation of Anticorrosion and Antioxidant Activities of Ethanolic Extract of *Ammi Visnaga*** ». Anal. Bioanal. Electrochem., Vol. 10, No. 7, 2018, 912-929.

➢ Communication orale :

- ***Kenza Ammor***, *Dalila Bousta, Sanae Jennan, Fatima Ez-zahra Amarti, Rida Lagzizir, Abdellah Chaqroune and Fatima Mahjoubi.* « **Study of toxicity, Anti-inflammatory and anti-antinociceptive activities of *Herniaria hirsute* extract from Morocco** ». 7éme SYMPOSIUM international des plantes aromatique et médicinales (SIPAM 2019). El Jadida 18-20 avril 2019.

- ***Ammor Kenza***, *Mahjoubi Fatima, Boucetta Dalila, Jennan Sanae, Bennani Bahia, Chaqroune Abdellah.* « **Extracts of stigmata of *Zea mays* valorisation by study of antioxidant, anti-bacterial activity**». XIV^{ème} Symposium International sur l'Environnement,

Catalyse et Génie des procédés ECGP'14. Université de Lille, Ecole Mines – Télécom Lille Douai, Douai – France. 5-7 Décembre 2017.

- ***K. AMMOR***, *D. BOUSTA, F. MAHJOUBI, A. CHAQROUNE.* « **Activité antioxydante et quantification de biomolécules extraites de drogue végétale d'*O. ficus indica*** ». Premier congrès International : maladies Chronique et qualité de vie. 15-16 décembre 2016.

➢ **Communications affichées :**

- ***K. Ammor***, *D. Boucetta, S. Jennane, A. Chaqroune, F. Mahjoubi.* « **Antioxydant activity of different extracts of *zizyphus lotus* from north of morocco** ». 9th Trans Mediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry. Fès – Maroc. 22-25 November 2017.
- ***K. Ammor***, *A. Chaqroune.* « **Valorisation des extraits de bio déchets contre la corrosion de l'acier doux C 38 en milieux HCL 1M** ». 3ème édition du Colloque International sur la valorisation des déchets pour un développement durable V3D-2016 sous le thème : " Gestion durable des rejets solides et liquides et prévention de la pollution " labellisée par le comité de pilotage de la COP22. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté des Science Fès-Maroc. 05 Novembre 2016.
- ***Kenza AMMOR***, *Fatima MAHJOUBI, Latifa EL MANSOURI, Radouane HABANE, Dalila BOUSTA, Abdellah CHAQROUNE.* « **Screening phytochimique de différents extraits d'*Ammi visnaga* collectée dans la région de Taounate** ». Forum internationale des plantes aromatiques et médicinales : valorisation et innovation. Faculté des sciences et techniques Fès le 26-28 Novembre 2015.
- ***Kenza AMMOR***, *Abdellah CHAQROUNE.* « **Etude physicochimique de la Réduction massique des calculs rénaux par des extraits végétaux** ». PÔLE DE RECHERCHE « EAU ET ENVIRONEMENT » FORUM PR2E. Faculté des sciences et techniques Fès le 23 Novembre 2015.
- ***Kenza AMMOR***, *Fatima MAHJOUBI, Sanae JENNAN, Mohammed HAMMOU, Dalila BOUSTA, Abdellah CHAQROUNE.* « **Enquête ethnobotanique des plantes utilisées pour le traitement de la lithiase rénale dans la station thermale sidi Harazem** ». Journées Scientifiques : outiles d'innovation pour la valorisation des systèmes hétérocycliques des plantes médicinales et aromatiques. Faculté des sciences Dhar el mahraz le 5-6 juin 2015.

Résumé

Dans le but de recenser les plantes utilisées traditionnellement contre la lithiase rénale et de vérifier leur efficacité *in vivo* et *in vitro*, une enquête a été effectuée au sein du service de Néphrologie au Centre Hospitalier Universitaire Hassan II, à l'ancienne médina de Fès, à la station thermale de Sidi Hrazem et à Skhinat. Dans cette étude, plusieurs plantes ont été sélectionnées dont les plus citées sont : *Herniaria hirsuta*, *Zea mays*, *Opuntia ficus indica*, *Ammi visnaga* et *Zizyphus lotus*.

Les extraits hydro-éthanoliques et aqueux des plantes retenues par l'enquête ont fait objet d'un criblage phytochimique et d'une évaluation de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antalgiques. Aussi leurs effets sur la dissolution des calculs d'oxalate de calcium et des calculs de cystine ont été testés. De même, l'efficacité des extraits sur la prévention de la formation des calculs d'oxalate de calcium a été mené dans ce travail.

Les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *Z. mays* présentent le meilleur taux en polyphénol et en capacité antioxydante. Ainsi que le meilleur taux de dissolution des calculs d'oxalate de calcium. Quant aux calculs cystiniques, les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de *H. hirsuta* ont donné le meilleur taux de dissolution.

L'étude de la toxicité montre que l'administration orale des extraits hydro-éthanoliques de *Z. mays*, *O. ficus indica* et *H. hirsuta* aux doses de 250 - 500 et 2000 mg/Kg de p.c des rats, n'exercent aucun effet toxique. L'activité anti-inflammatoire à la dose de 500 mg/kg pour les extraits de *Z. mays* et *H. hirsuta* et la dose de 250 mg/kg pour *O. ficus indica* ont montré un fort potentiel anti-inflammatoire. L'évaluation de l'activité analgésique a montré que l'extrait hydro-éthanolique de *Z. mays* a le pourcentage d'inhibition de la douleur le plus élevé pour les deux méthodes testées.

L'étude *in vivo* de l'extrait hydro-éthanolique de *O. ficus indica* et de l'extrait de *Z. mays* et ses fractions (tanins et flavonoïdes) sur l'induction des calculs d'oxalate de calcium montre l'efficacité de ces extraits sur la prévention de la formation des calculs rénaux.

Nos travaux confirment l'efficacité des vertus thérapeutiques découvertes par la population autochtone de la région de Fès – Meknès. Le meilleur résultat a été élucidé pour l'extrait de *Z. mays*, doté d'un taux de dissolution, d'un pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, analgésique très important.

Mots clé : Lithiase rénale, Enquête ethnopharmacologique, Herniaria hirsuta* L., *Opuntia ficus-indica* L., *Zea mays* L., *Ammi visnaga* L., *Zizyphus lotus* L., *activité antioxydante, dissolution, activité anti-inflammatoire, activité analgésique, activité anti-lithiasique, in vitro, in vivo.