جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ FES

N° d'ordre : **56/2024**

Centre D'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologie (MBSB)

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie Pharmacologie et Santé Environnementale

Laboratoire : Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Étude ethnobotanique, caractérisation phytochimique et évaluation de certaines activités pharmacologiques *in vivo* et *in vitro* des huiles essentielles de *Thymus algeriensis*, *Artemisia herba-alba* et de leurs composés majoritaires.

Présentée par :

EL OUAHDANI Khadija

Soutenue le 02 Novembre 2024 devant le jury :

Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
Pr. Khanchoufi Abdessalam	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès	Président
Pr. Zair Touria	PES	Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl-Meknès	Rapportrice
Pr. Souirti Zouhayr	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès	Rapporteur
Pr. El Aouad Noureddine	PH	Faculté de Médecine et de Pharmacie - Tanger	Rapporteur
Pr. Bari Amina	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès	Examinatrice
Dr. Benbacer Laila	PH	Centre de l'Energie des Sciences et des Techniques Nucléaires	Examinatrice
Pr. Elbrahmi Nabil	PH	Université Euro-Méditerranéenne de Fès	Examinateur
Pr. Bousta Dalila	PES	Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques	Directrice de thèse

Année universitaire : 2023-2024

Table des matières

Productions scientifiques I
Dédicaces III
Remerciements V
Abréviations et symboles VII
Liste des figures IX
Liste des tableaux XIII
Résumé XVI
Abstract XVIII
Introduction générale .....
Partie I. Synthèse bibliographique 3
Chapitre I. Aperçu sur les plantes aromatiques et médicinales au Maroc 4
Introduction 4
I. Richesse végétale du Maroc 4
1. Place des plantes aromatiques et médicinales au Maroc 4
2. Huiles essentielles 5
3. Phytothérapie 5
3.1 Avantages 5
3.2 Inconvénients 6
II. Ethnopharmacologie 6
III. Toxicité par les plantes aromatiques et médicinales 6
IV. Monographies des espèces cibles 7
1. Description de *Thymus* L. (Thym) 7
1.1 Taxonomie 7
1.2 Description botanique 8
1.3 Distribution géographique 8
1.4 Utilisation au Maroc 8
1.5 Composition chimique 9
1.6 Propriétés pharmacologique 9
2. Description d'*Artemisia.* L (Armoire) 9
2.1 Taxonomie 9
2.2 Description botanique 10
2.3 Distribution géographique 10
2.4 Utilisation au Maroc 11
2.5 Composition chimique 11

2.6 Propriétés pharmacologiques 12
Chapitre II. Etude toxicologique 13
1. Introduction 13
2. Définition de la toxicité 13
3. Types de toxicité 13
3.1 Toxicité aigüe selon les guidelines de l'OCDE "N° 423" 13
3.2 Toxicité subaiguë selon les guidelines de l'OCDE "N° 407" 13
3.3 Toxicité chronique selon les guidelines de l'OCDE "N° 453" 14
4. Voies d'administration 14
4.1 Voie orale 14
4.2 Voie intrapéritonéale 14
5. Tissus cibles de toxicité 15
5.1 Hépatotoxicité 15
5.2 Néphrotoxicité 15
Chapitre III. Cancer 16
1. Introduction 16
2. Définition 16
3. Types de cancer: Cancer du sein et cancer hépatique 16
3.1 Cancer du sein 16
3.2 Cancer hépatique 16
4. Cancérogénèse 17
5. Caractéristiques de la cellule cancéreuse 18
5.1 Autosuffisance aux signaux de croissance 18
5.1.1 Altération des signaux de croissance extracellulaires 18
5.1.2 Altération des récepteurs 18
5.1.3 Altération des voies de transduction intracellulaire 18
5.2 Insensibilité aux signaux d'inhibition 18
5.3 Résistance à 19
5.3 Potentiel réplicatif illimité 19
5.4 Angiogenèse 19
5.5 Invasion et métastase 19
6 Epidémiologie du cancer 20
6.1 Incidence du cancer 20
6.2 Incidence et mortalité au Maroc 20
7.Hormonothérapie 21

8. Thérapie ciblée 22
8.1 Inhibition des signaux de transduction cellulaire 22
8.1.1 Voie PI3K/AKT/mTOR 22
8.1.2 Voie de MAPK 23
8.2 Inhibiteur de l'angiogenèse 24
9. Plantes médicinales utilisées contre les cancers 24
Chapitre IV. Inflammation 26
1. Introduction 26
2. Définition 26
3. Etapes de la réaction inflammatoire 26
4. Formes cliniques de l'inflammation 30
4.1 Inflammation aiguë 30
4.2 Inflammation chronique 30
5. Médiateurs de l'inflammation 30
5.1 Amines vaso-actives 31
5.2 Protéines plasmatiques 32
6. Anti-inflammatoires 33
6.1 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens 33
6.1.1 Effets indésirables des AINS 33
6.2 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) 34
6.2.1 Effets indésirables des AIS 35
Chapitre V. Douleur 36
1. Définition 36
2. Types de douleur 36
2.1 Douleur aiguë 36
2.2 Douleur chronique 37
3. Traitement pharmacologique de la douleur 37
4. Mécanisme d'action des antalgiques 38
4.1 Antalgique non opioïdes 38
4.2 Antalgiques opioïdes 38
Chapitre VI. Stress oxydant 39
1. Introduction 39
2. Définition 39
3. Radicaux libres 40
4. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) 40

6. Pathologies liés au stress oxydant 41
7. Antioxydants 41
7.1 Définition 41
7.2 Système de défense antioxydant 42
7.2.1 Système de défense enzymatique 42
7.2.2 Système non-enzymatique 43
8. Différentes utilisations des antioxydants 44
9. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante 45
9.1 Piégeage des radicaux libres (DPPH) 45
9.2 Pouvoir antioxydant réducteur ferrique 45
Chapitre VI. Activité antimicrobienne 46
1. Introduction 46
2. Contaminations biologiques 46
3. Description des bactéries étudiées 46
3.1 *Staphylococcus aureus* 46
3.2 *Micrococcus luteus* 47
3.3 *Bacillus subtilis* 47
4. Description des champignons étudiés 47
4.1 *Candida albicans* 47
4.2 *Penicillium digitatum* 48
5. Traitements conventionnels 48
6. Antimicrobiens d'origine végétale 49
Partie II. Matériel et Méthodes 50
Chapitre I. Etude ethnobotanique 51
1. Etude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des cancers dans la ville de Casablanca 51
2. Zone d'étude 51
3. Fiche questionnaire 51
4. Matériel végétal 52
a. *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut 53
b. *Artemisia herba-alba* Asso 53
Chapitre II. Caractérisation phytochimique 55
1. Hydrodistillation 55
2. Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (GC-MS) 55
Chapitre III. Etude toxicologique 57

1. Toxicité aiguë selon l'OCDE n° 423 57
2. Toxicité subaiguë selon l'OCDE n° 407 57
3. Hépatotoxicité 58
Chapitre IV. Cytotoxicité 59
1. Lignées cellulaires utilisées 59
2. Traitement utilisé 59
Chapitre V. Activités anti-inflammatoire et analgésique 62
1. Etude du test anti-inflammatoire *in vivo* 62
2. Etude du test analgésique *in vivo* 62
Chapitre VI. Activités antioxydante et antimicrobienne 64
1. Etude antioxydante 64
1.1 Piégeage des radicaux libres (DPPH) 64
1.2 Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) 64
2. Test antimicrobien 65
2.1 Culture des souches microbiennes 65
2.2 Méthode de diffusion en puits sur gélose 65
Analyse statistique 66
Partie III. Résultats et discussion 66
Partie I : Etude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du cancer dans la région de Casablanca Settat 68
1. Introduction 69
2. Enquête ethnobotanique 69
2.1 Caractéristiques démographiques des personnes interrogées 69
3. Plantes médicinales utilisées par la population étudiée 72
3.1 Familles les plus citées 72
4. Parties végétales utilisées 74
5. Modes de préparation 75
6. Voies d'administration 75
7. Choix des plantes sélectionnées 76
8. Conclusion 77
Partie II : Etude phytochimique d'huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis* 78
Chapitre II. Etude phytochimique ..... **Erreur ! Signet non défini.**
1. Introduction 79
2. Rendement des huiles essentielles 79
3. Identification des composés phytochimiques 80

3.1 Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) 80
4. Conclusion 83
Partie III : Investigations toxicologiques et pharmacologiques des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis in vivo* et *in vitro* 84
I. Investigations toxicologiques 85
1. Etude de la toxicité aigüe 85
1.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité 85
1.2 Poids relatifs des organes (ROW) 87
1.3 Paramètres biochimiques 88
2. Etude de la toxicité subaiguë 88
2.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité 88
2.2 Poids relatifs des organes (ROW) 89
2.3 Paramètres biochimiques 89
2.4 Histopathologie des organes 91
2.5 Hépatotoxicité 92
2.5.1 Analyse des paramètres biochimiques 92
2.5.2 Altérations macroscopiques et histopathologiques 93
Conclusion 95
II. Activités pharmacologiques *in vivo* des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis* et leur mixture 96
1. Activité anti-inflammatoire 96
2. Activité analgésique 98
Conclusion 100
III. Activités biologiques *in vitro* 101
1. Activité antioxydante 101
2. Cytotoxicité 104
3. Activité antimicrobienne 107
Conclusion 110
Partie IV : Investigations toxicologiques et pharmacologiques de chrysanthenone et de thymol *in vivo* et *in vitro* 111
I. Investigations toxicologiques 112
1. Toxicité aiguë 112
1.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité 112
1.2 Poids relatifs des organes (ROW) 113
1.3 Paramètres biochimiques 114
2. Toxicité subaiguë 115

2.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité 115
2.2 Poids relatif des organes 116
2.3 Paramètres biochimiques 116
2.4 Histopathologie des organes 117
3. Hépatotoxicité 122
3.1 Analyse des paramètres biochimiques 122
3.2 Altérations macroscopiques et histopathologiques 124
Conclusion 126
III. Activités pharmacologiques *in vivo* du chrysanthenone et du thymol 126
1. Activité anti-inflammatoire 126
2. Activité analgésique 128
Conclusion 129
III. Activités biologiques *in vitro* 129
1. Activité antioxydante 129
2. Cytotoxicité 132
3. Activité antimicrobienne 135
Conclusion 138
Conclusion générale & perspectives 139
Références bibliographiques 1



PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES



Ce projet de recherche a été réalisé au sein du ″laboratoire de Biotechnologie, environnement, Agroalimentaire et Santé″. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de des publications et des communications présentées ci-dessous.

Publications

El Ouahdani Khadija.; Es-safi, I.; Mechchate, H.; Al-zahrani, M.; Qurtam, A.A.; Aleissa, M.; Bari, A.; Bousta, D. *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils: Chemical Analysis, Antioxidant Potential and In *vivo* Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Acute Toxicity. Molecules 2021 ; 26, 6780.

El Ouahdani Khadija, Abdelfattah EM, Laila B, Dalila B. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the treatment of cancers in the city of casablanca (West-Central of Morocco). Trop J Nat Prod Res. 2021 ; 5(6):1044-1054.

El Ouahdani Khadija, Imane Es-safi, Meryem Slighoua, Omkulthom Al kamaly, Anwar M. Alnakhli, Dalila Bousta. *Thymus Algeriensis* and *Artemisia Herba-Alba* Essential Oils: cytotoxicity, antibacterial and antifungal activities and subacute toxicity. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2023; 37(9): 4613–4622

Communications orales et affichées

El Ouahdani Khadija. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the treatment of cancers in the city of casablanca (West-Central of Morocco). Communication affichée. International Colloquium : Valorization of Natural and synthetic Biomolecules in Novel Drug-Vector Nanostructures-Fez-Morocco- 15-16 April 2019

El Ouahdani Khadija, Es-safi Imane, Bousta Dalila. *Thymus Algeriensis* and *Artemisia Herba-Alba* Essential Oils: Cytotoxicity, Antibacterial and Antifungal Activities and Subacute Toxicity. Communication affichée. 8 ème congrès international de Toxicologie « La toxicologie hospitalière au service des patients »- FMPMD-Fez-Maroc-12-15 Octobre 2022

El Ouahdani, Khadija.; Es-safi, I.; Mechchate, H.; Al-zahrani, M.; Qurtam, A.A.; Aleissa, M.; Bari, A.; Bousta, D. *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils: Chemical analysis, antioxidant potential and *in vivo* anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Acute Toxicity. Comùmunication affichée. Second International Symposuim on the «VAMP 22 »- Ecole Normal Supérieure de Tetouan-Tetouan-Maroc-13-15 Mai 2022

El Ouahdani, Khadija.; Es-safi, I.; Mechchate, H.; Al-zahrani, M.; Qurtam, A.A.; Aleissa, M.; Bari, A.; Bousta, D. *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils: Chemical analysis, antioxidant potential and *in vivo* anti-Inflammatory, analgesic Activities, and Acute Toxicity. Comùmunication orale. Second International Symposuim on the «VAMP 22 »- Ecole Normal Supérieure de Tetouan-Tetouan-Maroc-13-15 Mai 2022



DÉDICACES



« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries »
Marcel Proust

A ma chère maman,

Tu m'as donné la vie et l'envie de vivre, les plus précieux de tous les cadeaux.
Sans toi, chère maman, je ne suis qu'un corps sans âme.
Tu es la lanterne qui illumine mon chemin, ma boussole quand je perds le nord.
Ma mère est un puits inépuisable d'amour, un océan de tendresse et un ouragan d'émotions.
Tu incarnes la bonté, le bonheur, la joie à vivre sans arrêter, tu as toujours su donner et donner sans compter.
Dans tes bras j'ai grandi, petit à petit ; et aujourd'hui je ne serais pas là sans toi ma chère maman.
Pour toutes les peines que tu as endurées en m'accompagnant durant mon parcours, je ne peux qu'exprimer ma gratitude absolue.
Ces quelques mots ne sauront te prouver maman combien je t'aime.
Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher papa,

Tu as toujours été mon idole dans la vie. Depuis ma tendre enfance, tu m'as entouré d'attention, orienté dans la vie ; tu m'as chéri et protégé. Tu as cru en moi quand j'ai perdu espoir, tu m'as hissé vers le haut quand j'ai baissé mes bras.
Cher papa, tu es un homme de cœur, je ne suis pas la seule à l'affirmer. Tu as toujours fait preuve d'humilité, d'honnêteté et de bonté. Je t'ai regardé en œuvres, papa, depuis toute petite. J'espère pouvoir t'honorer un jour et faire ta fierté comme tu as fait la mienne. Ce travail est la concrétisation de ton rêve le plus cher et le fruit de tes encouragements. J'aimerai pouvoir te rendre tout l'amour et la dévotion que tu nous as offerts, mais une vie entière ne suffirait aucunement. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères

Je remercie Dieu de votre présence, car elle est source de fierté, de confort, de protection et de bienveillance.

A mes proches Amies

Qui m'ont toujours soutenus et encouragés même dans les périodes les plus difficiles.



REMERCIEMENTS



Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer à Madame la Professeure **BOUSTA Dalila** ma respectueuse gratitude. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité et à la totale confiance qu'il m'a accordée. Sa grande expérience, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en elle une directrice ouverte d'esprit qui m'a guidée dans mon travail tout au long de ces années. Je la remercie de s'être souciée de mon devenir.

J'exprime toute ma gratitude au **Pr.** ***Khanchoufi Abdessalam***, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury malgré tous ses engagements, ainsi que pour ses conseils et ses recommandations constructives.

Je suis très sensible à l'honneur que me font madame la Professeure ***ZAIR Touria***, Monsieur le Professeur ***SOUIRTI Zouhayr*** et Monsieur le professeur ***EL AOUAD Noureddine*** en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Mes plus sincères remerciements se dirigent vers **Dr.** ***BENBACER Laila***, Madame la Professeure ***BARI Amina*** et Monsieur le Professeur **ELBRAHMI Nabil** d'avoir aimablement acceptés d'examiner mon travail de thèse et de faire partie de ce jury.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude au **Dr.** ***BENBACER Laila*** pour l'accueil qui m'a toujours été réservé au laboratoire «Pharmaco-Toxicologie» de l'UBRML/CNESTEN qu'elle dirige. Je la remerciée de m'avoir fait profiter de son expérience et de sa rigueur scientifique.

Je remercie également les membres du laboratoire « Synthèse Organique, Extraction et Valorisation (SOEV) » de la faculté des sciences Ain Chock-Casablanca pour leurs soutiens, leurs gentillesses et leurs amitiés.

Sans oublier de remercier sincérement mes amis ***Meryem SLIGOUA***, ***Omayma CHAHED,*** ***Khadija Zahouri,*** **Fatima-Zohera EL MASSOUDI,** ***Ahmed AZOUGHAR*** **et** ***Abdelfatah El MOUSSAOUI*** pour leur soutien, leur sympathie et leur gentillesse en leur souhaitant bon courage et bonne continuation.

Je tiens aussi à remercier vivement les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant toutes ces années.



ABRÉVIATIONS



Abbréviations	Signification
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
GFs	Growth Factors
PDGF	Platelet-Derived-Growth Factor
TGF_{β}	Transforming Growth Factor $_{\beta}$
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Ras	Rat Sarcoma virus
Bad	Bcl-2-Associated Agonist of Cell Death
Bax	Bcl-2-Associated X protein
Bak	Bcl-2-Agonist or Killer
Bim	Bcl-2-like protein 11
Bid	BH3 Interacting mediator of cell Death
Bcl-2	B-Cell CLL/lymphoma 2
Bcl-XL	B-Cell Lymphoma 2-extra large
Bcl-W	B-Cell Lymphoma W
pb	paire de base
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
bFGF	b Fibroblast Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factor
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
HIF ½	Hypoxia Inductible Factor ½
LH-RH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
MSRE	Modulateurs Sélectifs des Récepteurs d'Œstrogènes
PI3K	Phospho-inositide 3-Kinase
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
AKT	protein kinase B
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MAP kinases	Mitogen Activated Protein kinase
HSP 90	Heat Shock Protein 90
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
RAS	Rat Sarcoma virus
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
MEK1	Map Kinase Kinase 1
MEK2	Map Kinase Kinase 2
C3a	Complement 3a
C5a	Complement 5a
ELAM-1	Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
C2b	Complement 2 b
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AIS	Anti-Inflammatoire Stéroïdien
TXA2	Thromboxane 2
IL-2	Interleukin -2

IL-6	Interleukin-6
TNF-α	Tumor Necrosis Factors- α
IASP	International Association for the Study of Pain
PGHS	Prostaglandine H2 Synthase
COX	Cyclooxygénase
ERO	Espèces Réactives de l'oxygène
NF-KB	Nuclear Factor-kappa B
ICAM 1	Intracellular Adhesion Molecule 1
c-fos	Proto-oncogene C-fos
c-jun	Proto-oncogene C-jun
PEPCK	Phospho Enol-Pyruvate Carboxy-Kinase
LDL	Low-Density Lipoprotein
TrxR	Thiorédoxine Réductase
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
α-Toc$^{\bullet}$	radical Tocophéryle
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de Masse
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
IK	Indice de Kovats
ASAT	Aspartate Amino-Transférase
ALAT	Alanine Amino-Transférase
MCF-7	Metastatic adenocarcinoma Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	M.D Anderson-Metastatic Breast 231
Hep-G2	Liver Human Hepatocellular Carcinoma cell line
ATCC	American type Culture Collection
RPMI	RPMI medium cell culture
SVF	Sérum de Veau Fœtal
PBS	Phosphatase-buffered Saline
WST1	Water-Soluble Tetrazolium salt 1
DPPH	2,2-diphenil-1-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazinyl
BHT	Butylated Hydroxytoluene
FRAP	Ferric Reduced Antioxidant Power
PDA	Potato Dextrose Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
CCl_4	Tétrachlorure de Carbone



LISTE DES FIGURES



figure	Titre
1	Étapes clés de la cancérogénèse
2	Action des drogues anti-hormaux sur le processus de synthèse d'Œstrogène
3	Activation plaquettaire au cours des premières étapes de la phase vasculaire
4	Modifications précoces de l'endothélium vasculaire au cours de la réponse inflammatoire
5	Migration trans-endothéliale des leucocytes
6	AINS et leurs effets indésirables
7	Effets indésirables des glucocorticoïdes
8	Mécanismes périphériques d'apparition de la douleur
9	Niveaux d'antalgiques selon l'OMS
10	Balance d'équilibre entre les systèmes pro-oxydant et antioxydant.
11	Principales enzymes antioxydantes
12	Fiche questionnaire utilisée lors de l'enquête ethnobotanique
13	Échantillon de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut frais et séché utilisé dans l'hydrodistillation
14	Échantillon d'*Artemisia herba-alba* Asso frais et séché utilisé dans d'hydrodistillation
15	Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation
16	Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par tranches d'âge dans la ville de Casablanca
17	Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes par sexe dans la ville de Casablanca
18	Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales selon le niveau d'étude dans la ville de Casablanca
19	Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par habitat dans la ville de Casablanca
20	Classification des familles les plus utilisées
21	Répartition des pourcentages des différentes parties utilisées des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca
22	Répartition des pourcentages des modes de préparation des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca
23	Répartition des pourcentages des voies d'administration des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca
24	Chromatogramme de l'huile essentielle d'*A. herba-alba* par CPG/MS
25	Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. algeriensis* par CPG/MS
26	Variations du poids corporel des rats en fonction du temps, après traitement avec l'huile essentielle de *T.algeriensis*, d'*A.herba-alba* et de leurs mixtures administrées par voie orale.
27	Effet du traitement par la mixture des huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis,* administrée par voie orale à une dose de 150 mg/Kg, sur l'évolution du poids corporel des rats traités par rapport au contrôle négatif.
28	Tissu parenchymateux hépatique des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par la mixture à une dose de 150 mg/Kg/jour (B).
29	Tissu cortical rénal des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par la mixture à une dose de 150 mg/Kg/jour (B).
30	Photographies du foie des rats traités et non traités. (**A**) : Foie des rats du groupe contrôle ; (**B**) : Foie des rats du groupe 2 traités par la mixture ; (**C**) : Foie des rats recevant CCl_4 seul ; (**D**) : Foie des rats recevant CCl_4 et traités par la mixture (groupe

	4).
31	Photomicrographies microscopiques des sections de foie colorées par l'hématosine et éosine. Grossissement : X40 (**A**)
32	Effet anti-inflammatoire des huiles essentielles de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* ainsi que sa mixture administrée par voie orale à la dose de 150 mg/kg et de Diclofénac 1% sur l'œdème induit par la carragénine chez le rat.
33	Disposition d'un lot de quatre rats après test de torsion induite par l'acide acétique
34	Activité analgésique des huiles essentielles *d'A.herba-alba et de T.algeriensis* et de leur mixture comparés à celle du contrôle positif (Sodium salicylate).
35	Activité anti-oxydante du BHT (butylhydroxytoluène), des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture.
36	Pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations
37	Effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse HepG2.
38	Effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231.
39	Effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7.
40	Variations de poids en fonction du temps des rats traités par le thymol, chrysanthenone et de leurs mixtures administrées par voie orale.
41	Effet du traitement par le thymol, chrysanthenone et leur mixture combinée, administrés par voie orale à la dose de 150 mg/Kg, sur l'évolution du poids corporel des rats traités par rapport au contrôle négatif.
42	Tissu parenchymateux hépatique des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par le thymol à la dose de 150 mg/kg/jour (B).
43	Tissu cortical rénal des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par le thymol à une dose de 150 mg/kg/jour (B).
44	Tissu parenchymateux hépatique du groupe des rats traités par la chrysanthenone (A) et ceux traités par la mixture combinée à la dose de 150 mg/kg/jour (B).
45	Tissu cortical rénal des rats traités par la chrysanthenone (C) et ceux traités par la mixture à la dose de 150 mg/kg/jour (D).
46	Photomicrographies microscopiques des sections de foie colorées par l'hématosine et éosine.
47	Activité anti-inflammatoire de Chrysanthenone, Thymol et leur mixture à la dose de 150 mg/kg.
48	Activité analgésique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée en comparaison avec le contrôle positif (Sodium salicylate).
49	Activité anti-oxydante du BHT (butylhydroxytoluène), de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone (ratio 1/1).
50	Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de thymol, chrysanthenone et leur mixture.
51	Effet cytotoxique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7.
52	Effet cytotoxique d thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone vis-à-vis de la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231.
53	Effet cytotoxique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone vis-à-vis de la lignée cellulaire cancéreuse HepG2



LISTE DES TABLEAUX



Tableau	Titre
1	Classification botanique de *T. algeriensis* (L)
2	Classification botanique d'*A.herba-alba* (Asso)
3	Médiateurs inflammatoires amines vaso-actives, ses rôles et ses fonctions
4	Quelques pathologies liées au stress oxydant
5	Classification des familles selon leur nombre d'espèces les plus citées
6	Composition chimique de l'huile essentielle d'*A.herba-alba*
7	Composition chimique de l'huile essentielle de *T.algeriensis*
8	Résultats de l'observation des animaux durant tous les jours pendant 14 jours après administration orale des huiles essentielles de *T.algeriensis*, *A.herba-alba* et leur mixture à la dose de 150mg/kg.
9	Effet des huiles essentielles et de leur mixture, administrées par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 14 jours de traitement.
10	Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 14 jours de l'administration unique des huiles essentielles et de leur mixture à la dose de 150 mg/kg.
11	Effet de la mixture des huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis administrée* par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 28 jours de traitement.
12	Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 28 jours de l'administration de la mixture d'huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis* à la dose de 150 mg/kg/jour.
13	Doses de taux sériques des transaminases (ASAT ; ALAT) des rats témoins, mixture d'huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis*, CCl_4 seul et CCl_4 combiné de 150 mg/Kg de la mixture.
14	Concentration de BHT, d'huiles essentielles de *T.algeriensis*, d'*A.herba-alba* et de leur mixture (1/1) inhibitrice de 50% (IC_{50}) dans le test DPPH.
15	Inhibition de croissance microbienne de l'huile essentielle de *T.algeriensis*
16	Inhibition de croissance microbienne de l'huile essentielle d'*A.herba-alba*
17	Résultats de l'observation des animaux durant tous les jours pendant 14 jours après administration orale de thymol, chrysanthenone et leur mixture à la dose de 150 mg/kg
18	Effet du thymol, chrysanthenone et de leur mixture après administration unique par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 14 jours de traitement
19	Effet du thymol, chrysanthenone et sa combinaison administrés oralement sur les paramètres biochimiques chez les rats après 14 jours de traitement.
20	Effet du thymol, chrysanthenone et de leur mixture administrée par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 28 jours de traitement
21	Effet du thymol, chrysanthenone et sa combinaison administrés oralement sur les paramètres biochimiques chez les rats après 28 jours de traitement.
22	Effet de prétraitement par la mixture thymol/chrysanthenone combinée sur le taux sérique des enzymes hépatiques
23	Concentration du BHT (butylhydroxytoluène), de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée, leur mixture (1/1) inhibitrice de 50% (IC_{50}) dans le test DPPH
24	Inhibition de croissance microbienne du thymol

25	Inhibition de croissance microbienne du chrysanthenone

Résumé

La médecine traditionnelle occupe une place prépondérante dans la vie quotidienne de l'homme depuis longtemps. Au Maroc, le savoir médicinal traditionnel est fréquemment utilisé pour traiter diverses pathologies, y compris le cancer, l'inflammation et la douleur. Ce travail de thèse a pour objectif de donner une base scientifique sur leurs usages empiriques, aussi a porté sur l'évaluation de certaines activités sous-jacentes à l'activité cytotoxique telles que : l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobienne et hépatoprotectrice.

Le choix des deux plantes ; *Artemisia herba-alba (A.h)* et *Thymus algeriensis (T.a)* est fondé essentiellement sur les résultats de notre enquête ethnobotanique menée dans la région de Casablanca-Settat, Maroc. L'analyse phytochimique d'huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* a été réalisée par GC-MS. Le pouvoir antioxydant a été déterminé en utilisant le test FRAP et DPPH. Les huiles essentielles ainsi que leur mixture et leurs composés majoritaires (thymol et chrysanthenone) respectivement ont été évaluées pour leur potentiel cytotoxique vis-à-vis les lignées cellulaires cancéreuses hépatiques et mammaires en utilisant le test WST-1. Puis, nous avons mis l'emphase sur des modèles *in vivo* de l'inflammation, l'analgésie et l'hépatotoxicité des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires (thymol/chrysanthenone) sur des souris Swiss albinos et des rats Wistar. Ensuite, la toxicité aiguë et subaiguë des huiles essentielles, leur mixture et de leurs composés majoritaires à la dose de 150 mg/kg ont été étudiées. L'analyse chimique des deux huiles essentielles a révélé la présence du thymol et du chrysanthenone comme composés majoritaire de *T.a* et d'*A.h* respectivement. L'activité antioxydante la plus importante a été observée pour la mixture thymol/chrysanthenone combinée (IC_{50}=3,07 µg/ml). Quant aux lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231, MCF-7 et HepG2, la mixture thymol/chrysanthenone a montré une activité antiproliférative significative, avec des valeurs IC_{50} de 1,525 µg/ml, 0,323 µg/ml et 0,719 µg/ml respectivement. A la lumière des résultats du test de la toxicité aiguë et subaiguë, la DL_{50} de la mixture des huiles essentielles a été supérieure à 150 mg/kg et l'administration orale de la mixture thymol/chrysanthenone à la dose de 150 mg/kg ne montre aucun signe de toxicité. La mixture thymol/chrysanthenone combinée a montré un potentiel anti-inflammatoire significatif à la 6 ^{ème} heure de 96,99 %. Les deux mixtures des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires, ont présenté un pouvoir antinociceptif remarquable au niveau périphérique. Les deux mixtures semblent clairement avoir un effet hépatoprotecteur.

Les huiles essentielles ainsi que leurs composés majoritaires ont montré une activité cytotoxique très intéressante sur le cancer hépatique et mammaire, ainsi que sur plusieurs pathologies qui sont en relation directe ou indirecte avec le développement du cancer. En perceptives, il serait intéressant d'évaluer l'effet de notre mixture et leurs molécules majoritaires sur des modèles *in vivo* de cancer du foie et du sein.

Mots clés : *Thymus algeriensis* (Boiss) ; *Artemisia herba-alba* (Asso) ; Thymol, Chrysanthenone ; Cancer ; Cytotoxicité ; Hépatoprotection ; Inflammation ; Douleur ; Stress oxydant ; Toxicité

Abstract

Traditional medicine has long played an important role in people's daily lives. In Morocco, traditional medicinal knowledge is frequently used to treat various pathologies, including cancer, inflammation and pain. The aim of this thesis work is to provide a scientific basis for their empirical uses, and has also focused on assessing certain activities underlying cytotoxic activity, such as antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and hepatoprotective activity.

The choice of the two plants, *Artemisia herba-alba (A.h)* and *Thymus algeriensis (T.a)*, was based essentially on the results of our ethnobotanical survey conducted in the Casablanca-Settat region of Morocco. Phytochemical analysis of *A.h* and *T.a* essential oils was carried out using GC-MS. Antioxidant power was determined using the FRAP and DPPH tests. The essential oils of *T.a* and *A.h* as well as their mixture and their major compounds (thymol and chrysanthenone) respectively were evaluated for their cytotoxic potential against liver and breast cancer cell lines using the WST-1 test. We then focused on in vivo models of inflammation, analgesia and hepatotoxicity of essential oils and their major compounds (thymol/chrysanthenone) in Swiss albino mice and Wistar rats. The acute and sub-acute toxicity of the essential oils, their mixture and their majority compounds at a dose of 150 mg/kg were then studied. Chemical analysis of the two essential oils revealed the presence of thymol and chrysanthenone as the majority compounds in *T.a* and *A.h* respectively. The highest antioxidant activity was observed for the combined thymol/chrysanthenone mixture (IC_{50}=3.07 µg/ml). In the MDA-MB-231, MCF-7 and HepG2 cancer cell lines, the thymol/chrysanthenone mixture showed significant antiproliferative activity, with IC_{50} values of 1.525 µg/ml, 0.323 µg/ml and 0.719 µg/ml respectively. In the light of the results of the acute and sub-acute toxicity test, the LD_{50} of the mixture of essential oils was greater than 150 mg/kg and oral administration of the thymol/chrysanthenone mixture at a dose of 150 mg/kg showed no signs of toxicity. The combined thymol/chrysanthenone mixture showed a significant anti-inflammatory potential at 6 hours of 96.99%. The two mixtures of essential oils and their majority compounds showed remarkable antinociceptive power at the peripheral level. Both mixtures clearly appear to have a hepatoprotective effect. The essential oils and their majority compounds showed very interesting cytotoxic activity on liver and breast cancer, as well as on several pathologies that are directly or indirectly related to the development of cancer. In perceptive terms, it would be interesting to evaluate the effect of our mixture and their majority molecules on in vivo models of liver and breast cancer.

Key words : *Thymus algeriensis* (Boiss) ; *Artemisia herba-alba* (Asso) ; Thymol, Chrysanthenone ; Cancer ; Cytotoxicity ; Hepatoprotection ; Inflammation ; Pain ; Oxidative Stress ; Toxicity



INTRODUCTION GENERALE



« Qu'il soit lent ou rapide celui qui cherche trouvera.
Tout ce que tu possèdes en fait de richesses et talents,
n'était-ce pas d'abord une recherche et une pensée ?
Si ceux qui ont soif cherchent de l'eau dans le monde,
L'eau aussi cherche dans le monde ceux qui sont assoiffés »
Jalâl al-Dîn Rûmî

À travers le monde, la recherche des nouvelles molécules à visée thérapeutique demeure une des préoccupations des acteurs de la recherche scientifique actuelle. Par ailleurs, de nombreux médicaments sont issus du milieu naturel, les plantes, les micro-organismes et les organismes marins. Ainsi, les plantes aromatiques et médicinales depuis l'antiquité ont constitué une source substantielle des médicaments par suite de sa richesse en métabolites secondaires. Ces derniers ont été utilisés par l'Homme, et lui permettait de se protège contre l'agressivité d'autres êtres vivants pathogènes (bactéries, virus, champignons...) (Romain *et al*.,2018).

Ces molécules bioactives d'origine végétale joue un rôle fondamental dans la découverte et l'enrichissement de l'arsenal thérapeutique vis-à-vis de plusieurs pathologies humaines (Newman *et al*., 2004). Eu égard à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), auprès de 90 espèces de plantes médicinales sont à l'origine de 119 composés bioactifs qui sont considérés comme des médicaments importants (Avinash Kumar & Nandan.,2022).

L'exploitation des pharmacopées traditionnelles, particulièrement l'usage des plantes médicinales réputées actives et connues à compter des siècles pour leur effet thérapeutique ; a permis la découverte de plusieurs médicaments contre plusieurs maladies, qui restent encore sans traitement efficace jusqu'au nos jours, y inclue les différents types de cancers, les maladies cardiovasculaires, les inflammations et les infections bactériennes et fongiques (Ginwala *et al*.,2019). En supplément de la résistance bactérienne aux antibiotiques ainsi que celle des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux classiques (chimiothérapie classique, radiothérapie, hormonothérapie) et les effets secondaires très agressifs de ces derniers incitent les chercheurs et les industries pharmaceutiques à se tourner vers les plantes médicinales comme une source inépuisable de nouvelles molécules à visée thérapeutique (Cámara-Leret & Bascompte.,2021).

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique représentent les aspects de l'avenir des plantes médicinales. S'intéressent à recenser les plantes et les substances naturelles revendiquées dans les pharmacopées traditionnelles. Pour ce faire, elles ont pour but d'étudier leurs propriétés et valider leurs usages, en utilisant les techniques pharmacologiques du laboratoire plus ciblées en s'orientent vers l'étude des fractions et la purification des nouvelles molécules pharmacologiques actives (El Alami & Chait.,2017).

La médecine populaire marocaine constituée une source inépuisable et un atout important dans la recherche et l'investigation des nouvelles molécules bioactives ayant un effet thérapeutique. Par sa situation géographique au Nord-Ouest de l'Afrique ainsi son bioclimat

méditerranéen très diversifie, le Maroc offre une très grande disparité floristique et écologique avec un endémisme très accentué de plusieurs espèces botaniques. En effet, sur les 7000 espèces, sous-espèces et variétés existante au Maroc, 537 sont endémiques du pays et 1625 sont rares ou menacées (El Hachlafi *et al*.,2022). En plus de ce contexte géographique promoteur, ce pays dispose un trésor traditionnel assez profond et un savoir-faire phytothérapique et médicinal traditionnel qui a été conservé durant des siècles.

Le travail présenté dans cette thèse visant d'apporter une contribution à la valorisation des plantes médicinales et donner une base scientifique sur leurs usages empiriques. Aussi, notre étude a porté sur l'évaluation de certaines activités pharmacologiques, anti-oxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobienne et antiproliférative, des huiles essentielles provenant de plantes médicinales marocaines ainsi que ses molécules bioactives majoritaires et l'étude de leurs toxicités aigue, subaiguë et hépatotoxicité.

Les plantes étudiées dans ces travaux de thèse ont été choisis à partir de l'enquête ethnopharmacologique réalisée. Parmi les familles les plus citées révélées par les résultats de l'enquête, nous avons sélectionné *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba* pour mener les travaux expérimentaux. *T.algeriensis* étant la plante la plus mentionnée de la famille des Lamiacée et *A.herba-alba* la plus mentionnée de la famille des Astéracée.

Notre étude s'articulera autour de trois parties : la première axée dans un premier temps sur des généralités exhaustives sur les plantes choisies dans notre travail. La seconde partie illustre les matériels et méthodes utilisés dans les distinctes expérimentations: l'étude ethnobotanique et monographique des plantes étudiées, l'extraction et l'analyse phytochimique, les activités, *in vitro,* antioxydante, antimicrobienne et antiproliférative de ces huiles essentielles, l'étude *in vivo* des activités anti-inflammatoire, analgésique et l'étude de la toxicité aiguë, subaiguë et hépatotoxicité des huiles essentielles ainsi que leurs molécules bioactives majoritaires. La troisième partie est consacrée à l'analyse et l'interprétation des résultats acquiert. Enfin, notre manuscrit de thèse est accentué d'une conclusion générale et des perspectives.



PARTIE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



"La vérité est un miroir tombé de la main de Dieu et qui s'est brisé.
Chacun en ramasse un fragment et dit que toute la vérité s'y trouve"
Jalâl al-Dîn Rûmî.

Chapitre I. Aperçu sur les plantes aromatiques et médicinales au Maroc

1 Introduction

L'utilisation des plantes médicinales est associée à l'évolution de la civilisation humaine. Elles constituent un groupe vaste des plantes qu'ont été pendant longtemps le seul recours traditionnel, qui peut exploitée efficacement pour combattre diverses pathologies ou encore satisfaire les besoins en soins de santé primaires. Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une de ses parties dispose des attributs thérapeutiques et médicamenteuses dues à la présence d'un ou plusieurs principes actifs (Schauenberg & Paris.,2006).

Comme tous les végétaux les plantes médicinales font parties de notre quotidien, on les utilise en médecine, en cosmétique et en parfumerie pour l'aromatisation culinaire.

2 Richesse végétale du Maroc

Par sa situation géographique au bord Nord-Ouest de l'Afrique ainsi son bioclimat méditerranéen très diversifie, le Maroc offre une énorme diversité floristique et écologique avec un endémisme très marqué de plusieurs espèces botaniques. En effet, sur les 7000 espèces, sous-espèces et variétés vivent dans les terrains marocains, 537 sont endémiques du pays, 1625 sont menacées ou rares (El Alami & Chait.,2017) et 1500 espèces introduites (Hmamouchi., 2001). Cette richesse en plantes médicinales et aromatiques lui permet de le classer parmi les pays méditerranéens qu'ont un trésor traditionnel assez profond et un savoir-faire phytothérapique et médicinal traditionnel intéressant (Chaachouay *et al*., 2019).

3 Place des plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Au Maroc, les plantes aromatiques et médicinales (PAMs) occupent un emplacement très important dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est considérablement employée dans différents problèmes de santé. Les remèdes utilisant les PAMs sont considérés comme : moins chères, sans effets indésirables et ont tendance à être plus employés dans les maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les rhumatismes, l'hypertension artérielle, les cancers, etc. Sur le plan économique les PAMs représentent un marché de 64 milliards de dollars par an (Maqsood *et al*., 2020), brassés par des unités industrielles utilisant plus de 35.000 plantes dont le cumin, le poivre, la noix de muscade, le girofle, la cannelle, le fenugrec… font l'objet d'un regain bénéfice.

Aujourd'hui, le domaine des plantes médicinales et aromatiques ne cesse d'augmenter au Maroc, il concerne diffères marchés dont ; l'aromathérapie, l'agroalimentaire, la parachimie, la cosmétique, la pharmacie, l'agrochimie et la parfumerie. Cette augmentation est due

essentiellement au nombre important des consommateurs, à la diversité des domaines d'application et à l'accroissement accru de la demande mondiale. Le développement de ce secteur a exigé la mise en œuvre d'un plan de développement du domaine des plantes médicinales et aromatiques (Ismaili *et al*.,2021) qui passe par la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, développement du savoir-faire millénaire et une meilleure connaissance phytochimique de ces dernières, de ses extraits brutes ainsi que ses huiles essentielles.

4 Huiles essentielles

Les huiles essentielles (parfois essences végétales) constituent un mélange complexe à forte valeur ajoutée qui peuvent être exploité dans différents secteurs industriels : agroalimentaire, aromathérapie ou pharmacie. Ce sont des molécules huileuses, volatiles et odoriférantes issues de plantes aromatiques obtenues par entrainement à la vapeur, hydrodistillation ou l'expression à froid (Guerriaud.,2018). Leur valeur ajoutée est due essentiellement à leurs larges spectres d'action biologique (Amarti *et al*.,2011). En effet, les huiles essentielles ont fait objet de plusieurs études validant ses effets biologiques divers ; antifongique (Ramsey *et al*.,2019), antibactérien (Hechachna *et al*.,2023), diurétique (Elyemni *et al*.,2019), expectorante (Cao *et al*.,2017), antispasmodique (Uritu *et al*.,2018), anti-inflammatoire, anti nociceptique **(**Kurowska *et al*., 2023) et antioxydant (Nieto *et al*.,2018).

5 Phytothérapie

La phytothérapie, existe depuis la préhistoire (du grec «Phyton», plantes et «Therapein», soigner) est l'art de soigner par les plantes médicinales qui permet de traiter à la fois les causes et les symptômes des pathologies moins lourdes ou encore prévenir leur apparition (Porras *et al*.,2021). Sur le plan phytochimique et pharmacologique les PAMs s'avèrent d'une grande richesse. Eu égard à l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80% de la population mondiale recours vers les soins traditionnels à base des plantes, ainsi la majeure partie de ces soins consiste à utiliser les plantes entières, des extraits des racines, des feuilles, de l'écorce ou ses constituants actifs (Ouedraogo *et al*.,2021).

5.1 Avantages

La phytothérapie à son principe n'est pas opposée à la médecine récente, privilège l'utilisation des remèdes à base des plantes entières fraîches ou sèches plutôt que ses extraits aqueux, alcoolique ou encore ses fractions.

La plante entière se forme de plusieurs molécules dont une seule est spécifiquement active et les autres interviennent soit pour faciliter ses mécanismes d'absorption, la rendre plus active (synergie) ou limite son agressivité et donc réduire sa toxicité c'est pourquoi la phytothérapie est considérée comme une médecine douce (Vanopdenbosch.,2013).

Aujourd'hui, la phytothérapie revient au premier choix face à la diminution de l'efficacité des antibiotiques et des antiviraux qui dues au problème de résistance des bactéries et des virus aux ces derniers respectivement. Aussi, les PAMs sont en mesure de traiter des maladies simples telles que le rhume, toux ou l'asthme ou d'en remédier de plus importantes telles que la migraine, la malaria, la tuberculose ou les ulcères.

5.2 Inconvénients

À côté de tous ses avantages la phytothérapie a des inconvénients multiples. Toutefois, les produits de phytothérapie et les plantes médicinales contiennent de nombreux principes actifs qui les rendent, dans son état normal d'utilisation, susceptibles d'être un sujet d'une intoxication ou d'avoir des effets secondaires dues à l'existence de nombreuses interactions, l'effet thérapeutique des PAMs se fait sentir plus lentement à cause de la faible concentration du produit actif utiliser, en raison de l'utilisation de la plante entière (Lehmann & Pabst,2016) ainsi que son innocuité qui n'est pas systématique d'où le développement aujourd'hui de la phytorésistance (Gauthier.,2022).

I. Ethnopharmacologie

L'ethnopharmacologie est une discipline qu'a pour objectif l'étude des médecines traditionnelles et des remèdes (ensemble des matières d'origine végétal, animal ou minéral) constituants les pharmacopées traditionnelles. L'ethnopharmacologie met en relation la culture vernaculaire, les savoirs et les pratiques ancestrales et les connaissances scientifiques actuelles (Foutse.,2017), schématiquement l'étude éthnopharmacologique se déroule en trois temps : un travail de terrain destiné à recenser les savoirs thérapeutiques ancestrales, un travail en laboratoire visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des remèdes traditionnels et finalement le développement de médicaments traditionnels préparés on se basant sur les remèdes traditionnelles prédites. En effet, toutes ces étapes ont apporté à l'humanité plus que 60% des médicaments (Geck *et al*.,2020).

II. Toxicité par les plantes aromatiques et médicinales

La consommation des PAMs peut entraîner des intoxications ou des effets toxiques qui peuvent être liées à plusieurs facteurs ; surdosage, contamination par des substances non végétales, photosensibilisation, contamination par des pesticides, réactions allergiques et les

interactions pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques. Cependant, les plantes médicinales à thuyone, comme *Salvia officinalis* L de la famille des Lamiaceae (Li *et al*.,2022) et *Ginkgo biloba* L de la famille des Ginkgoaceae (Botineau.,2014), une cétone monoterpénique à forte dose susceptible de provoquer des convulsions, diarrhée, nausées, vomissements, agitation et faiblesse musculaire. Ainsi certaines plantes médicinales des familles des Apiaceeae, Asteraceae, Aristolochiaceae, Amaranthaceae et Lauraceae. contiennent des substances allergogènes de types lactones sesquiterpéniques (la cnicine, la cynaropicrine, l'hélénaline et l'herniarine, …) peuvent induisent à des réactions allergiques (Koziol.,2018).

III. Monographies des espèces cibles

En vertu des résultats d'une enquête éthnopharmacologique aux alentours de la population de Casablanca et d'une recherche bibliographique effectuée, la plus exhaustive possible, sur les articles publiés dans les dix ultimes années ainsi sur les brevets enregistrés sur les plantes médicinales les plus usées en médecine traditionnelle, nous avons sélectionné deux plantes médicinales utilisées dans la médecine populaire : *Thymus algeriensis*, *Artemisia herba-alba*.

1. Description de *Thymus* L. (Thym)

Thymus (L) est un nom latin vient du grec thyo qui signifier parfum ou thymos qui signifier (force ou courage). D'écrit un groupe des plantes aromatiques ayant des aspects similaires, largement répandues dans le bassin méditerranéen (Hazzit *et al*.,2009). Elles appartiennent à la famille des Lamiaceae, qu'est l'une des plus riches familles en plantes médicinales avec presque 200 genres 4000 espèces dans le monde (Messaoudi et al.,2019) parmi lesquelles *T. ciliatus, T. capitatus* et *T. algeriensis*.

1.1 Taxonomie

La classification botanique de l'espèce *Thymus algeriensis* est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Classification botanique de *T.algeriensis* (L) (Touhami.,2017)

Règne	Plantea (végétal)
Sous Règne	Tracheobionta
Nom scientifique	*Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.
Nom vernaculaire marocain	Zaaitra/Azoukeni/Tazerkahha
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Sous classe	Métachlamydées (gamopétales)

Ordre	Tubiflorales (Lamiales)
Famille	Lamiacées
Genre	Thymus
Espèce	*Thymus algeriensis*
Nom commun	Thym
Nom anglais	Moroccan wild thyme

1.2 Description botanique

T.algeriensis est connu sous le nom de «Zaaitra» au Maroc et au pays du nord d'Afrique **(**Khadraoui *et al.*,2016). Cette plante est un sous-arbrisseau parfumé, avec une odeur fortement aromatisant, a tiges ligneuses rampantes de couleur blanchâtre pouvant atteindre de 15 à 30 cm de long. Ses feuilles florales persistantes différentes des feuilles caulinaires de 4 à 10 mm de long. Ses fleurs de 5 à 6 mm de couleur violacée à pale avec quatre étamines didynames, appartenant à la famille des lamiaceae. Sa période de floraison dure d'Avril à Juin (Zouari *et al*.,2011).

1.3 Distribution géographique

T.algeriensis est l'une des espèces les plus fréquentes dans la région nord-africaine (Houmani *et al*.,2012), pousse dans les régions montagneuses et s'adapte bien aux conditions climatiques sévères (Lahlou *et al*.,2022). Il est endémique du Maroc, Algérie Tunisie et la Libye. Au Maroc, cette espèce est largement retrouvée dans le Rif, l'oriental (précisément la forêt de Béni Snassen), l'Anti, le Moyen et le Haut Atlas (Zayyad *et al*.,2014).

1.4 Utilisation au Maroc

Au Maroc *T.algeriensis* est très usé en pharmacopée traditionnelle. Divers usages sont connus depuis l'antiquité. Cette plante odorante était souvent utilisée dans la cuisine marocaine comme herbe épicée fraîche ou sèche pour assaisonner les aliments **(**Palmieri *et al*.,2020). Traditionnellement, les feuilles sont utilisées en cataplasme pour la cicatrisation des lésions cutanées. La partie aérienne de cette plante en décoction est contribuée dans l'expulsion des gaz intestinaux (Chouach.,2023). D'après Giweli *et al*.,(2013) la partie souterraine crue et écrasée est utilisée pour le traitement des pathologies de l'appareil digestif et des voies respiratoires supérieures (Maamar Sameut *et al*.,2020). La partie aérienne séchée est ingérée pour prévenir l'avortement (anti-avortement) et même contre certains types de cancers (Giweli *et al*., 2013).

1.5 Composition chimique

À notre connaissance, *T.algeriensis (T.a)* a fait l'objet de très peu de prospections phytochimiques. Elles ont d'identifier très peu de molécules bioactives (métabolites secondaires) validées par des techniques analytiques chimiques.

L'étude chimique effectuée par Maamar Sameut *et al*.,(2020) sur l'huile essentielle de *T.a* de l'Algérie a montré que le thymol et le carvacrol constituent les deux principaux constituants phénoliques de *T.a*. En outre une autre étude d'El Ouahdani *et al*.,(2021) a révélé que la composition chimique de l'huile essentielle de *T.a* du Maroc est caractérisée par la présence de 21 composés qui représentent (90.61%) avec la dominance de thymol, bornéol et de carvacrol tandis que le Verbenone et ρ cymène sont minoritaires. Cependant, Miloš Nikolić *et al*.,(2010) a montrer que l'huile essentielle de *T.a* de la Libye (Zentan) se caractérise par la présence de linalol (47,3 %), le thymol (29,2 %), le ρ cymène (6,8 %) et carvacrol (1,7%) comme composés majoritaires.

1.6 Propriétés pharmacologique

En thérapeutique, *T.algeriensis* est connue pour ses propriétés pharmacologiques, parmi lesquelles, la propriété antispasmodique, expectorante, vermicide, allopathique et antiseptique bronchique (Chouach *et al*.,2023) ont trouvé aussi qu'il possède des propriétés antioxydante, analgésique et anti-inflammatoire (El Ouahdani *et al*.,2021) et insecticide (Ben El Hadj *et al*.,2015).

2. Description d'*Artemisia.* L (Armoire)

Connue depuis des millénaires, *Artemisia* (L), soit du nom grec "Artemis" de la muse grecque de l'accouchement, de la chasse et de la nature sauvage, il fait référence aussi du nom de la femme du roi de Caire Mausole (Madjida.,2022). D'écrit un groupe des plantes médicinales qui se singularisent avec des signes de spécificités fortement accusés. Elles appartiennent à la famille des Asteraceae qu'est une famille polymorphe comportant 1600 genres regroupent près de 23500 espèces (Dib & El Alaoui-Faris .,2019) parmi lesquelles *A. verlotorum, A. Scoparia, A. atlantica* et *A. herba-alba*.

2.1 Taxonomie

D'après Messai et *al*.,(2011) *A.herba-alba* Asso a été inventoriée par le botaniste espagnol Ignacio Jordán Claudio de Assoy del Rio en 1779 comme suit :

Tableau 2 : Classification botanique d'*A.herba-alba* (Asso) (Messai *et al*.,2011)

Règne	Plantea (végétal)
Sous règne	Viridaeplantae
Nom vernaculaire marocain	Shih/ shih khorasani/ kaysoum/ izerg/ ifsi
Embranchement	Plantae
Sous embranchement	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	*Artemisia*
Espèce	*Artemisia herba-alba*
Nom commun	Armoise blanche
Nom anglais	Desert wormwood

2.2 Description botanique

A.herba-alba Asso est connue sous le nom de (Chih) au Maroc, en Afrique du nord et au Moyen Orient (Mohamed *et al*.,2010). C'est une plante herbacée, vivace, ligneuse et basse avec un goût amer et une odeur caractéristique de l'huile de thymol (Eloukili., 2013). A tige rigide, ramifiée dressée et très feuillées pouvant atteindre de 30-50 cm de hauteur. Ses feuilles sont courtes, laineuses sessiles, petites et pubescentes, divisées en languettes fines **(**Lamari., 2018). Ses fleurs de couleur jaune à rougeâtre sont groupées en grappe à capitules ovoïdes de 1,5 à 3 mm de diamètre (Bezza *et al*.,2010). Sa période de floraison dure du Juin et se développe à la fin de l'été (Chassagne *et al*.,2021).

2.3 Distribution géographique

A.herba-alba, il s'agit de l'espèce la plus fréquente dans les régions bioclimatiques arides et semi-arides, depuis les îles Canaries jusqu'au Proche Orient (Palestine, désert du Sinaï et l'Egypte), passant par le Sud-Est de l'Espagne, déserts d'Asie centrale, les déserts du Moyen Orient et arrivant jusqu'au l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) où il couvre d'immenses territoires qui s'étale à environ 10 millions d'hectares (Younsi *et al*.,2017).

Au Maroc, *A.herba-alba* Asso est rencontrée dans le Rif Oriental, l'Anti-Atlas saharien, du Moyen Atlas et du Haut Atlas (Eddouks *et al*.,2017).

2.4 Utilisation au Maroc

Au Maroc, *A. herba-alba* Asso semble d'un grand intérêt thérapeutique. Il est parfaitement connu dans la médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques vis-à-vis plusieurs pathologies. La partie aérienne est utilisée contre la diarrhée, les névralgies (Zrira,2017)**,** le diabète (Hamza *et al*.,2019), l'hypertension artérielle (Pan *et al*.,2014), les bronchites (Tahraoui *et al*.,2007) et la constipation (Hani *et al*.,2023). Cette plante odorante est utilisée en infusion pour réparer les désordres intestinaux, les désordres gastriques (Hussain *et al*.,2017) ainsi que la réparation des blessures (Fakchich & Elachouri.,2021) et les rhumes (Abu Darwish *et al*.,2015). Pour son odeur, les fleurs d'*A. herba-alba* sont utilisées pour aromatiser du thé et du café et même contre certains types d'empoisonnement (Nigam *et al*.,2019).

2.5 Composition chimique

Les plantes du genre Artemisia, auquel appartient *A. herba-alba* ont fait l'objet de multiples études phytochimiques pour son intérêt thérapeutique et économique. Généralement, ces études ont révélé l'abondance des monoterpénoïdes oxygéné, telle que le chrysanthenone, camphre, αβ-thujones, 1,8-cinéole et le chrysanthenol dans les huiles essentielles de cette espèce (Bellili *et al*.,2016). Toutefois, les coumarines, les lactones et les hydrocarbures acétyléniques représentent les molécules les plus identifiables dans ses extraits (Dheeraj *et al*., 2021).

L'étude phytochimique de Ghanmi *et al.,* (2010) sur l'huile essentielle d'*A.herba-alba* de la région orientale du Maroc (Guerçif) a montré l'existence de chrysanthenone (47,71%), camphre (21,59%) comme composés majoritaires. En outre, l'huile essentielle de la partie aérienne d'*A.herba-alba* de la Tunisie a indiqué la présence de β-thujone (58%), Cis-chrysantenyl acétate (10,6%), sabinyl acétate (9,13%) et α-thujone (8,73%) majoritairement (Sami Zouari *et al*., 2010), restant en Tunisie, Mighri *et al*., (2010) ont permis d'identifier le 1,8 cinéole (18,4%), le camphre (14,1%), l'α thujone (10,7%) et le β-thujone (10,8%). Au Maroc, l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* est caractérisée par la présence de chrysanthenone (47.71%) et le camphor (21.45%) et l'absence de caryophyllene (El Ouahdani *et al*.,2021). Passant à l'Espagne dont l'huile essentielle est principalement formée de camphor (15,0%), 1,8-cineole (13,3%), α-terpineol (6,3%), α-guaiene et β-cubebene (6,0%) (Muthannaet *al.*,2021).

Cette variabilité intra-spécifique au sein de l'espèce *A. herba-alba* peut être due à plusieurs facteurs ; génétique (Kharbach *et al.*,2020), géographique (Bouyahya et *al.*,2020), écologique ou même saisonnière (Ghanmi et *al.*,2010).

2.6 Propriétés pharmacologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles plusieurs extraits et huiles essentielles d'*A.herba-alba* ont montré de nombreuses activités biologiques, telles que l'activité analgésique, anti-inflammatoire, antioxydante (El Ouahdani *et al*.,2021), antimicrobienne (Eda-da *et al.*,2021), insecticide (Negahban *et al.*,2007) et antispasmodique (Meddour *et al*.,2023). Les huiles essentielles et les extraits de cette plante possèdent des propriétés anti-venin (Attia *et al*.,2019), antihelmintique, anti leishmaniose (Veerakumari.,2015) et cytoprotectrice (Hrytsyk*et al*.,2019).

Chapitre II. Etude toxicologique

1. Introduction

Les études toxicologiques concernent des domaines très divers. En effet, les animaux, les végétaux, les produits industriels en passant par les médicaments et bien d'autres. Toute substance destinée à être mise sur le marché que ce soit un produit chimique ou un médicament doit subir des tests de toxicité pour bien évaluer sa nuisibilité.

2. Définition de la toxicité

La toxicité est la capacité inhérente d'une substance chimique qui, après pénétration dans l'organisme ou au contact, à provoquer un effet nuisible résultant d'un dysfonctionnement moléculaire, cellulaire ou organique (physiologique) (Bensakhria.,2018).

3. Types de toxicité

Cliniquement on distingue trois formes de toxicité selon la fréquence d'exposition à la substance toxique : la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë (à courte terme ou subchronique) et la toxicité chronique (à long terme) (Bensakhria.,2018).

3.1 Toxicité aigüe selon les guidelines de l'OCDE "N° 423"

La toxicité aiguë est une étude qualitative et quantitative des effets néfastes (morphologique, physiologique, biochimique) qui se manifestent après l'exposition à une dose unique d'un xénobiotique, ne dépassant pas 24 heures, administrée habituellement aux rongeurs durant une période d'au moins 14 jours. Elle permet d'identifier la létalité potentielle du xénobiotique au moyen de la détermination de la DL_{50} par plusieurs types d'études : études expérimentales *in vivo* (on utilisant habituellement les rongeurs comme des modèles de laboratoire), études *in vitro* sur des cultures cellulaires ou tissulaires, études par modélisation moléculaire (structure/activité biologique) et études épidémiologiques sur des groupes d'individus (Reddeman *et al*.,2019).

3.2 Toxicité subaiguë selon les guidelines de l'OCDE "N° 407"

Après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité d'un xénobiotique à partir d'essais de toxicité aiguë. La présente forme de toxicité vise à identifier les effets toxiques sur un large spectre de cibles de toxicité et de déterminer le système ou l'organe sur lequel le xénobiotique agit préférentiellement on administrant des doses inférieures à celles utilisées dans les essais de la toxicité aiguë (Bensakhria.,2018)..

La toxicité subaiguë correspond donc à l'étude des effets toxiques d'un xénobiotique après exposition répétée durant une période n'excédant pas 90 jours. Cette étude nous a permettre de fournir de l'information sur les effets biochimiques, hématologiques, histopathologiques et cliniques du xénobiotique testé (Tume *et al*.,2019).

3.3 Toxicité chronique selon les guidelines de l'OCDE "N° 453"

Bien que très utile, les essais de la toxicité subaiguë ne nous permettent pas de dépister les conséquences de l'exposition à long terme à un xénobiotique. Habituellement on recourt vers la toxicité chronique pour étudier les effets de contact au xénobiotique durant une période prolongée.

La toxicité chronique est l'étude de l'exposition répétée à un xénobiotique pendant une période prolongé et à faible dose à pour but de fixer ou déterminer les valeurs limites d'exposition ou les doses seuil (OCDE.,2018).

4. Voies d'administration

L'intensité des effets nocifs d'un xénobiotique, de même que l'organe cible de la toxicité, varié selon la voie par laquelle est administré. Plusieurs voies d'administration du xénobiotique sont envisageables : orale, parentérale, percutanée, vaginale, rectale, pulmonaire…

4.1 Voie orale

La voie orale, buccal ou per ose est la principale voie d'administration qui consiste à avaler le xénobiotique par la cavité buccale. Cette voie d'administration peut donner lieu à ce que l'on appelle le phénomène du "premier passage hépatique" qui induit des modifications du xénobiotique (biotransformation). Par cette voie d'administration le xénobiotique peut entrainer des effets nuisibles tels que l'irritation de la muqueuse digestive, nausées et vomissements ainsi que l'interférence avec certains aliments, boissons et l'alcool qui peut conduit à des intoxications (OCDE.,2018).

4.2 Voie intrapéritonéale

L'administration par voie intrapéritonéale (IP) consiste en administration du xénobiotique par injection directe dans la poitrine soit avec une aiguille ou une seringue. Cette voie IP permet à une résorption très rapide du xénobiotique qui passe obligatoirement par le foie avant d'atteindre la circulation sanguine ce qui peut diminue sa biodisponibilité et limités ainsi ses effets toxiques s'ils existent (OCDE.,2018). .

Cette voie d'administration est classiquement utilisée dans les expérimentations en toxicologie et en pharmacologie pour la détermination des tissus et des organes cibles des xénobiotiques.

5. Tissus cibles de toxicité

Un tissu cible est un tissu sur lequel se manifeste les effets toxiques après exposition à un xénobiotique donnée et qui ne les exercent pas de la même intensité sur tous les tissus/organes. L'interaction entre un xénobiotique et un tissu ou un organe en particulier dépend de l'affinité ainsi que la sensibilité plus grande de ces derniers à ce xénobiotique.

Le foie et les riens assurent une grande fonction dans le métabolisme, l'élimination des xénobiotiques et la protection de l'intégrité tissulaire de ses effets toxiques diffèrent. Ses fonctions essentielles de détoxification en font pourtant des cibles privilégiées pour des xénobiotiques (Tume *et al*.,2019).

5.1 Hépatotoxicité

L'hépatotoxicité fait référence à la capacité d'un xénobiotique à endommager le foie, Cela peut-être causé par l'exposition à des médicaments, des produits chimiques, naturels ou des agents nocifs qui perturbent les fonctionnements hépatiques induisant ainsi à une hépatotoxicité intrinsèque ou idiosyncratique (Andrade *et al.*,2019). Ces lésions hépatiques sont accompagnées de signes cliniques et histopathologiques non spécifiques (nausées, vomissement, malaise, douleurs abdominales…) ainsi que les résultats anormaux des tests biochimiques hépatiques et de biopsie du foie (Si-Tayeb *et al*.,2010).

5.2 Néphrotoxicité

La néphrotoxicité est définie comme la propriété d'un xénobiotique d'entrainer un dysfonctionnement des reins. Ces dysfonctionnement peut se manifestent par une insuffisance rénale aiguë ou chronique, une hypertension artérielle, une protéinurie et une diminution de la clairance de la créatinine (Ruel *et al*.,2014).

Chapitre III. Cancer

1. Introduction

À travers le monde, le cancer constitue un enjeu lourd et une préoccupation majeure de santé publique dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement (Andrade *et al*.,2021). Mis à part les progrès dans les thérapies conventionnelles anticancéreux (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, hormonothérapie…) le pronostic de l'ensemble des cancers n'a pas très évolué en 30 ans (Zhao *et al*.,2021) causant ainsi 10 millions des décès en 2020 (WHO.,2020).

2. Définition

Le cancer, ce terme générique englobe une large famille de pathologies liées à la prolifération et à la division incontrôlée de cellules de l'organisme devenue anormales (Andrade *et al*.,2021). Les cellules néoplasiques malignes ont en plus, la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants (Hanahan.,2022).

3. Types de cancer: Cancer du sein et cancer hépatique

Le cancer du sein et le cancer hépatique se caractérisent par une résistance accrue vis-à-vis toutes les thérapies conventionnelles préexistantes (Orcurto *et al*.,2014 ; Hassan.,2018).

3.1 Cancer du sein

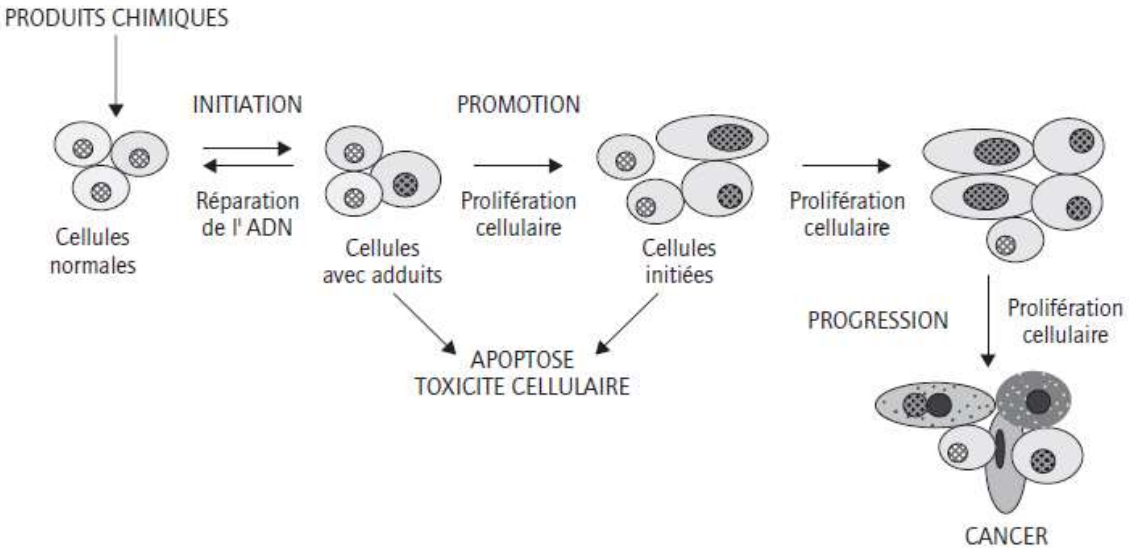
Le cancer du sein ou l'adénocarcinome est une maladie hétérogène caractérisée par une prolifération incontrôlée et anarchique des cellules épithéliales mammaires qu'il s'agisse des cellules des lobules «carcinome lobulaire» ou des cellules des canaux galactophores «carcinome canalaire» qui peuvent être "*in situ* ou infiltrant" selon leur capacité d'effraction de membrane basale et leur potentiel métastatique (Huang *et al*.,2021).

3.2 Cancer hépatique

Le cancer hépatique ou carcinome hépatocellulaire est une forme de tumeur maligne qui se caractérise par une prolifération anormale et anarchique des hépatocytes, des cellules de l'épithélium biliaire, tissu conjonctif ou de l'endothélium vasculaire on parle ainsi du cancer primitif du foie, ou du cancer secondaire résultant d'une tumeur à distance provenant d'un autre organe (métastase). Ce carcinome hépatocellulaire se développant sur des maladies du foie préexistantes (Surcharge génétique en fer, infections à virus de l'hépatite B ou C, stéatohépatite non alcoolique, maladie de Wilson, syndrome métabolique…) qui peuvent favoriser l'émergence de ce type de cancer (Navaneethan *et al*.,2015).

4. Cancérogénèse

Les cancers sont d'écrits comme étant "monoclonaux", ce qui signifie que chaque cancer provient d'une seule cellule tumorale (Hanahan.,2022). La transmutation d'une cellule normale en une cellule tumorale cancéreuse est un biologique complexe, long, lent, multifactoriel, comportant plusieurs phases basées sur une succession des modifications génétiques (mutations, amplifications, délétions et translocations), touchants des gènes entrainés dans le processus de cancérogénèse (proto-oncogènes, anti-oncogènes et les gènes de réparation de l'ADN) et épigénétiques. Habituellement, et ainsi comme définie la cancérogénèse se déroule en trois phases clés : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression (Moradi *et al*.,2019).



<u>Figure 1</u> : Étapes clés de la cancérogénèse (Ernesto.,2018)

L'initiation tumorale au cours de laquelle la cellule normale exposée à des facteurs cancérogènes initiateurs (radiations, substances chimiques, virus, tabac…) recueillie des modifications réversibles de leur ADN (acide désoxyribonucléique) qui le vont permettre d'acquérir des caractéristiques l'amenant progressivement à une transformation en cellule tumorale (cellule initiée) (Ernesto.,2018) ; dans la phase de promotion tumorale, sous l'action des agents promoteurs mutagènes et si le système de réparation d'ADN est débordé la cellule initiée commence à proliférer d'une façon anormale donnant naissance à un clone de cellules tumorales possédants des propriétés cancéreuses communes ; arrivant à la phase de progression tumorale, le clone des cellules initiées passe de lésions précancéreuses à des lésions malignes, à cause de l'accumulation des anomalies génétiques, induisant une

prolifération cellulaire indépendante des signaux de croissance, extension tumorale invasive ainsi que la capacité de faire un métastase (Grabowska *et al*.,2012).

5. Caractéristiques de la cellule cancéreuse

Au cours de la cancérogénèse, les cellules cancéreuses ont acquis progressivement un certain nombre de propriétés qui les différencient d'une cellule normale (Hanahan & Weinberg., 2000). Ces propriétés des cellules cancéreuses résident en :

5.1 Autosuffisance aux signaux de croissance

En théorie, aucun modèle générique de cellules normales ne peut proliférer en absence de tels signaux stimulants. Cependant, les cellules tumorales recueillirent la capacité de générer la plupart de leurs propres facteurs de croissance, réduisant ainsi leur dépendance en regard de de leur microenvironnement tissulaire normal (Escargueil *et al*.,2009).

5.1.1 Altération des signaux de croissance extracellulaires

Dans les tissus normaux, la plupart des facteurs de croissance mitogéniques (GFs) sont synthétisés par un type cellulaire de manière à stimuler la prolifération d'un autre type (Ernesto B *et al*.,2018).

Beaucoup de cellules cancéreuses acquièrent la capacité de synthétiser les GFs auxquels ils répandent (boucle de régulation positive ou stimulation autocrine). PDGF (*Platelet-Derived-Growth Factor*) par les glioblastomes et TGF_{β} (*Transforming Growth Factor* $_{\beta}$) par les sarcomes (Ernesto B *et al*.,2018).

5.1.2 Altération des récepteurs

La surexpression des récepteurs GFs dans de considérablement cancers peut permettre à la cellule cancéreuse de devenir hypersensible aux concentrations normales de GFs, qui, en temps normal ne devraient pas entraîner leur prolifération. Par exemple l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) est surexprimé dans les cancers du cerveau, de l'estomac et du sein (Hanjani J.,2017).

5.1.3 Altération des voies de transduction intracellulaire

L'autonomie en signaux de croissance peut enfin provenir d'altérations, en aval du récepteur, dans les divers composants des voies de signalisation cytoplasmiques (Tiabi *et al*.,2023).

5.2 Insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance

Dans la cellule normale divers signaux antiprolifératifs exécutent pour maintenir la quiescence cellulaire soit sous forme d'inhibiteurs immobilisés ou d'inhibiteurs de croissance

solubles dans la matrice extracellulaire soit sur les surfaces des cellules voisines. Contrairement à la cellule normale, la cellule tumorale acquière séquentiellement des caractères d'insensibilité aux signaux antiprolifératifs. (Vitale *et al*.,2017).

5.3 Résistance à l'apoptose

L'amas cellulaire tumorale est spécifie par son taux de prolifération mais encore par le taux d'attrition cellulaire (Schade *et al*.,2019). L'apoptose (mort cellulaire programmée) représente une source majeure de cette attrition (Malumbres *et al*.,2009). L'aptitude à échapper à l'apoptose réforme l'équilibre initial mort/vie en faveur d'une survie cellulaire accrue. (Schade *et al*.,2019).

5.3 Potentiel réplicatif illimité

Les cellules de mammifères portent en lui-même une "horloge biologique", intrinsèque, qui limite leur multiplication. Celle-ci repose sur la corrosion graduelle des télomères (répétition d'éléments de séquences de 6 pb) durant des cycles synchroniques de réplication, les télomères devenant alors inaptes de protéger les extrémités des chromosomes qui deviennent fragiles. Cela conduit fatalement à la mort des cellules (Maciejowski & Lange.,2017).

Le maintien des télomères est caractérise tous les types de cellules malignes ; la majorité des cellules tumorales (85% à 90%) sur-expriment la télomérase qui permet de conserver la longueur des télomères en ajoutant des répétitions héxanucléotidiques aux extrémités de l'ADN télomérique (Barr *et al*.,2017).

5.4 Angiogenèse

À partir de 2-3mm^3 de diamètre (distance de diffusion passive), l'accroissement d'une tumeur nécessite la formation des néo-vaisseaux. Cette capacité angiogénique dépend de production des facteurs de croissance (VEGF/ bFGF, TGF/ eNOS/HIF 1/2…) par les cellules tumorales ou celles de leur microenvironnement tumoral (Craig *et al*., 2009).

5.5 Invasion et métastase

Certaines cellules cancéreuses acquièrent des changements mésenchymateuses fibroblastiques, qui sont associés à des modifications de la matrice extracellulaire qui lui donnent l'aptitude de se détacher de la tumeur primitive, qui devient infiltrante, et d'envahir le tissu adjacent, c'est le phénomène d'invasion tumorale. Suite à ce détachement de la tumeur primaire, les cellules tumorales atteignent les néo-vaisseaux sanguins et lymphatiques, seules celles ayant un potentiel de survie élevé, une forte résistance aux forces de cisaillement et à l'action du système immunitaire, arrives aux organes cibles nouvellement colonisés pour

former des macrométastases (Ullah *et al*.,2018). La métastase est souvent liée à un pronostic péjoratif chez les patients atteints le cancer (Delattre *et al*.,2021).

6 Epidémiologie du cancer

6.1 Incidence du cancer

Le cancer constitue actuellement un des problèmes cardinaux de santé publique que ça soit dans les pays développés ou dans les pays en voie de développement. Selon Globocan (2020), le nombre estimé des nouveaux cas enregistrés de cancers dans le monde entier est de 19 292 789 cas incidents avec une prédominance masculine soit 10 065 305 cas masculin contre 9 227 484 cas féminin. L'Asie totalisait 9 503 710 (49.3%), suivie par l'Europe avec 4 398 443 nouveaux cas (22.8%), l'Amérique avec 1470274 (20.9%), l'Afrique avec 1 109 209 (5.7%) et en dernier l'Océanie avec 254 291 (1.3%) (IARC.,2023). Les taux de mortalité par différents types de cancers dans le monde suivent ceux de l'incidence (Fauvernier.,2019).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et pour les deux sexes, les cancers les plus fréquents dans le monde sont successivement le cancer du sein avec 2 261 419 (11.7%), cancer du poumon avec 2 206 771 (11.4%), cancer colorectal avec 1 931 590 (10%) et cancer de prostate avec 1 414 259 (7.3%). Ces chiffres ne cessent à croitront et l'OMS estime qu'en 2040 le nombre des personnes diagnostiquées devrait augmenter d'environ 50% (OMS., 2022).

6.2 Incidence et mortalité au Maroc

Au Maroc le cancer représente un sérieux fléau de santé publique, il présente une deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (MSM.,2022). Les dernières statistiques de Globocan en 2022 estime que le taux d'incidence brute pour les deux sexes est de 148.3/ 100 000 avec une incidence brute féminine de 153,5 et masculine de 145,1 (Globocan.,2022). De même, l'OMS déclare qu'on 2022 la Maroc a enregistré 30 199 nouveaux cas de cancers chez les hommes marocains et 29 171 nouveaux cas chez les femmes marocaines respectivement, donc les femmes étant les plus touchées que les hommes au Maroc. Le cancer le plus fréquent est le cancer du sein avec 11 747 cas (38,9%), cancer du col utérin avec 2 165 cas (7,2%), cancer colorectal avec 2 068 cas (6,8%), cancer thyroïdien avec 1 982 cas (6,6%) et dernièrement cancer ovarien avec 1 222 (4%).

La meilleure connaissance au processus de cancérogénèse et aux caractéristiques de la cellule cancéreuse a ouvert de nouvelle voie l'identification des nouveaux cibles et pour le développement de nouveaux médicaments anticancéreux.

Pour faire face à ce lourd fardeau de santé publique mondiale, plusieurs traitements ont été développés.

7.Hormonothérapie

La progression tumorale dans certains cancers est stimulée par les hormones sexuelles. Par exemple, le cancer de la prostate qui peut être sensible à l'action d'androgènes et le cancer du sein qui peut être sensible à l'action d'œstrogènes. Ces hormones sexuelles, facteurs de croissance (GF), et à travers des récepteurs hormonaux exprimés par les cellules tumorales, activent des voies de transduction de signal conduisant à une prolifération cellulaire ce qui favorise le développement tumoral (Cuppone *et al*.,2008).

Cette thérapie consiste à inhiber l'action stimulante des hormones sexuelles, œstrogènes et progestérone dans le cas du cancer du sein et les androgènes dans le cas du cancer de prostate et empêcher l'activation de ses récepteurs sur les cellules tumorales hormonodépendantes. Pour y parvenir, deux stratégies thérapeutiques sont possibles avec des mécanismes d'action différents : atténuation de la production des hormones sexuelles impliquées dans le processus tumoral ou atténuation de l'effet de ces hormones sur le tissu tumoral cible (Clere & Faune., 2018).

L'atténuation de la production des hormones sexuelles s'effectué par des médicaments qui vont altérer la synthèse d'œstrogènes ou des androgènes on inhibant une de ses étapes tels que ; les anti-aromatases **(**Cuzicha *et al*.,2010) et les agonistes de la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) (Jordan *et al*.,2011).

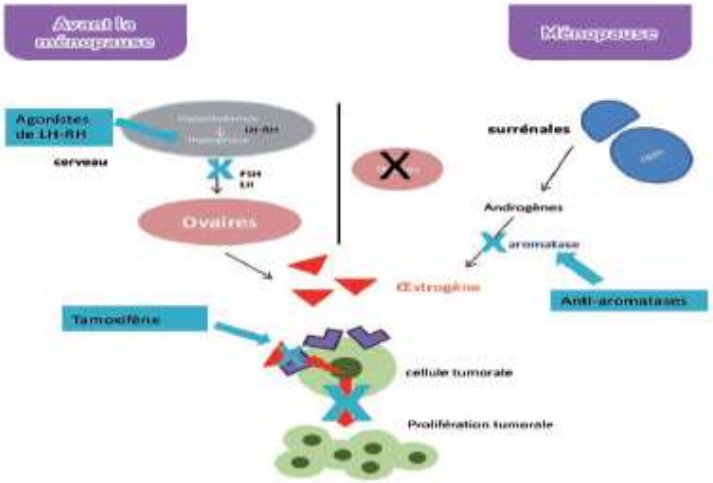


Figure 2 : Action des drogues anti-hormonaux sur le processus de synthèse d'Œstrogène (Grellety.,2018)

L'hormonothérapie est une arme thérapeutique majeure contre les cancers hormonodépendants mais la prise des inhibiteurs hormonaux peut avoir des répercussions du système hormonal c'est la raison par laquelle l'hormonothérapie entraine des effets secondaires différents : modification du cycle menstruel, augmentation du risque de thrombophlébite, sécheresse vaginale, sueurs nocturnes, bouffées de chaleur et le risque accrue d'ostéoporose chez la femme (Bleret *et al*.,2010). Chez l'homme l'hormonothérapie induit des troubles digestifs, hypertrophie mammaire, hypersensibilité des seins, changement d'humeurs, fatigue, perte du désir sexuel et perte de la masse osseuse et musculaire. Ainsi la résistance des cellules cancéreuses à l'hormonothérapie constitue la cause essentielle d'échec de l'hormonothérapie (Grellety.,2018).

8. Thérapie ciblée

Une meilleure compréhension des processus moléculaires impliqués dans le déroulement de transmutation néoplasique a permis l'avènement de nouvelles cibles moléculaire en ciblant exclusivement une des étapes de l'oncogenèse (Beddok *et al*.,2023). Ce domaine en pleine progression permet d'agir sur différentes étapes qui contrôlent la cancérogenèse, essentiellement, les voies de signalisation cellulaire et l'angiogenèse (Beddok *et al*.,2023).

8.1 Inhibition des signaux de transduction cellulaire

La cellule cancéreuse est individualisée par dénonciation d'équilibre survie/mort cellulaire, qui éventuellement liée à une irrégularité d'une ou de plusieurs voies de signalisation (Viala *et al*.,2023).

La voie de signalisation cellulaire est fondamentale pour le processus d'oncogenèse. Diverses thérapeutiques ciblées ont développées afin d'inhiber le signal de prolifération cellulaire au cours de différentes étapes de transduction (Guy et al.,2015).

De nombreuses applications ont été effectuées à ce jour, principalement sur deux voies de signalisation : la voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR et la voie des MAP kinases. …

8.1.1 La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est une voie délicate qui peut être activée soit au niveau intracellulaire par surexpression des protéines impliquées dans cette voie tels que ; PI3K et mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), soit par activation exogène via les récepteurs tyrosine kinase (Thibault Brotelle *et al*.,2016).

Plusieurs médicaments anticancéreux ont été développés ciblant cette voie de signalisation :

- **Inhibiteurs de mTOR**

Ces inhibiteurs entrainent un abaissement de la synthèse protéique via un abaissement de transcription d'ARNm codant principalement pour la cycline D et une accroissement du taux de protéine p27 inhibitrice du cycle cellulaire (Dreyer *et al*.,2009).

- **Inhibiteurs de PI3K**

La PI3K peut être inhibée par deux substances médicamenteuses. La wortmannin est un métabolite d'un champignon qui se fixe sur le site ATP de la PI3K de manière covalente, irréversible et non compétitive. La deuxième substance, un dérivé du quercétine, est un inhibiteur réversible qui se fixe sur le même site que la wortmannin. Elles portent sur la neutralisation de la sous-unité catalytique en agissant sur son domaine Sh2 par les molécules IRS-1 ou bien sur la sous-unité régulatrice en favorisant sa déphosphorylation par l'action d'une phosphatase (Laetitia *et al*.,2012).

- **Inhibiteurs d'AKT**

Le principal effecteur de la PI3K est la kinase AKT. Parmi les inhibiteurs de cette dernière kinase, ayant la capacité de le déphosphoryler et l'inactiver, on note la molécule UCN01 (7-hydroxy-staurosporine), la Périfosine et le 17-alkyl-déméthoxygeldanamycine (17AAG) (Rouillé *et al*., 2019).

8.1.2 Voie de MAPK

La voie des MAPKs peut être activée par une pluralité de stimuli notamment les récepteurs de la famille de l'EGFR. Dans cette voie de signalisation la fixation d'un ligand à son récepteur membranaire conduit généralement à l'activation des protéines d'aval, Cette coordination en cascade permet une amplification du signal, fournit aussi de façon importante, des cibles supplémentaires de régulation de la cascade. (Chebili.,2022).

- **Inhibiteurs de Ras**

Le gène RAS est un proto-oncogène dont la mutation est à l'origine de 30 à 60% des cancers humains. (Mazières *et al*.,2003). Plusieurs molécules dont le Tipifarnib (Zarnestra® R115777), et le Lonafarnib (SCH66336) sont utilisées pour retenir cette étape de farnésylation et de cette manière, l'envahissement des cellules cancéreuses (Marcuzzi *et al*., 2011).

- **Inhibiteurs de MEK**

Les inhibiteurs de MEK développés ciblent généralement les protéines homologues MEK1 et MEK2, qui sont des inhibiteurs non compétitifs de l'ATP vis-à-vis de son site de liaison. Leur capacité à inhiber les kinases MEK1 et MEK2 serait liées au changement de conformation de la protéine, suite à la liaison de l'inhibiteur sur un site différents de la poche de liaison de l'ATP (Piroth *et al*.,2020).

8.2 Inhibiteur de l'angiogenèse

À partir de 2-3 mm de diamètre, la progression d'une tumeur exige la formation des néo-vaisseaux. La néo-angiogenèse est donc une avancée importante pour la progression de toute tumeur, ce qui en fait une cible de choix dans la recherche actuelle. Les agents anti-angiogéniques agissent directement sur les cellules endothéliales. Ils n'éradiquent pas la tumeur mais contrôlent sa croissance (Catherine & Olivier.,2016).

Deux démarches thérapeutiques sont exclusivement développées : l'inhibition de VEGF par les anticorps monoclonal et par les inhibiteurs des tyrosines kinases des récepteurs au VEGF (VEGFR : Vascular endothelial Growth Factor Receptor) (Yang *et al*.,2020)..

- **Inhibiteurs de VEGFR**

Le récepteur VEGFR est récepteur transmembranaire, catalytique à activité tyrosine kinase. La liaison d'un ligand engendre la dimérisation du récepteur, entraînant le déclenchement de l'activité tyrosine kinase de la zone enzymatique interne. La phosphorylation des résidus de tyrosine va générer l'activation de la voie de transduction des signaux en lui dictant des fonctions cellulaires spécifiques. Plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinase sont utilisés, dont le cediranib (Recentin® ou AZD2171), le vandetanib (Zactima® ou ZD6474) et le vatalanib® ou PTK787/ZK22584) (Modi & Kulkarni.,2019).

- **Anti VEGF**

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal anti-VEGF. Il se lié au facteur de croissance clé de l'angiogenèse induisant ainsi la neutralisation de leurs activités biologiques. Il inhibe ainsi l'angiogenèse, entrave la croissance tumorale et freine la prolifération des cellules cancéreuses (Meadows & Hurwitz.,2012).

9. Plantes médicinales utilisées contre les cancers

À cause des coûts élevés des traitements anticancéreux, les patients recours vers la médecine traditionnelle et à la médication par les plantes médicinales. Ces dernières demeurent toujours un trésor d'information et une source importante des remèdes traditionnels dans les pays en développement en absence d'un système médical moderne (Meadows & Hurwitz.,2012).

Plusieurs enquêtes ethnobotaniques ont été faites, dans diverses régions du Maroc, ayant comme objectif de bien savoir les espèces des plantes les plus utilisées vis-à-vis différents types de cancers. Ses résultats nous a permis de recenser une centaine d'espèces appartenant à différentes familles dont la famille de *Myrtaceae*, des *Fabaceae*, *Anacardiaceae*, *Compositaceae* et de *Euphorbiaceae* (El Ouahdani *et al*.,2021).

Les espèces fréquemment utilisées sont : *Artemisia herba-alba*, *Eucalyptus sailgna*, *Solanum sodomaeum*, *Peganum harmala*, *Urginea marituma*, *Salvia aegyptiaca*, *Citrullus colocynthis*….(El Ouahdani *et al*.,2021).

Chapitre IV. Inflammation

1. Introduction

Sans réaction inflammatoire aucune survie n'est possible. L'inflammation est la princeps tentative de défense de l'organisme. En effet elle a pour rôle de réparer les tissus endommagés, détecter les agents agresseurs nuisibles et de l'éliminer en dehors de l'organisme. S'elle est défaillante et malle réguler, cette réaction inflammatoire peut devenir néfaste et dangereuse pour l'organisme. À l'heure actuelle, de nombreuses manifestations pathologiques sont liées à des mécanismes considérer comme dysimmunitaires (Zhang *et al*.,2019).

2. Définition

L'inflammation est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression (Scott Jr *et al*.,2019), il s'agit d'une réaction stéréotypée du système immunitaire se produit au point irrité par un agent pathogène. Le rôle de cette réaction inflammatoire est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre au plus vite la réparation des tissus. Elle permet donc de maintenir l'intégrité du « soi ». Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes les plus réccurents : chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction (quadrilatère de Celse) (Tsai *et al*.,2019).

3. Etapes de la réaction inflammatoire

Ordinairement, et ainsi définie l'inflammation se déroule en trois éminent phases (Scott Jr *et al*.,2019**)** ; la phase vasculaire, la phase cellulaire et la phase de résolution ou cicatrisation.

a) Phase vasculaire

La réponse vasculaire se caractérise par une vasoconstriction réflexe très courte suivie d'une vasodilatation prolongée avec ralentissement du flux sanguin et augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui provoque une fuite de liquide plasmatique et donc la formation d'œdèmes. Selon Yu *et al*. (2020), une augmentation de la perméabilité entraîne également la diapédèse et la migration extravasculaire des leucocytes. L'interruption de la circulation sanguine de quelques secondes va perturber le déplacement des plaquettes et provoquer leur activation. Le thromboxane A2 produit par la plaquette activée possède des propriétés agrégantes et vasoconstrictrices puissantes. En plus de jouer un rôle dans l'hémostase primaire, cette étape immédiate des vaisseaux sanguins a également pour objectif d'isoler l'agent étranger (Alharbi *et al*.,2021). En outre, l'activation des facteurs de coagulation en présence de facteurs tissulaires conduit à la création de fibrine qui renforce le clou

hémostatique formé par l'agrégation des plaquettes (figure 3). Selon Tsai *et al*. (2019), la fibrine joue un rôle essentiel dans la chimiotactique des polynucléaires neutrophiles.

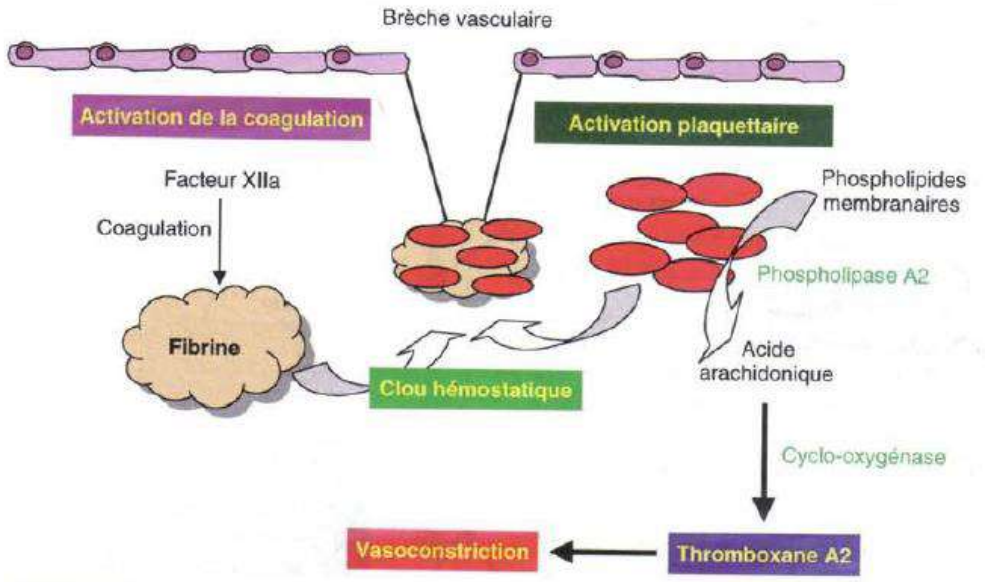


Figure 3 : Activation plaquettaire au cours des premières étapes de la phase vasculaire (Tsai *et al* .,2019).

Le fonctionnement des vaisseaux sanguins est influencé par la libération de médiateurs tels que l'histamine, les prostaglandines, les anaphylatoxines C3a et C5a produites par l'activation du complément. Selon Alharbi *et al*.,(2021), la libération de ces médiateurs entraîne une dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui entraîne une modification de la perméabilité des vaisseaux sanguins et une augmentation des fenêtres intercellulaires, ce qui facilite l'extravasation des protéines plasmatiques et des cellules vers les tissus (figure 4).

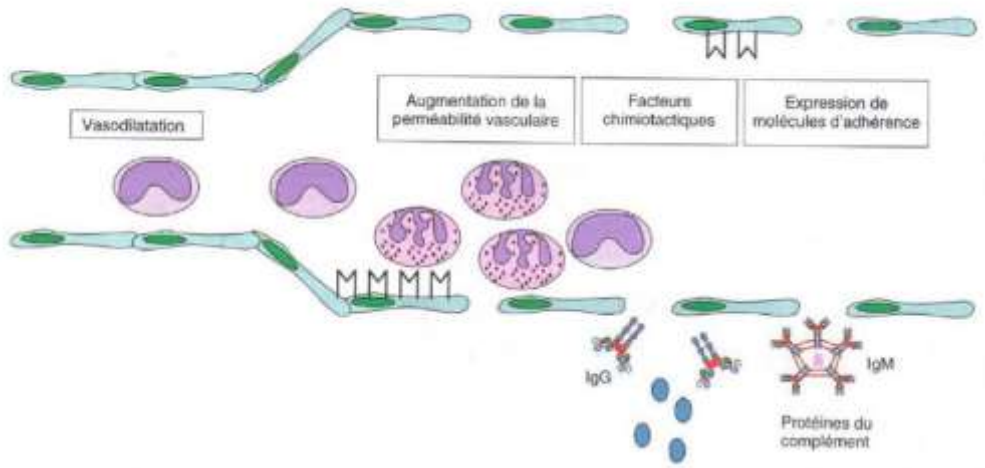


Figure 4 : Modifications précoces de l'endothélium vasculaire au cours de la réponse inflammatoire (Tsai *et al* .,2019).

Dès le commencement des processus vasculaires, les polynucléaires et les monocytes quittent la partie centrale du flux sanguin pour atteindre la paroi des vaisseaux sanguins, ce qui s'appelle la "margination", puis y adhèrent, ce qui s'appelle "l'adhérence". Ainsi, la diapédèse débute : les cellules marginées et adhérentes se déplacent entre les cellules endothéliales (voir figure 5). Elles pénètrent ensuite dans l'espace extravasculaire et se rendent au foyer inflammatoire par chimiotactisme de différentes molécules comme les anaphylatoxines C3a et C5a, les leucotriènes et les produits bactériens (Chen *et al*.,2017).

Les changements dans les parois vasculaires vont provoquer l'émergence de nouveaux récepteurs des cellules endothéliales tels que ELAM-1 (molécule d'adhérence des leucocytes endothéliaux-1) et VCAM-1 (molécule d'adhérence des cellules vasculaires-1), ce qui renforce les phénomènes d'extravasation et de margination des cellules vers les tissus affectés (Chen *et al*., 2017).

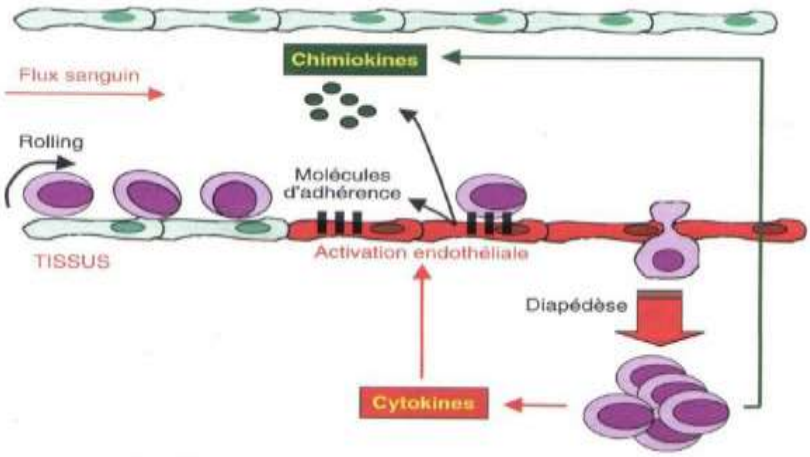


Figure 5 : Migration trans-endothéliale des leucocytes (Owolabi *et al.*,2018)

b) Phase cellulaire : recrutement des leucocytes

Les cellules endothéliales et les leucocytes circulants sont principalement impliqués dans la réponse cellulaire qui suit la réponse vasculaire (Netea et al., 2017).

Dans la phase cellulaire, on observe un afflux de leucocytes extravasculaires interstitiels : d'abord les polynucléaires neutrophiles, puis les monocytes. Les neutrophiles accumulent leur maximum à la 4ème heure et diminuent rapidement, tandis que le nombre de monocytes augmente après la 4ème heure et atteint son maximum entre 18 et 24 heures (Owolabi *et al*., 2018).

Des facteurs chimiotactiques attirent les polynucléaires circulants qui se trouvent à proximité du foyer inflammatoire. L'adhésion des polynucléaires neutrophiles circulants aux cellules endothéliales se fait par marginalisation. Il est dit que cette adhérence est initialement fragile, les polynucléaires "roulent" à la surface de l'endothélium. La réaction entre les récepteurs des cellules endothéliales VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1, molécules d'adhérence de la famille des immunoglobulines et les intégrines présentes à la surface des polynucléaires entraîne une adhérence puissante et étroite (Netea *et al*., 2017). On dit qu'ils rampent lorsque les polynucléaires s'étendent sur les cellules endothéliales. Ensuite, ils traversent la paroi vasculaire par diapédèse grâce à l'intervention d'une molécule d'adhérence spécifique : la PECAM (molécule d'adhérence des cellules platelet endothélium). Selon Owolabi *et al*. (2018), les polynucléaires ont la capacité de s'insérer entre les cellules endothéliales et de traverser la membrane basale en produisant des sérine-protéases, puis de pénétrer dans les espaces extravasculaires. Selon Medzhitov (2008), la migration des leucocytes dans le tissu conjonctif est influencée par le gradient de concentration des chimiokines produites par les cellules phagocytaires et endothéliales sur le site inflammatoire (figure 5).

Les polynucléaires, une fois qu'ils sont présents dans le foyer inflammatoire, englobent les substances étrangères, qu'elles soient opsonisées ou non. Des vacuoles de phagocytose contiennent les substances phagocytées. Les lysosomes associent leur contenu enzymatique à la vacuole de phagocytose, ce qui entraîne l'hydrolyse enzymatique du contenu des vacuoles et l'activation du métabolisme cellulaire oxydatif, entraînant la production de radicaux libres oxygénés toxiques (Owolabi *et al*.,2018).

Les monocytes circulants de la deuxième vague cellulaire sont soumis à la même épreuve que les polynucléaires (chimiotactisme, adhérence). Les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles les attirent vers le foyer inflammatoire où ils se métamorphosent en macrophages. Dans le cas d'une inflammation aiguë, ils sont responsables du nettoyage du foyer inflammatoire et contribuent à la poursuite du processus inflammatoire en cas d'inflammation chronique en produisant de nombreux médiateurs tels que les cytokines, les systèmes de complément et la coagulation (Owolabi *et al*.,2018).

c) Phase de résolution

Le rétablissement physiologique implique d'abord la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, qui ont la capacité de produire et de remodeler les éléments de leur stroma ou de leur lame basale. Dans le cas où l'atteinte est plus grave et provoque une destruction du tissu affecté, d'autres cellules agiront pour réparer le tissu. Le

collagène, la fibronectine et la laminine sont des protéines matricielles des tissus intercellulaires, qui sont produites par les macrophages et les fibroblastes (Chen *et al*.,2017).

4. Formes cliniques de l'inflammation

On distingue deux formes de l'inflammation, En fonction de la vitesse et de la durée de la réponse inflammatoire : Inflammation aiguë et chronique.

4.1 Inflammation aiguë

C'est la première réponse corporelle face à une agression. Il s'agit d'une réaction inflammatoire immédiate et rapide à un agent déclenchant, dure des minutes, plusieurs heures voire quelques jours. Elle est caractérisée par l'apparition d'un œdème résultant des exsudations des protéines plasmatiques et d'une diapédèse des leucocytes. Une réaction inflammatoire aiguë réussie Cela entraîne l'élimination de l'agent, puis le nettoyage du foyer inflammatoire par les macrophages, l'arrêt de l'afflux des phagocytes circulants, la mort par apoptose des cellules présentes dans le foyer inflammatoire devenues inutiles et le retour à l'état initial sans aucune conséquence fonctionnelle ou anatomique. (Schwartz *et al*.,2015). Dès lors que la réaction inflammatoire anormalement persiste, on retrouve alors la réaction inflammatoire chronique et des situations pathologiques liées à ce mécanisme (Chen *et al*,.2017).

4.2 Inflammation chronique

C'est une réponse inflammatoire définie par une progression longue, dysrégulée et inadaptée allant jusqu'à des mois, voire des années si la détersion de l'agent déclenchant est incomplète. Souvent associée à un processus dégénératif, nocif et à la présence des macrophages, des lymphocytes, la fibrose et de la nécrose tissulaire (Chen et al.,2018). La raison de la chronicité n'est pas forcément claire. Elle s'explique dans de nombreux cas par l'incapacité de l'organisme à éliminer la substance déclenchante. C'est souvent le cas de maladie de Crohn, thyroïdite d'Hashimoto, l'Athérosclérose, l'asthme, l'Eczéma et la Polyarthrite rhumatoïde (Ferradji.,2018).

La réaction inflammatoire est donc un processus biologique complexe impliquant une pléthore de molécules, de substances chimiques et des cellules appelées des médiateurs de l'inflammation (Chen *et al*.,2018).

5. Médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation ce sont des molécules dérivées des protéines plasmatiques, interviennent à toutes les phases de la réaction inflammatoire on agissant sur ses acteurs.

Après sa libération, les médiateurs ont une durée de vie très courte lors de laquelle régulent la réponse inflammatoire par son activation et son inactivation (Mekenza & Medjmedj.,2018).

Selon leur origine on retrouve : les médiateurs endogènes cellulaires (chémokines, cytokines, histamine et eicosanoïdes), d'origine plasmatique (kinines, acteurs de système de coagulation et les acteurs des systèmes du complément) et d'origine exogène comme les endotoxines bactériennes (Owolabi *et al.*,2018).

5.1 Amines vaso-actives

Faisant partie de la phase d'initiation, parmi lesquelles on distingue : histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes et la sérotonine.

Tableau 1 : Médiateurs inflammatoires amines vaso-actives, ses rôles et ses fonctions

Médiateur	Origine	Rôle
Histamine : Il s'agit d'une molécule de transmission de signaux et une amine biogène provient de la décarboxylation de l'histidine (Netea *et al.*,2017).	- Mastocytes -Granulocytes -Basophiles (Owolabi *et al.*,2018).	-Vasodilatation -Augmentation de la perméabilité vasculaire entrainant une réaction œdémateuse et une rougeur. -Neurotransmission et irritation des terminaisons nerveuses (processus de la douleur). -Déclenche la production des substances chimiotactiques on agissant sur les fibroblastes et les leucocytes (Kumar *et al.*, 2014).
Prostaglandines : est un acide gras insaturé obtenu à partir d'acide arachidonique par action de COX (Cyclooxygénases) (Netea *et al.*,2017).	-Macrophages -Mastocytes -Cellules endothéliales	-La régulation de nombreuses fonctions physiologiques : croissance et différenciation cellulaire, tension artérielle, fonctions reproductrices. -Vasodilatation -Augmentation de la perméabilité vasculaire (Netea *et al.*,2017).
Leucotriènes : lipides obtenues à partir des eicosanoïdes par action de	-Neutrophiles -Plaquettes -Macrophages	-Attraction et activation des cellules inflammatoires (Braig *et al.*,2017). -Vasodilatation

lipoxygénases sur l'acide arachidonique (Braig *et al*., 2017).	-Mastocytes	-Augmentation de la perméabilité vasculaire
Thromboxanes: cytokines synthétisés à partir du PGG2 et PGH2 par action de thromboxane synthétase (Lakhani *et al*.,2009).	-Plaquettes sanguins	-Vasoconstriction -Agrégation plaquettaire -Modulation du système immunitaire (Owolabi *et al*.,2018)
Sérotonine: monoamine de la famille des indolamines, synthétisé à partir de tryptophane par action de tryptophane hydroxylase 1 (Tph1) (Gilroy & De Maeyer.,2015).	-Plaquettes sanguins -Mastocytes	-Vasodilatation -Augmentation de la perméabilité endothéliale -Neurotransmission des messages nerveux (Gilroy & De-Maeyer.,2015)

5.2 Protéines plasmatiques

- **Kinines** : sont un groupe des polypeptides autacoïdes, vasomoteur étroitement lié au système de la coagulation, synthétisés à partir des précurseurs plasmatiques sous action d'enzymes de conversion. Les principaux constituants de ce groupe sont les kinines, principalement la bradykinine qui jouent un rôle important dans le processus inflammatoire. Elles entrainent une vasodilatation, augmentent la perméabilité vasculaire, activent la cascade d'acide arachidonique, stimulent les mastocytes de synthétiser de l'histamine, activent la conversion du complément C_5 en C_5a et activant ainsi le mécanisme de douleur (Sadik *et al*.,2018).
- **Protéines du complément** : correspondent à une cascade de protéines membranaires et sériques faisant partie de l'immunité innée. La cascade d'activation du système de complément implique plusieurs protéines biologiquement actives (Ioannis *et al*.,2020) tels que ; les producteurs des kinines, facteurs chimiotactiques, opsonines et les anaphylatoxines (Kotlyarov *et al*.,2022)

6. Anti-inflammatoires

L'inflammation est traitée par diverses substances connues sous le nom d'anti-inflammatoires. Ces médicaments anti-inflammatoires ont pour effet d'inhiber les processus inflammatoires. En plus des médicaments antipyrétiques tels que l'acide acétylsalicylique (Aspirine), qui ont des propriétés anti-inflammatoires à forte dose ou à doses continues, on peut également identifier des médicaments à activité anti-inflammatoire plus spécifique, tels que les substances de synthèse (AINS), les hormones glucocorticoïdes (AIS) et les substances antirhumatismales (Diomande *et al*.,2013).

6.1 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les AINS sont l'une des catégories de médicaments les plus couramment employés à travers le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Aujourd'hui, plus de 50 types d'AINS sont disponibles sur le marché mondial (Gwee *et al*., 2018).

Les travaux de Vane en 1971 ont établi les mécanismes d'action des AINS. Certains d'entre eux ont un impact sur la phase initiale de l'inflammation, comme les dérivés pyrazolés et salicylés. Certains d'entre eux ont également un impact sur la phase initiale et les phases tardives de l'inflammation (Kotlyarov *et al*.,2022). Ils inhibent la cycloxygénase et la synthèse des prostaglandines qui jouent un rôle pro-inflammatoire, notamment la PGE2 et la PGI2, provenant de l'acide arachidonique, comme l'indométacine et ses dérivés (Garg *et al*., 2020). Par inhibition des lipoxygénases, ils entravent la biosynthèse des acides eicosaénoïques et des leucotriènes. Selon Hao *et al*. (2019), ils entravent la production de Thromboxane (TXA2), ce qui entrave la migration des leucocytes et des macrophages. D'un point de vue biochimique, il existe différentes catégories d'AINS : les dérivés salicylés (comme l'aspirine), les pyrazolés (comme le phénylbutazone), les propioniques (comme l'ibuprofène et le kétoprofène), les oxicam (comme le piroxicam), les indoliques (comme l'indométacine), et les fénamates (comme l'acide niflumique) (Hao *et al*., 2019).

6.1.1 Effets indésirables des AINS

Tous les AINS (Anti-inflammatoires non-stéroïdiens) ont la particularité de diminuer la production des médiateurs de l'inflammation. notamment les prostaglandines (Benrouibah & Nedjoud.,2021). Cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires indésirables en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques différentes de ces médiateurs tissulaires (Ceci *et al* ,.2020), comme effet secondaire on cite l'ulcération gastroduodénales et

saignements digestifs (figure 6) qui sont attribués essentiellement à l'inhibition des cyclooxygénases de type I, les gastralgies et l'insuffisance rénale dues à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (Ceci *et al* ,.2020).

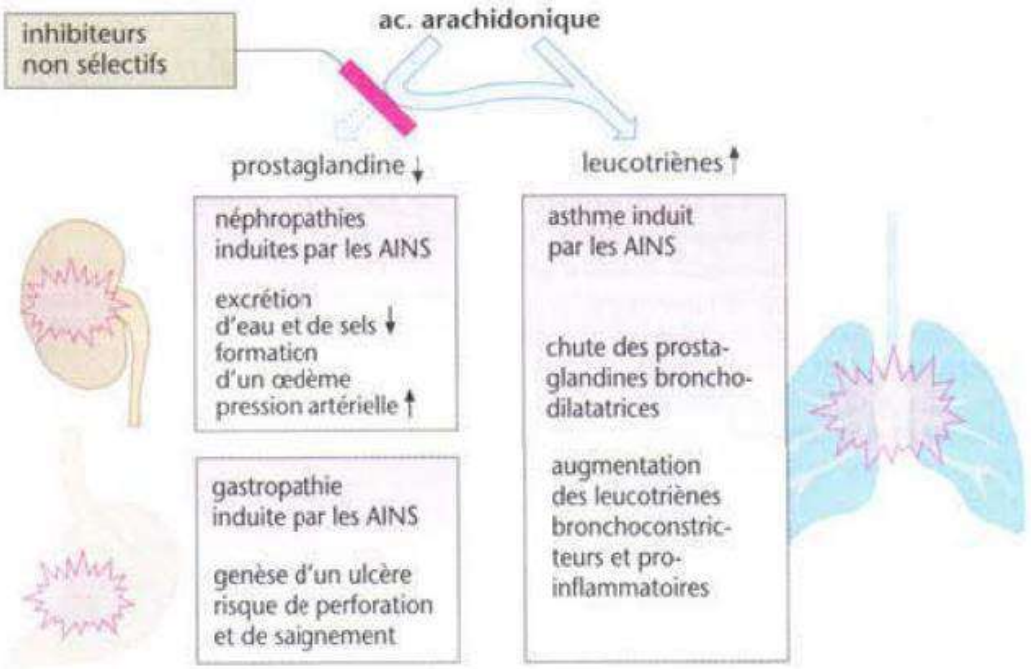


Figure 6 : AINS et leurs effets indésirables (Berenbaum.,2022)

6.2 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) forment un large éventail de médicaments, qui sont des dérivés synthétiques du cortisol, le principal glucocorticoïde surrénalien. Ces médicaments sont des anti-inflammatoires puissants qui possèdent également des propriétés immunomodulatrices et antiallergiques. En empêchant la phospholipase A2 d'agir, ils entravent à la fois la voie des prostaglandines et celle des leucotriènes (Hao *et al*., 2019). Les protéines de transport, telles que la transcortine et l'albumine, transportent les glucocorticoïdes. Le complexe glucocorticoïdes-récepteur entraîne la production d'une protéine appelée lipocortine, qui inhibe la phospholipase A2. Cela diminue la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires, ce qui entraîne la formation des médiateurs de l'inflammation, tels que les prostaglandines et les leucotriènes (Benrouibah & Nedjoud.,2021). De cette manière, ils ont la capacité d'empêcher la production de tous les gènes immunitaires, y compris celui qui indique l'IL-2 IL-6, le TNF-α et l'interféron-Y (Berenbaum, 2022).

6.2.1 Effets indésirables des AIS

Les glucocorticoïdes n'ont pratiquement aucun effet secondaire lors d'une administration courte. Pendant une utilisation prolongée, ils provoquent des changements similaires à ceux observés dans le syndrome de Cushing (William & Frishman.,2020). Selon Selma *et al.* (2023), les glucocorticoïdes entraînent une diminution de la dégradation des protéines, ce qui entraîne une diminution des muscles squelettiques, une ostéoporose, un trouble de la croissance chez l'enfant, une atrophie cutanée, une rétention d'eau et de sodium (activité des minéralocorticoïdes), une augmentation de la pression artérielle, la formation d'œdèmes, ainsi qu'une perte de potassium avec risque d'hypokaliémie et de diabète stéroïdien (figure 7).

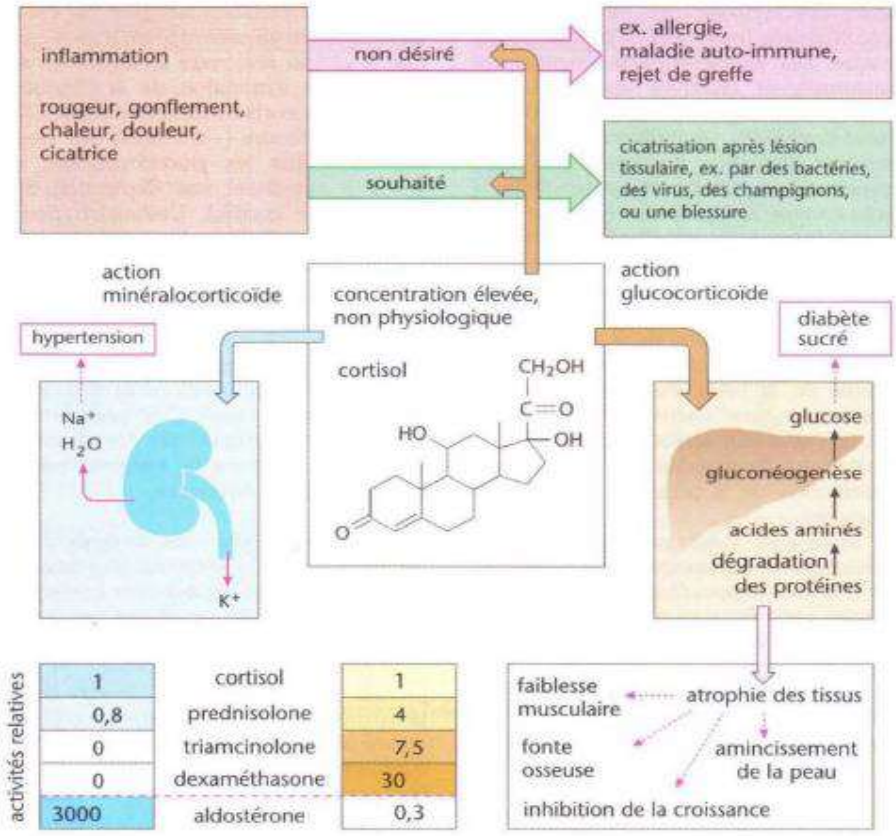


Figure 7 : Effets indésirables des glucocorticoïdes (William & Frishman.,2020).

Aujourd'hui, les recherches cherchent à trouver des anti-inflammatoires sélectifs qui pourraient ne réprimer que le système immunitaire (Piguet.,2021). Il se peut que la phytothérapie anti-inflammatoire soit une alternative à ces médicaments de synthèse ou qu'elle soit utilisée en complément de ces traitements pour réduire leur consommation et réduire ainsi leurs effets secondaires. Selon Malbos (2020), l'utilisation de la phytothérapie en combinaison avec les médicaments de synthèse permet de diminuer les doses initiales des médicaments de synthèse, voire de les éliminer.

Chapitre V. Douleur

1. Définition

D'après la définition élaborée par l'IASP (International Association for the Study of Pain) la douleur est une expérience gênante et subjective à la fois émotionnelle et sensorielle, due à un dommage tissulaire réel ou potentiel (Beloulou & Lamara.,2023). Sur le plan sémiologique, la douleur est un symptôme, un signal de sauvetage attire l'attention sur un phénomène pathologique ; elle peut aussi devenir par son intensité et sa durée, un véritable syndrome, retentissant sur les grandes fonctions de l'organisme (Nyanke *et al.*,2023).

Le symptôme de la douleur se manifeste par différentes manifestations, généralement cliniques (douleurs trophiques, œdèmes), végétatives (vasoconstriction, mydriase, tachycardie), motrices (retrait, sursaut, fuite), des modifications de la pression artérielle et des sudations (Picart *et al.*,2023).

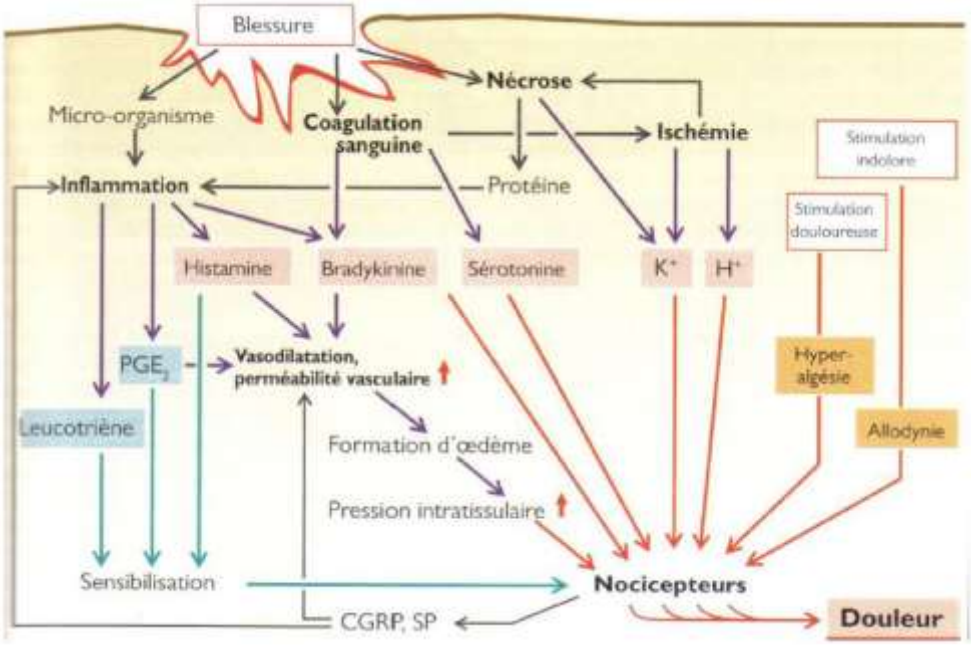


Figure 8 : Mécanismes périphériques d'apparition de la douleur (Galvão & Bocchi.,2023)

2. Types de douleur

Habituellement, une douleur est apparaît à cause d'une lésion tissulaire et selon sa durée de persistance deux types de douleur sont principalement identifiés : la douleur aiguë et la douleur chronique (Galvão & Bocchi.,2023).

2.1 Douleur aiguë

La douleur aiguë, apparait lors d'une atteinte tissulaire ou organique, brutale, vive réversible, monofactoriel et souvent brève. Joue le rôle d'un signe d'alerte avertissant des phénomènes

anormaux (traumatismes, inflammations, brulures, infections, fractures…) et qui va permettre à l'organisme de déclencher des réactions dont la finalité est de garder l'intégrité de l'organisme (Virot & Bernard.,2018).

2.2 Douleur chronique

La douleur chronique diffère de la douleur aiguë en raison de sa persistance plus longue (>3 mois) et de sa durée de durabilité. Toutefois, la douleur chronique est une douleur qui s'installe, dure ou récidive durant une durée supérieure à 3 mois, entretenue par des multiples facteurs et n'ont pas de caractère bénéfique protecteur ; elle est donc inutile, invalidante et qui pourrait avoir un impact négatif sur le comportement ou le bien-être du patient. (Hertzog & Razon.,2020).

3. Traitement pharmacologique de la douleur

Dans le domaine des douleurs, l'OMS a suggéré une échelle de prise de décision thérapeutique comprenant trois paliers d'antalgiques (Pereira.,2016) :

- Palier I correspond aux analgésiques non opioïdes et des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). (Gaspard *et al*.,2015).

- Palier II correspond aux opioïdes mineurs et leurs interactions avec les analgésiques non morphiniques sont : codéine, tramadol (Gaspard *et al*.,2015).

- Palier III correspond aux antalgiques opioïdes majeurs : morphine (produite par la plante Papaver somniferum L., buprénorphine, hydromorphone et fentanyl (Gaspard *et al*.,2015).

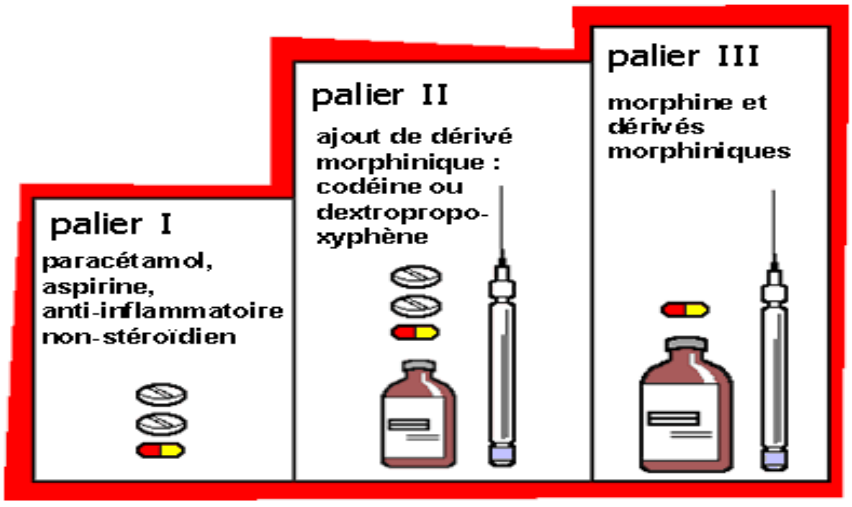


Figure 9 : Niveaux d'antalgiques selon l'OMS (Legeay & Faure.,2023)

4. Mécanisme d’action des antalgiques

4.1 Antalgique non opioïdes

C'est une famille diversifiée qui regroupe des substances qui peuvent réduire les effets de la réaction inflammatoire (douleur). Ces produits ont une action analgésique et antipyrétique, ainsi qu'une action anti-inflammatoire. Les AINS ont principalement pour effet d'inhiber la cyclooxygénase, ce qui inhibe la production de prostaglandines (Hertzog & Razon.,2020).

Prenons l'exemple du salicylé principal, l'acide acétyle salicylique (AAS) ou l'Aspirine. Son effet analgésique repose principalement sur un mécanisme périphérique qui inhibe la synthèse de prostaglandines, mais a une faible activité anti-inflammatoire (Gaspard *et al*.,2015). En revanche, le paracétamol agirait en inhibant la production de prostaglandines au niveau central, qui jouent un rôle dans les processus de douleur et de fièvre, en inhibant l'enzyme prostaglandine H2 synthase (PGHS) (Hertzog & Razon.,2020).

4.2 Antalgiques opioïdes

Les opioïdes ont un effet antalgique en raison de leur affinité pour des récepteurs qui sont responsables de la fixation des opioïdes endogènes (enképhaline, β-endorphine, dynorphines) qui sont des neurotransmetteurs ou des neuromodulateurs. Différents types de récepteurs des opioïdes (μ, κ et δ) sont impliqués dans la médiation d'effets variés, et tous sont associés aux récepteurs couplés à la protéine G (Gaspard *et al*.,2015). La plupart des cellules nerveuses sont hyperpolarisées par les opioïdes. Selon Hertzog et Razon (2020), une excitation diminue l'influx de calcium dans la cellule nerveuse, ce qui réduit la libération de neurotransmetteurs excitateurs et la transmission synaptique.

Chapitre VI. Stress oxydant

1. Introduction

Le stress oxydant est un composant critique joue un rôle essentiel dans diverses affections pathologies, résultera d'une situation de déséquilibre où l'organisme devient incapable de se défendre contre la production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Amir Aslani & Ghobadi.,2016). En effet, il est lié aux mécanismes d'apparition et de développement des accidents vasculaires-cérébraux (oxydation des lipides), du cancer (oxydation d'ADN), de la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et le diabète (Sies.,2017).

2. Définition

Le stress oxydant est une circonstance anormale qui traverse parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui outrepasse leurs capacités antioxydantes (Angelova & Abramov.,2018).

La production des radicaux libres est maitrisée par des systèmes de défenses où la balance antioxydante/prooxydante reste équilibrée, mais dans le cas où on a un déficit en antioxydants ou par suite de déficit on a une surproduction énorme de radicaux c'est ce qu'on appelle le stress oxydant (Banks & Andersen.,2019).

Les macromolécules biologiques essentielles sont très affectées par l'excès de radicaux libres non neutralisés par les moyens de défense, ce qui peut entraîner des anomalies dans l'expression des gènes et des récepteurs membranaires, la prolifération ou la mort cellulaire, des troubles immunitaires, une mutagenèse, des dépôts de protéines ou de lipofuschine dans les tissus. (Sies.,2017).

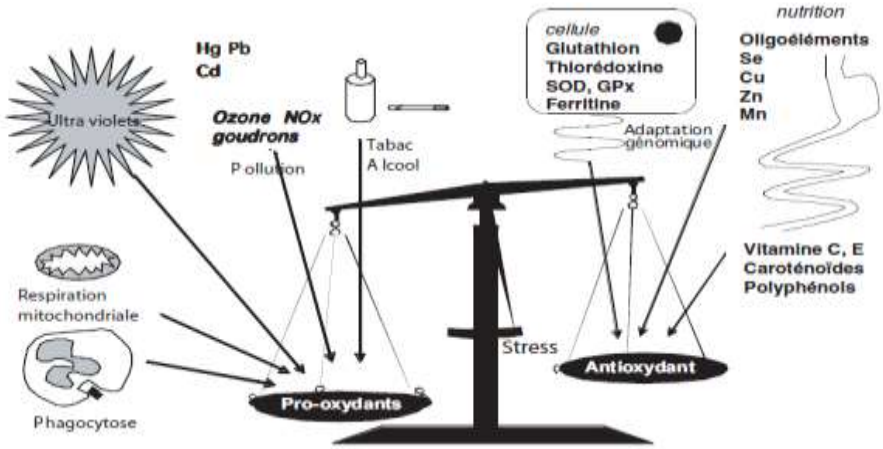


Figure 10 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro-oxydant et antioxydant (Banks & Andersen.,2019).

3. Radicaux libres

Les radicaux libres sont définit comme étant des molécules présentant un ou plusieurs électrons libres sur leurs couches périphériques externes (Ursini *et al*.,2016), Il s'agit de composés dont la structure électronique est déséquilibrée, ce qui leur confère une grande réactivité à l'égard des composants organiques et des cellules. Habituellement, ils contribuent au bon fonctionnement de l'organisme mais leur excès peut être néfaste (Benayad.,2013). Ces « terroristes » Ils se manifestent lors de chaque processus d'oxydation, que ce soit l'oxydation désirée ou non désirée. Ils s'attachent à des éléments stables du corps pour leur donner un électron et leur donner une certaine stabilité. Selon Matsuzawa (2017), une fois que l'élément perd son électron, il se transforme en un radical libre et prendra un électron d'un autre élément stable, ce qui provoquera une cascade de réactions.

4. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux libres et leurs précurseurs communément désignés sous le nom d'« espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Il englobe les radicaux libres ainsi que certains réactifs non radicalaires dérivés oxygénés dont la toxicité est significative, tels que le peroxyde d'hydrogène (H2O2) et le peroxynitrite (ONOO-). (Kamal et al.,2021).

5. Origine et conséquences du stress oxydant

La production d'EROs peut être endogène par le métabolisme oxydatif mitochondrial dans la chaîne respiratoire ou par les peroxysomes. Différents mécanismes contribuent à l'apparition d'un stress oxydant, que ce soit en favorisant la production de ROS tels que l'hyperglycémie, des niveaux élevés de lipides tissulaires (adiposité ectopique), l'inflammation chronique, l'infiltration et l'activation excessive des leucocytes, leur production par l'endothélium, la production excessive d'hormones du système rénine-angiotensine et l'hyperleptinémie, ou encore en raison d'une défaillance des systèmes antioxydants qui protègent notre organisme des effets néfastes des radicaux libres (Ali *et al*.,2019). S'ils sont formés en trop grande quantité, les EROs deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes qui codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. De plus, leur instabilité les rend extrêmement réactifs à l'égard de macromolécules biologiques telles que l'acide désoxyribonucléique ou ADN, les lipoprotéines, les protéines et les lipides membranaires, et ils peuvent entraîner des modifications oxydatives néfastes qui pourraient être impliquées dans l'apparition de pathologies (Kamal *et al*.,2021).

6. Pathologies liés au stress oxydant

Le stress oxydant étant à l'origine de nombreuses pathologies, il semble logique de chercher à supprimer ce stress à des fins préventives ou curatives.

Tableau 4 : Quelques pathologies liées au stress oxydant

Pathologies	Références
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Salehi *et al*.,2018)
Maladies auto-immunes	(Ali *et al*.,2019)
Arthrite rhumatoïde	(Paramanya & Ali.,2019)
Maladies inflammatoires	(Spickett.,2013)
Athérosclérose	(Belcastro.,2016)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg., 2004)
Emphysème	(Sayhi *et al*.,2024)
Diabète sucré	(Bhatti *et al*.,2017)
Cancers	(Kamal *et al*.,2021)
Anémie drépanocytaire	(Bhatti *et al*.,2017)

7. Antioxydants

7.1 Définition

Un antioxydant désigne toute substance qui, lorsqu'elle se trouve à une concentration faible par rapport à celle du substrat oxydable (oxydant), retarde ou prévient de manière importante l'oxydation de ce substrat. (Gheddouchi *et al*.,2015).

Deux sources d'antioxydants sont identifiées : l'une endogène, qui comprend des protéines telles que l'albumine, la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine, des enzymes telles que le glutathion, le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase, ainsi que des molécules de faibles masses moléculaires telles que le tripeptide glutathion ou l'acide urique, ainsi que des endonucléases. L'autre source naturelle, qui provient de l'alimentation, telles que les vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinones, flavonoïdes, le glutathion ou l'acide lipoïque ou l'acide lipoïque. (Ghanimi *et al*.,2022). Outre ces substances naturelles et celles qui sont propres à l'organisme, les médicaments peuvent également fournir d'autres antioxydants. De nos jours, de nombreux médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéiniques, les ß-bloquants et les antihypertensifs ont été testés en raison de

leurs propriétés antioxydantes (Beani.,2022). Deux illustrations sont données : N-acétylcystéine et Probucol (Lurselle) (Mamo *et al*., 2018).

7.2 Système de défense antioxydant

Comme nous avons pu le constater auparavant, l'organisme dispose un système de défense à fin de combattre les possibles attaques des EROs générés et maintenir l'homéostasie cellulaire. Selon Ghanimi *et al*.,(2022), ce système comprend une variété d'antioxydants à la fois d'origine enzymatique et non-enzymatique.

7.2.1 Système de défense enzymatique

Dans cette classe des antioxydants on retrouve les enzymes ; catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx), superoxyde dismutase (SOD) et thiorédoxines (Gheddouchi *et al*.,2015).

- **La catalase (CAT)** : présente une des lignes de défense antioxydante les plus puissantes vis-à-vis le stress oxydant. La catalase est une enzyme tétramérique à fer (Fe^{2+}) constituée de quatre chaînes polypeptidiques identiques, se retrouve principalement au sein des peroxysomes, de réticulum endoplasmique et au cytoplasme des érythrocytes, des hépatocytes et des cellules rénales (Sepasi Tehrani *et al*.,2018).
- **Superoxyde dismutase (SOD) :** ils sont synthétisés par les cellules végétales et animales, la superoxyde dismutase ou SOD (Segregation of Duties) est une métalloprotéine constituée des chaines polypeptidiques associées à des ions métalliques, présente chez les mammifères sous 3 isoformes, catalysant toutes la même réaction, qui diffèrent par l'ion métallique qui l'associé, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire ainsi on distingue : la CuZn-SOD_1 présente dans le cytoplasme, les microsomes, le noyau et l'espace inter-membranaire mitochondriale, la Mn-SOD_2 et la CuZn-SOD_3 présente essentiellement dans la mitochondrie et dans la matrice extracellulaire respectivement **(**Gheddouchi *et al*.,2015**)**.
- **Glutathion peroxydase (GPx)** : est une sélénoprotéine ubiquitaire formée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé sous forme de sélénocystéine. Présente sous cinq isoformes, localisés principalement dans le milieu extracellulaire, le cytoplasme et la mitochondrie (Pei *et al*.,2023). Elle assure la réduction des peroxydes par oxydation de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH) en GSSG qui sera réduit par la suite par la glutathion réductase (GR) (Pei *et al*.,2023).

- **Les thiorédoxines** : le maintien de l'état réduit des protéines intracellulaires est assurée par le système antioxydant de thiorédoxine et qui sera renouvelée par les NADPH sous action de l'enzyme de thiorédoxine réductase (TrxR) qui intervient dans la transformation du radical ascorby en acide ascorbique ainsi que la dégradation du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques (Vignols.,2016).

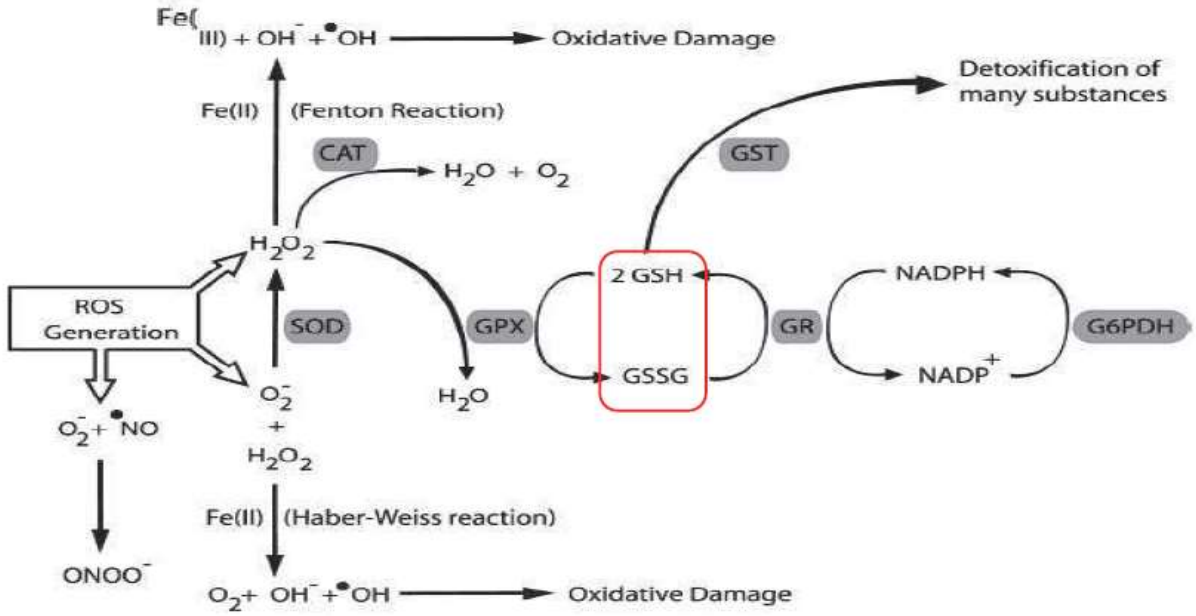


Figure 11 : Principales enzymes antioxydantes (Vignols.,2016)

7.2.2 Système non-enzymatique

L'arsenal de défense non-enzymatique comprend la vitamine E (α et γ- tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), les caroténoïdes et les polyphénols (Cabral *et al*.,2021).

- **Vitamine E** : est une molécule liposoluble vitaminée recouvrant 4 tocophérols et 4 tocotriénols. Cet antioxydant possède la capacité protectrice des structures membranaires et des lipoprotéines en arrêtant la peroxydation lipidique, piégeage des radicaux péroxyles (ROO˙) et le radical hydroxyle (OH˙) en formant un radical tocophéryle (α-Toc˙) et prévient l'apparition d'hydropéroxydes en piégeant les radicaux LOO˙ (Szewczyk *et al*.,2021). La vitamine E présente essentiellement dans les germes de blé, les huiles végétales et les fruits à feuilles vertes (Ramya *et al*.,2024).
- **Vitamine C (acide ascorbique)** : est une molécule hydrosoluble de par leur implication dans le piégeage des anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et l'hypochlorite, mais également en tant que inhibiteur de la peroxydation lipidique, régénérateur de la vitamine E à partir des formes radicalaires issues de ses interactions avec les radicaux lipidiques ainsi qu'un agent protecteur des macromolécules membranaires contre les conséquences

néfastes du stress oxydant (Ngo *et al*.,2019). Chez la plupart des mammifères la vitamine C a une origine hépatique et rénale, contrairement à l'Homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via les fruits et les légumes connus riches en Vitamine C (Ngo *et al*.,2019).

- **Caroténoïdes :** on dénombre plus de 600 caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire insaturée, polyénique ($C_{40}H_{56}$). Les caroténoïdes sont des pigments issus de fruits et légumes de couleur rouge et orange, son chef de famille est le β-carotène ou la provitamine A contenu majoritairement dans le melon, l'abricot, la carotte, les épinards et les laitues (Gulcin.,2020). Leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piégés les radicaux péroxyles, l'oxygène singulet et les alkyles par des mécanismes de transfert électroniques et protoniques (Gulcin.,2020).
- **Polyphénols** forment une vaste catégories des antioxydants très diversifié très variés et très importants, présents dans les agrumes sous forme des flavonoïdes et dans les fruits rouges sous forme d'anthocyanine (Eva *et al*., 2016).

Ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans l'organisme. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bons-mauvais (qui peuvent être les deux) (Eva *et al*., 2016). Parmi les polyphénols d'intérêts, nous pouvons citer les flavonoïdes, les tanins et les coumarines (Jomova *et al*.,2023).

8. Différentes utilisations des antioxydants

Ces dernières années, l'intérêt pour les antioxydants ne cesse de s'accroître. En effet, différents domaines industriels requirent son utilisation pour protéger ses produits de l'oxydation (Nouioura *et al*.,2023). Au secteur industriel les antioxydants ont des applications multiples, ils sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire soit comme ingrédient ou par l'utilisation des emballages contenant ces dernier a pour but de retarder le processus d'oxydation des aliments, le changement de goût de ces derniers, éviter le rancissement surtout des corps gras, et la stabilisation des denrées alimentaires (Pljsak *et al*.,2021). Dans le secteur d'industrie chimique, les antioxydants sont largement utilisés pour protéger les létaux de l'oxydation et le caoutchouc du durcissement. En teinturerie. Ils sont utilisés lors de la teinture pour éviter l'oxydation des colorants à cuivre ou les colorants à soufre. En médecine humain, les antioxydants sont utilisés dans le traitement de certaines pathologies à cause de ces capacités de piégeage des EROs qu'a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon produit à base de diosmine (Nouioura *et al*.,2023).

9. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

Diverses méthodes de mesure ont été développées permettant d'évaluer le potentiel antioxydant et antiradicalaire *in vitro* des nouveaux composés dans différentes conditions (Bouzian *et al*.,2020). Parmi les méthodes expérimentales les plus répandues la méthode DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle) et la méthode FRAP (Ferrique-TriPyridyltriazine) (Saroyo & Arifah.,2021).

9.1 Piégeage des radicaux libres (DPPH)

Le DPPH•, également connu sous le nom de (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), est un radical stable qui présente un électron non apparié dans sa structure électronique. Sa stabilité est due au déplacement des électrons π tout au long du radical. En solution, le DPPH forme un radical stable avec une teinte violette, avec une absorbance maximale à 517 nm, et qui se transforme en jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. Effectivement, lorsque ses couches électroniques sont saturées, il passe à une forme non radicalaire, ce qui entraîne la disparition de la coloration violette. La spectrométrie à 517 nm est utilisée pour surveiller ce changement de coloration (Saroyo & Arifah.,2020).

9.2 Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

Le FRAP, également appelé pouvoir antioxydant par réduction du fer, est une technique qui repose sur la réaction de réduction de l'ion ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium à l'ion ferreux (Fe^{+2}) par transfert électronique. Le changement de couleur du fer ferrique (Fe^{+3}) en bleu vert du fer ferreux (Fe^{+2}) est la manifestation de la réaction. Cette coloration est évaluée à l'aide de la spectrophotométrie à 700 nm. Selon Saroyo et Arifah (2020), une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel témoigne de l'augmentation du pouvoir réducteur.

Chapitre VI. Activité antimicrobienne

1. Introduction

L'émergence des maladies infectieuses demeure une des plus sérieuses menaces pesant sur la santé publique. Selon l'OMS ces maladies sont en augmentation dans le monde à cause de l'émergence des souches bactériennes et fongiques résistantes favorisées par le mauvais usage des agents antimicrobiens (antibiotiques et antifongiques) induisant un accroissement des taux de morbidité et de mortalité. Toutefois et si rien ne change, les maladies infectieuses pourraient redevenir une des principales causes de mortalité dans le monde d'ici 2050, en provoquant plus de 10 millions de décès (OMS.,2023).

Pour prévenir ce grave menace les individus recours vers d'autres alternatifs moins chers que les antibiotiques et plus sécurisés que celui-ci.

2. Contaminations biologiques

La contamination biologique désigne la contamination d'un compartiment par des bactéries pathogènes et de leurs spores, des moisissures, des virus, des parasites ou des levures. Ce compartiment ça peut être un aliment ou un corps d'un être vivant (Ouchar *et al*.,2021).

Plusieurs pathologies infectieuses humaines tels que ; les infections invasives à *S. aureus*, endocardite mitrale native, méningite, infections cutanées ainsi que les infections muqueuses et systémiques ont comme origines des bactéries tels que *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis* et des moisissures tels que *Candida albicans* et *Penicillium digitatum* (Khan *et al*.,2019).

3. Description des bactéries étudiées

3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ou *Staphylococcus* doré est une coccobactérie, appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*, d'environ 0,5 µm de diamètre, à coloration Gram positif, immobile, capsulée, non sporulante et productrice des entérotoxines staphylococciques (Léa *et al*.,2023).

En termes de pathogénicité, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène et opportuniste de la famille des Staphylococcaceae, provoque ainsi de pathologies diverses ; des infections cutanées, pneumonie, endocardite, ostéomyélite, arthrite infectieuse, infections nosocomiales (David & Da.,2017) et ça peut arriver à certains cancers de la peau, du sein et hépatique (Yuanna, *et al*.,2022). Ces dernières sont alors traitées par des traitements à base d'antibiotiques tels que l'amoxicilline, ofloraxine, doxocycline et la méthicilline (David & Da.,2017).

3.2 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus est une coccobactérie saprotrophe, faisant partie de la famille des *Micrococcaceae*, de 0,5 à 2 µm de diamètre, immobile, non sporulante à coloration Gram positif et disposée en amas irréguliers ou en tétrades (Erbasan.,2018). En termes de pathogénicité, *Micrococcus luteus* est considéré comme un pathogène opportuniste, chez les personnes immunodéprimées, pouvant être responsable d'infections nosocomiales et cutanées en milieu hospitalier, d'arthrite septique, de pneumonie, d'endocardites et d'abcès intracrâniens (Ospina *et al*.,2017). Relativement sensible à la plupart des antibiotiques, les infections associées à la *Micrococcus luteus* sont alors traitées par des d'antibiotiques tels que la vancomycine, la pénicilline et la clindamycine (Fang *et al*.,2018).

3.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une rhizobactérie ubiquitaire sa largeur fluctue de 0,5 à 2 µm et sa longueur de 2 à 4 µg, faisant partie de la famille des *Bacillaceae*, sporifère, mobile grâce à des ciliatures péritriches, à coloration Gram positif et disposée en bâtonnets droits à bout arrondis (Mutuku *et al*.,2022). En termes de pathogénicité, *Bacillus subtilis* n'été pas considérée pathogène pour l'Homme seule de rares cas d'infection du système nerveux central ont été rapportés sous forme de méningite à pyogène induites le plus souvent par voie iatrogène ou par traumatisme (Eclercq.,2019), chez les personnes immunodéprimées *Bacillus subtilis* peut être l'origine, à cause de ses enzymes protéolytiques, de la pneumopathie d'hypersensibilité (Kumar *et al*.,2019).

4. Description des champignons étudiés

4.1 *Candida albicans*

Candida albicans est un champignon levuriforme cosmopolite, aérobie, appartient à la flore commensale des individus sains, de 3 à 15 µm de diamètre, non pigmentée, non capsulée et polymorphe ainsi on peut rencontrer trois aspects morphologiques (forme mycélium vrai, pseudomycélium et forme blastospore) (Naglik *et al*.,2019).

En termes de pathogénicité, *Candida albicans* pouvant provoquer des infections fongiques diverses. Toutefois, la candidose est une de ces infections induites par la dite espèce et qui choisit comme hôte les muqueuses digestives, vaginales et gynécologiques et qui peuvent être une des causes majeures de mortalité chez les personnes immunodéprimés comme les patients atteints le cancer sous chimiothérapie ou tout traitement conventionnel (Naglik *et al*.,2019).

4.2 *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum est une espèce fongique microscopique pathogène, mésophiles peut croitre entre 5 et 37 °C et à un pH de 3 à 4,5, faisant partie de la famille de *Trichocomacea.* Pousse au niveau du sol, les épices, les céréales, les fruits et sur les végétaux en décomposition. *Penicillium digitatum* affecte principalement les agrumes, les oranges et les citrons, on provoquant sa pourriture. L'ingestion accidentelle des agrumes infectés par cette espèce peut se manifester par des troubles gastro-intestinaux, diarrhée, nausées et des maux d'estomac (Solaimani *et al*.,2009).

5. Traitements conventionnels

La thérapeutique des infections microbiennes est basée essentiellement sur l'utilisation des agents antimicrobiens : les antiparasitaires, antiviraux, antibiotiques et antifongiques qui sont susceptibles soit de détruire ou de diminuer la multiplication des microorganismes sans endommager les tissus de l'organisme (Couic-Marinier.,2023).

Depuis les années soixante-dix les antibiotiques prennent une place importante dans le secteur pharmaceutique et industriel, ces derniers sont utilisés pour combattre les infections d'origine bactériennes on agissant soit sur la paroi bactérienne, sur la membrane cytoplasmique ou sur une des étapes de synthèse des protéines et des acides nucléiques. Ils sont classés suivant leur origine en antibiotiques synthétiques, semi synthétiques et naturels et suivant leur action, en antibiotiques bactériostatiques ou bactéricides. Sont classés en plusieurs familles ainsi on distingue la famille des béta-lactamines, des aminosides, des cyclines, des phénicols, des macrolides et apprentés, des quinolones, des nitrofuranes, des polypeptides (Alaoui Mdarhri *et al*.,2023). Durant ces dernières décennies l'incidence des mycoses opportunistes est en augmentation très nette due essentiellement aux thérapeutiques immunosuppressive et anticancéreuses. Pour faire face à ces mycoses plusieurs classes des antifongiques sont disponibles sur le marché pharmaceutique ainsi on distingue les polyènes (amphotéricine B et A), les triazoles (fluconazole, voriconazole et isavuconale), les échinocandines (caspofungine, anidulafungine et micafungine) et la flucytosine (Messias Rodrigues *et al*.,2022).

Malgré le développement du marché des agents antimicrobiens, l'émergence de la résistance des bactéries aux antibiotiques et des champignons microscopiques aux antifongiques représente une grave menace pour la santé publique ainsi que pour l'économie (Stocker *et al*.,2023). Pour lutter contre cette menace la recherche et développement s'orientent aux nouveaux agents antimicrobiens afin d'arrêter le problème de l'émergence de la résistance microbienne.

6. Antimicrobiens d'origine végétale

L'augmentation alarmante d'incidence des infections avec les micro-organismes résistantes et la création des souches bactériennes mutantes suscitent la recherche des substances naturelles ayant des propriétés antimicrobiennes. Les plantes médicinales constituent un immense réservoir de composés ayant ces propriétés.

Les alternatives des antibiotiques ont été développées, à partir des plantes médicinales (extraits et huiles essentielles) pour renforcer le système immunitaire, inhiber la croissance des bactéries et éviter la création des bactéries résistantes (Livorsi *et al*.,2015).

Les huiles essentielles ou certaines molécules de leurs constituants ont une puissante activité contre les bactéries (Al-Azzawi *et al*.,2021). À titre d'exemple, le thymol, une molécule purifier à partir d'huile essentielle de Thymus (*Thymus algeriensis, Thymus vulgaris*) est utilisé dans quelques désinfectants commerciaux (Ben Ouaghrem *et al*.,2022), le carvacrol retrouvé dans l'huile essentielle d'origan (*Origan heracleoticum*) et l'eugénol retrouvé dans l'huile essentielle du clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*) (Al-Azzawi *et al*.,2021).

Certaines molécules retrouvées dans les extraits des plantes tels que la berberine, les terpènes, les terpénoïdes (Yu *et al*.,2022) et les saponines sont réputés pour une forte activité antifongique vis-à-vis une large gamme des champignons microscopiques pathogènes pour l'Homme (Francis *et al*.,2002). Il existe actuellement deux médicaments antifongiques humains sur le marché pharmaceutique dont l'origine 100% naturelle : l'amphotéricine B et la nystatine. De même, aucun médicament antifongique d'origine végétal n'existe dans l'arsenal thérapeutique antifongique actuel (Cavassin *et al*., 2021).



PARTIE II
MATÉRIEL & MÉTHODES



« L'effort n'est pas un combat avec le destin, parce que
c'est le Destin lui-même qui nous a imposé cet effort »
Jalâl al-Dîn Rûmî

Chapitre I. Etude ethnobotanique

1. Etude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des cancers dans la ville de Casablanca

L'étude ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement des cancers a été réalisée auprès de la population de Casablanca, a pour objectif de contribuer à la valorisation et la conservation du savoir éthnomédicinal accumulé durant des siècles et acquise par la population locale de cette ville du Maroc.

2. Zone d'étude

La ville de Casablanca, est la capitale économique du royaume et un de ses principaux pôles d'activité agricole (Cohen & Eleb .,2019), appartient au domaine de la plaine de Chaouia, elle est située dans le centre-Ouest du Maroc, face à l'océan Atlantique, délimitée au Nord par la province de Ben Slimane, à l'est et au Sud par la province de Settat, couvre une superficie de 1140.54 km² dont 227.82 km² urbanisée et 70 km² de littoral. Située à environ 90 Km de Rabat.

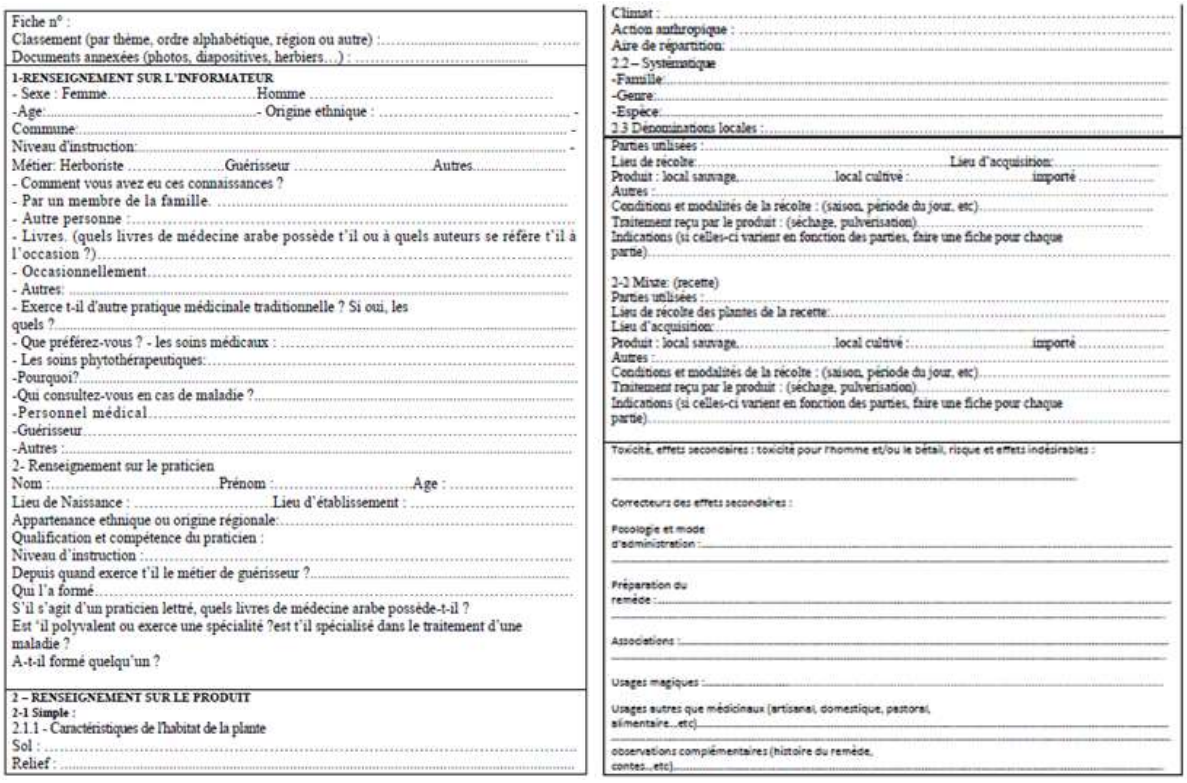
Le climat de la ville de Casablanca est de type océanique, soumis à l'influence maritime, caractérisé par une pluviométrie variable d'un an à l'autre, souvent modérée et irrégulière en hiver avec une petite douceur. En été la zone est tempérée, humide avec un taux d'humidité élevé et un ensoleillement exceptionnel durant toute l'année (IRHUAE du Grande Casablanca., 2010).

Les reliefs de Casablanca sont composés essentiellement de plaines et de plateaux avec des petites collines dispersées dans le territoire contigu, les forêts occupent près de 4000 ha dont les principales étendues forestières sont celles de Bouskoura (3000 ha), de l'oued Maleh (340ha) et de l'oued N'fifikh (270 ha) qui se composent principalement d'Eucalyptus, de pins et de palmiers. Le sol de Casablanca est diversifié, dans la partie rurale il est de nature Tirs alors qu'à la partie littorale il est de nature sableuse (IRHUAE du Grande Casablanca., 2010).

3. Fiche questionnaire

Pour identifier les plantes utilisées contre les cancers, 299 fiches questionnaires qu'ont été préparées et rectifiées à fin d'avoir une vue d'ensemble sur le potentiel d'utilisation traditionnelle locale des plantes médicinales. Le questionnaire divisé en deux parties a servi de support de l'enquête. La première section contenait des renseignements personnels sur les informateurs tels que l'âge, le sexe, l'origine et le niveau d'étude. La seconde partie était consacrée aux plantes et aux informations concernant la partie utilisée, le mode

d'administration et de préparation, la quantité administrée et la durée de traitement. L'information a été obtenue verbalement de chaque informateur après consentement éclairé. Les informations recueillies et notées sur les fiches de questionnaire (figure 12) ont été ensuite saisies sur une base de donné (Excel) afin d'analysées statistiquement et obtenir des résultats standardisés portants sur la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par la population selon l'âge, le sexe, le niveau d'instruction, le soin préférer, les parties utilisées de chaque plante, les modes de préparation des remèdes ainsi que leurs voies d'administration ainsi les noms des plantes citées ont été enregistrés dans la langue arabe dialectale utilisée par ces informateurs puis identifiées en utilisant «PI@ntUse»



Fiche n° :
Classement (par thème, ordre alphabétique, région ou autre) :
Documents annexées (photos, diapositives, herbiers…) :

1-RENSEIGNEMENT SUR L'INFORMATEUR
- Sexe : Femme Homme
-Age: - Origine ethnique :
Commune:
Niveau d'instruction:
Métier: Herboriste Guérisseur Autres
- Comment vous avez eu ces connaissances ?
- Par un membre de la famille.
- Autre personne :
- Livres. (quels livres de médecine arabe possède t'il ou à quels auteurs se réfère t'il à l'occasion ?)
- Occasionnellement
- Autres:
- Exerce t-il d'autre pratique médicinale traditionnelle ? Si oui, les quels ?
- Que préférez-vous ? - les soins médicaux :
- Les soins phytothérapeutiques:
-Pourquoi?
-Qui consultez-vous en cas de maladie ?
-Personnel médical
-Guérisseur
-Autres :
2- Renseignement sur le praticien
Nom : Prénom : Age :
Lieu de Naissance : Lieu d'établissement :
Appartenance ethnique ou origine régionale:
Qualification et compétence du praticien :
Niveau d'instruction :
Depuis quand exerce t'il le métier de guérisseur ?
Qui l'a formé
S'il s'agit d'un praticien lettré, quels livres de médecine arabe possède-t-il ?
Est 'il polyvalent ou exerce une spécialité ?est t'il spécialisé dans le traitement d'une maladie ?
A-t-il formé quelqu'un ?

2 – RENSEIGNEMENT SUR LE PRODUIT
2-1 Simple :
2.1.1 - Caractéristiques de l'habitat de la plante
Sol :
Relief :

Climat :
Action anthropique :
Aire de répartition:
2.2 – Systematique
-Famille:
-Genre:
-Espèce:
2.3 Dénominations locales :

Parties utilisées :
Lieu de recolte: Lieu d'acquisition:
Produit : local sauvage, local cultivé : importé
Autres :
Conditions et modalités de la récolte : (saison, période du jour, etc)
Traitement reçu par le produit : (séchage, pulverisation)
Indications (si celles-ci varient en fonction des parties, faire une fiche pour chaque partie)

2-2 Mixte: (recette)
Parties utilisées :
Lieu de recolte des plantes de la recette:
Lieu d'acquisition:
Produit : local sauvage, local cultivé : importé
Autres :
Conditions et modalités de la récolte : (saison, période du jour, etc)
Traitement reçu par le produit : (séchage, pulverisation)
Indications (si celles-ci varient en fonction des parties, faire une fiche pour chaque partie)

Toxicité, effets secondaires : toxicité pour l'homme et/ou le bétail, risque et effets indésirables :
Correcteurs des effets secondaires :
Posologie et mode d'administration :
Préparation du remède :
Associations :
Usages magiques :
Usages autres que médicinaux (artisanal, domestique, pastoral, alimentaire…etc)
observations complémentaires (histoire du remède, contes…etc)

Figure 12 : Fiche questionnaire utilisée lors de l'enquête ethnobotanique

4. Matériel végétal

Les deux plantes étudiées dans ces travaux de thèse ont été choisies sur la base des résultats de l'enquête ethnopharmacologique réalisée et d'une recherche bibliographique. Nous avons sélectionné *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut et *Artemisia herba-alba* Asso pour mener les travaux expérimentaux. La monographie de ces plantes est mentionnée dans la partie bibliographique.

a. *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut

La partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *Thymus algeriensis* a été récoltée au stade de floraison, avant le lever du soleil au mois de Mars, dans la région d'Imizar-Azilal (31°5°N6°34'O) (grand Atlas du Maroc). L'identification botanique de la plante récoltée a été effectuée par Pr Bari Amina et un échantillon est disponible à l'herbier de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès sous le numéro BPRN76.



Figure 13 : Échantillon de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut fraiche et séché utilisé dans l'hydrodistillation

b. *Artemisia herba-alba* Asso

La partie aérienne de la plante *A.herba-alba* Asso a été récoltée en printemps au stade de floraison, avant le lever du soleil dans la région d'Imizar-Azilal (31°5°N6°34'O) (grand Atlas du Maroc). L'identification botanique de la plante récoltée a été effectuée par Pr Bri Amina. Un échantillon de la dite plante a été déposé à l'herbier de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, sous le numéro BPRN16.



Figure 14 : Échantillon d'*Artemisia herba-alba* Asso fraiche et séché utilisé dans d'hydrodistillation

Chapitre II. Caractérisation phytochimique

1. Hydrodistillation

Les plantes récoltées ont été séchées loin du soleil, à une température ambiante. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les distillations ont été réalisées pendant deux heures de 100g de matériel végétal avec 1 litre d'eau dans un ballon de deux litres surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Les rendements de ces distillations ont été calculés par rapport à la matière végétale séchée pendant quarante-huit heures à l'étuve à 35C° (Gavahian & Farahnaky.,2018). Les huiles essentielles obtenues ont été stockés à une température de 4C° en présence de sulfate de sodium anhydre à l'obscurité pour l'analyse chimique et les tests biologiques.



Figure 15 : Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

2. Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (GC-MS)

L'identification de la composition chimique de nos huiles essentielles a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Cette dernière été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type *Trace GC ULTRA,* équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5 % diphenyl, 95 % dimethylpolysiloxane) de 30m de longueur, 0.25 mm de diamètre et 0.25 µm d'épaisseur du film ainsi qu'un injecteur en mode *split-splitless* avec une température de 250 C°. Le détecteur est de type FID (température de 250 °C) alimenté par un mélange de gaz hélium–air. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1,4 ml/min. La température de la colonne été programmée pour 4 °C/min de 50 à 200 °C et un palier de 5 minutes à la température finale. Le couplage avec le

spectromètre de masse *Polaris Q MS* ce fait avec une température d'interface de 300C° (Tsikas & Zoerner.,2014).

La base de données utilisée de type : NIST MS Search 98.

L'identification des composés de chaque huile essentielle est basée sur leur spectre de masse obtenu par chromatographie en phase couplée à la spectrométrie de masse gazeuse et leur indice de Kovats (IK) (Matyushin *et al.*,2021). En effet, le système d'indice compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire. Par définition, il attribue un indice de 800 a l'alcane linéaire en C8 (n-octane), 1 000 alcane linéaire en C10 (n-décane), et ce, quels que soient la phase stationnaire, la longueur de la colonne et le débit ou la température. L'IK est déterminé en injectant un mélange des alcanes de C9 à C24 dans les mêmes conditions opératoires que l'huile essentielle. Il est indépendant du débit, de la quantité injectée, il ne dépend que de la phase stationnaire et de la température (Matyushin.,2020). Il est calculé par la relation suivante :

$$\mathrm{IK} = \left[\frac{\mathrm{TRx} - \mathrm{TRn}}{\mathrm{TRn} + 1 - \mathrm{TRn}} + \mathrm{n}\right] \times 100$$

Avec :

TRx : le temps de rétention du produit *x*

TRn + 1 et *TRn* sont les temps de rétention des alcanes linéaires à *n* + 1 et à atomes de carbones et qui encadrent le pic des produits.

Chapitre III. Etude toxicologique

1. Toxicité aiguë selon l'OCDE n° 423

La toxicité orale aiguë a été testée en utilisant une approche adaptée des lignes directrices des tests n° 423 (Manda *et al*.,2017). Un gavage aigu a été réalisé à l'aide d'une sonde intragastrique à des souris de deux mois. Les souris ont été divisées en quatre groupes de cinq souris chacun. Les groupes ont été traités par voie orale avec les huiles essentielles uniques et combiné de *Thymus algeriensis* et d'*Artemisia herba-alba* à une dose de 150 mg/Kg ainsi qu'un groupe témoin traité par l'huile d'olive. Le comportement des souris a été observé et leur poids était mesuré quotidiennement. Les observations ont porté sur l'apparence générale, la mobilité, la sensibilité au bruit, à l'alimentation, à l'apparition de selles et à la mortalité. Après 14 jours, le traitement terminé, et les animaux furent sacrifiés. Un échantillon de sang a été obtenu pour chaque souris en utilisant un tube hépariné pour doser les paramètres : ASAT, ALAT, créatinine et urée. Ensuite, le foie, les reins et la rate ont été prélevés et pesés pour évaluer leurs poids relatif (OCDE.,2021).

Après la réalisation des études phytochimiques et la détermination des composés majoritaires de chaque huile essentielle on a suivre le même protocole d'écrit précédemment dans l'évaluation de la toxicité de thymol, chrysanthenone et de sa mixture à une dose de 150mg/kg avec un groupe contrôle recevant de l'éthanol (150 ml/kg).

2. Toxicité subaiguë selon l'OCDE n° 407

L'étude de la toxicité subaiguë a suivi les recommandations de l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) ligne directrice 407. Des souris des deux sexes ont été divisé en deux groupes (n=5/groupe), les souris du premier groupe ont reçu un traitement oral d'un mélange d'huiles essentielles (*T. algeriensis* et *A. herba-alba*) à une dose de 150 mg/Kg/jour (ratio 1/1) et les souris témoins de deuxième groupe ont reçu l'huile d'olive pendant 28 jours. Les signes et symptômes de toxicité étaient observés tout au long du traitement, et le poids corporel était mesuré chaque semaine pendant 28 jours. À la fin du test, toutes les souris ont été euthanasiées et les échantillons du sang et d'organes ont été collectés. L'euthanasie est réalisée par injection intrapéritonéale de l'agent anesthésique : uréthane-xylane à 10% (Manda *et al*.,2017).

Le foie, les reins et la rate ont été pesés, excisés et examiné au microscope photonique. Le poids relatif de chaque organe prélevé a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Poids relatif des organe (\%)} = \frac{\text{Poids des organes}}{\text{poids corporel}} \text{x100}$$

Ce protocole a été suivre pour évaluer la toxicité de la mixture de thymol et de chrysanthenone à une dose de 150mg/kg avec un groupe contrôle recevant de l'éthanol (150 ml/kg).

- **Paramètres biochimiques**

Les tubes contenant les échantillons de sang ont été centrifugés à 2500 tr/min pendant 15min. Ensuite, le sérum a été collecté pour doser les quatre paramètres biochimiques ; à savoir : la créatinine, l'urée et les enzymes hépatiques (ASAT et ALAT), la créatinine a été dosée par la méthode Jaffé qu'est basée sur la réaction chimique entre le picrate et la créatinine en milieu alcalin suite à laquelle se forme le complexe picrate-créatinine avec une coloration rouge-orangée dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm (Cheesbrough.,1991). La teneur en urée a été mesurée par la méthode colorimétrique utilisant la diacétyle monoxime et en présence de thiosemicarbazide, En milieu acide et à chaud, il se condense avec le diacétyle monoxime, créant ainsi un produit de condensation rose dont l'intensité est quantifiable par spectrophotométrie à 520 nm. (Michel.,1971) et les enzymes hépatiques ont été dosées par la méthode colorimétrique de Reitman et Frankel .

3. Hépatotoxicité

Le mélange des deux huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A. herba-alba* (ratio1/1) à la dose de 150mg/kg a été dissout dans l'huile d'olive ainsi que le mélange de thymol/chrysanthenone (ratio1/1) qu'a été dissout dans l'éthanol à la même dose avant d'être administré à des souris par gavage. Parallèlement, les souris ont jeûné toute la nuit pendant 16 heures avant l'administration par voie intrapéritonéale de tétrachlorure de carbone qu'a était préparé dans l'huile d'olive (véhicule). Ensuite, les souris ont été divisés en six groupes expérimentaux égaux (n=6/groupe), les deux premiers groupes ont été sélectionnés pour être traités avec l'éthanol (groupe 1) et le mélange des deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* à la dose de 150mg/Kg (groupe 2) respectivement, le troisième groupe a reçu le mélange de thymol/chrysanthenone à une dose de 150mg/kg (groupe 3) et le quatrième groupe a reçu 40% de CCl_4/huile d'olive (1ml/Kg de poids corporel deux fois par semaine) par voie intrapéritonéale pendant 8 semaines pour induire des lésions hépatiques chroniques. En plus de l'administration de CCl_4, les deux groupes expérimentaux (groupe 5 et 6) ont été traités simultanément par voie orale, 4 jours par semaine pendant 8 semaine avec le mélange des deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* à la dose de 150mg/Kg et le mélange de thymol/chrysanthenone à une dose de 150mg/kg respectivement (Chang *et al*.,2011).

Chapitre IV. Cytotoxicité

1. Lignées cellulaires utilisées

Trois lignées cellulaires cancéreuses ont été sélectionnées pour évaluer le pouvoir cytotoxique de nos huiles essentielles et nos molécules y incluse MCF-7 (Metastatic adenocarcinoma Michigan Cancer Foundation-7), MDA-MB-231 (M.D Anderson-Metastatic Breast 231) et Hep-G2 (Liver Human Hepatocellular Carcinoma cell line).

- **Cellules MCF-7** :

La lignée cellulaire MCF-7 (ATCC HTB-22) a été établie à partir d'un adénocarcinome mammaire métastasique. La lignée MCF-7 possède des récepteurs fonctionnels aux œstrogènes et à l'EGF, hormono-dépendante et non-invasive (Rouillé *et al*.,2019). Cette lignée a été fournie par le Dr. L'Houcine Ouafik (Laboratoire du Transfert Oncologique, Marseille-France).

- **Cellules MDA-MB-231** :

MDA-MB-213 (ATTC HTB-26), est une lignée cellulaire cancéreuse mammaire résistante au traitement chimiothérapeutique cancéreux classique a été établie à partir d'un cancer du sein triple négatif, peu différencié et très invasif (Razzak *et al*.,2019). Cette lignée a été fournie par le Dr. L'Houcine Ouafik (Laboratoire du Transfert Oncologique, Marseille-France).

- **Cellules Hep-G2** :

Hep-G2 (ATTC HTB-8065), est une lignée cellulaire cancéreuse hépatique humaine non tumorigène et immortalisante, il a été établie à partir d'un carcinome hépatocellulaire. Présentant des taux de prolifération élevés. Elle est souvent utilisée comme modèle pour l'étude de la toxicité des médicaments et de cytotoxicité (Ruel *et al*.,2014). Cette lignée a été fournie par le Dr. L'Houcine Ouafik (Laboratoire du Transfert Oncologique, Marseille-France).

2. Traitement utilisé

➢ Entretien des cellules

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture approprié à chaque lignée cellulaire. Les cellules Hep-G2 et MDA-MB-231 sont cultivées en présence de DMEM *(GIBCO)* alors que les cellules MCF-7 sont cultivées en présence de RPMI *(GIBCO)*. Les manipulations sont effectuées d'une manière stérile sous une hotte à flux laminaire vertical. Les deux milieux de culture sont complémentés chacun par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (GIBCO), 1% de

glutamine *(GIBCO)* et 1% d'antibiotique (streptomycine). Les cellules sont maintenues à une atmosphère humide avec un taux d'humidité atteint 95%, 5% de CO_2 et à une température de 37°C (Scarcello *et al*.,2020). Les cellules sont cultivées en monocouches, après trois jours les cellules sont observées au microscope inversé à contraste de phase. Lorsqu'elles arrivent à une croissance subconfluente, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS. À l'aide de 500 µl de trypsine/EDTA (Invetrogen) les cellules sont détachées durant 5 minutes à 37 °C et reprises dans un milieu de culture neuf. Les cellules sont énumérées à l'aide d'un hématimètre de Malassez. La viabilité est estimée par la méthode colorimétrique utilisant la technique WST1 (Water-soluble Tetrazolium salt 1) (Scarcello *et al*.,2020).

- **Viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire a été estimée par la capacité des cellules vivantes à exclure les molécules de haut poids moléculaire. Nous avons effectué un test de bleu de trypan (Sigma-Aldrich). Le bleu de trypan (0.4% PBS) est ajouté à la suspension cellulaire. La numération est effectuée à l'aide d'un hématimètre de Malassez. Les cellules vivantes excluent le bleu de trypan à l'extérieures alors qu'il pénètre au cytoplasme des cellules mortes. Les cellules vivantes après observation par microscope optique apparaissent incolores alors que les cellules mortes apparaissent bleues (Almutary & Sanderson.,2018).

- **Conservation des cellules**

Après l'estimation de sa viabilité, les cellules en phase exponentielle de croissance sont détachées par la trypsine/EDTA puis lavées par le PBS et centrifugées pendant 15 min à 2000 rpm à 4°C. 1.10^6 des cellules obtenues du culot sont rajoutées à un milieu froid contenant : 10% de DMSO stérile, 20% de SVF additionnées de MEM. La suspension cellulaire est répartir dans des cryotubes de 1 ml, après une chaine de refroidissement progressive, les cryotubes sont stockés dans l'azote liquide pour une éventuelle utilisation (Almutary & Sanderson.,2018).

- **Test WST-1**

Dans le cadre de la recherche de nouvelles drogues anticancéreuses, la méthode la plus adaptées pour la mesure de la viabilité cellulaire est celle utilisant les sels de tétrazolium hydrosoluble 1. Pour cette étude nous avons utilisées la méthode WST 1 (disodium mono {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazol]-3-ium-5-yl] benzene-1.3-disulfonate}) (Roche Applied Science), méthode colorimétrique appliquée pour la quantification des

cellules en prolifération (Van Tonder & Cromarty .,2015). L'absorbance sera quantifiée par un lecteur de multiplaques de type Wallac Victor X à 450nm.

-Evaluation de la cytotoxicité *in vitro*

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 96 puits avec une densité de 8000 cellules /puit, puis incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, les huiles ont testé ainsi que son mélange (ratio 1/1) sont déposés à différentes concentrations en duplicate dans les puits, la même chose pour le thymol, chrysanthenone et le mélange thymol/chrysanthenone, les concentrations allant de 6.25 à 50ug/ml. Les plaques sont ensuite incubées pendant 72h à 37°C. Après incubation 100ul du milieu de culture ont été aspirés et 10ul de réactif wst1 ont été ajoutés dans chaque puit et la plaque a été ré-incubée pendant 4h (Almutary & Sanderson.,2018). L'absorbance est déterminée dans un lecteur de multiplaques de type Wallac Victor X à 450nm. Dans ces tests, le milieu de culture sans huile essentielle, sans molécules et sans Mitomycin C est considéré comme contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité entre les cellules traitées et les cellules non-traitées selon la formule suivante :

$$\%IC= (1-(T/C) \times 100$$

Avec

T : Moyenne des densités optiques des cellules traitées

C : Moyenne des densités optiques des cellules non-traitées (contrôle)

Chapitre V. Activités anti-inflammatoire et analgésique

1. Etude du test anti-inflammatoire *in vivo*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de nos échantillons des huiles essentielles et de molécules a été testée selon la méthode de Winter **(**Cinelli *et al*.,2019**)**. Les rats ont été répartis au hasard en 7 lots, contient chacun 5 rats. Les deux premiers lots recevant chacun par voie orale l'huile essentielle de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* respectivement à une dose de 150mg/Kg, deux autres lots recevant le thymol et le chrysanthenone à une dose de 150mg/kg, les deux derniers lots ont reçus la mixture équivoque des deux huiles essentielles décrits précédemment et le mélange thymol/chrysanthenone à une dose de 150mg/Kg et le lot restant, sert un control positif, a reçu le Diclofénac 1%, qu'est un anti-inflammatoire de référence, une heure avant l'injection de la carragénine 1% (NaCl 0.9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. Les mesures des volumes de la patte postérieure droite de chaque rat ont été effectuées avant l'induction de l'œdème et au bout de chaque heure à partir de la troisième heure jusqu'à la sixième heure après et l'injection de la carragénine. Le Diclofénac 1% été utilisé par voie orale comme anti-inflammatoire de référence. Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = ((S_t\text{-}S_0)\ \text{Control} - (S_t\text{-}S_0)\ \text{Traité})/\ ((S_t\text{-}S_0)\ \text{Control}) \times 100$$

Avec

S_0= circonférence avant injection de la carragénine

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

2. Etude du test analgésique *in vivo*

Le pouvoir analgésique de nos huiles essentielles et nos molécules a été évalué suivant le nombre de contorsions abdominales induites par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique (0.7 %) (Test de torsion). Des lots de 5 rats ont été constitués. Les trois premiers lots ont reçus les huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* ainsi que la mixture (ratio 1/1) à une dose de 150mg/Kg chacun, trois autres lots ont reçus le thymol, chrysanthenone et le mélange thymol/chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg et le dernier lot, sert un control positif, a reçu le Sodium salicylate qu'est un antalgique de référence. Une heure et demie après l'administration des huiles essentielles, les rats ont reçu par voie intrapéritonéale l'acide acétique 0.7% à la dose de 10 ml/kg. Cinq minutes (temps de latence) après l'injection de

l’acide acétique, le nombre de contorsion a été compté pour chaque rat durant 30 min suivantes (Guedes *et al.*,2012).

Chapitre VI. Activités antioxydante et antimicrobienne

1. Etude antioxydante

1.1 Piégeage des radicaux libres (DPPH)

L'activité de relargage des radicaux DPPH (Sigma-Aldrich) des huiles essentielles et des molécules a été évaluée comme d'écrit par (Gulcin & Alwasel.,2023). La réaction est réalisée dans un volume total de 2ml contenant 0.4ml de DPPH (0.004% (w/v)) solubilisé dans le méthanol. Les huiles essentielles ainsi que les molécules ont été dissoutes dans le méthanol absolu à raison de 1.25µl/ml (solution mère), ensuite une série des dilutions est réalisée pour obtenir des concentrations finales de 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% et 0.1%. Le contrôle positif a été préparé avec le BHT et avec les mêmes concentrations précédentes, contre un blanc préparé par le méthanol absolu seul. Pour chaque concentration le test est répété trois fois, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 517nm après incubation de 30min à l'obscurité.

L'activité antioxydante est représentée en termes de pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$\mathrm{AA\%} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \text{x } 100$$

Avec

AA (%) : Pourcentage d'activité antioxydante

Abs control : absorbance de la solution des molécules à tester en présence du DPPH•

Abs sample : absorbance de la solution contenant uniquement la solution de DPPH•

1.2 Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

L'analyse spectrophotométrique du pouvoir réducteur des huiles essentielles et des molécules a réduits l'ion ferrique a été effectuée par l'approche élaborée par Lu *et al*., (2022). Trois millilitre du réactif FRAP préparé est mélangé avec 100 µl d'échantillon dilué ; l'absorbance à 593 nm est enregistré après une incubation de 30 min à 37°C. Les valeurs du FRAP peuvent être obtenues en comparant le changement de l'absorbance dans le mélange d'essai avec ceux obtenus en augmentant les concentrations de Fe^{3+} et exprimées en mM d'équivalents de Fe^{2+}. Un millilitre de chaque échantillon d'huile essentielle et de molécule dilue à différentes concentration dans le méthanol absolu, mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH : 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %, ensuite les tubes ont été incubés pendant 20min à 50C°, après refroidissement à température

ambiante 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA ; acide trichloracetic) à 10 % été ajouté dans chaque tube afin de stopper la réaction. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 tours/min pendant 10min, puis nous prélevons de chaque tube 2,5 ml du surnageant auxquels nous ajoutons 2,5 ml de méthanol absolu ainsi que 500 µl d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$, $6H_2O$) à 0,1 %. L'absorbance de la solution est mesurée à 700nm contre le blanc dans le spectrophotomètre UV. Le BHT est utilisé comme contrôle positif.

2. Test antimicrobien

2.1 Culture des souches microbiennes

Trois bactéries *Bacillus subtilis* (ATCC 4230) (Manassas, VA, USA) *Staphylococcus aureus* (ATTC43, 300) et *Micrococcus luteus* (ATTC 9314) et deux champignons *Penicillium expansum* et *Penicillium digitatum*, que l'on trouve couramment en milieu clinique et qui sont des cause majeures d'infections hospitalières, le syndrome de choc toxique et l'intoxication alimentaire, ces microorganismes ont été utilisés pour tester le potentiel antimicrobien des huiles essentielles et des molécules testées. Les bactéries ont été entretenues par repiquage sur Trypsine Soja Agar (TSA) pendant 24h à l'obscurité à 37°C. Les deux champignons appartiennent à la collection de la mycothèque. Ils ont cultivées sur le milieu nutritif PDA (*Potato Dextrose Agar*) pendant 7 jours à 25°C dans un endroit obscur.

2.2 Méthode de diffusion en puits sur gélose

Pour émulsionner les huiles essentielles, nous avons utilisé une solution d'agar à 0,2% et une solution Tween 80 à fin de réaliser une mise en émulsion pour augmenter en maximum le contact entre les germes et les huiles essentielles car ces dernières sont non-miscibles aux milieux de culture et l'eau (Etuaful *et al*.,2005). Pour les molécules de thymol et chrysanthenone ont été solubilisé dans l'éthanol.

Une sérié de dilution été préparée dans la solution d'agar 0.2% allant de 1/10 jusqu'au 1/300. Le contrôle négatif contenait de la souche microbienne, milieu de culture, solution d'agar à 0.2% et Tween 80.

Le milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar) pour les champignons et TSA (Tryptic Soja Agar) pour les bactéries a été ajouté dans des tubes à essai, chacun contenant 13.5ml. Les dilutions ont été stérilisées à 121°C pendant 30 minutes, puis refroidis à 40°C. Avant de les verser dans les boîtes de Pétri, les tubes ont été agités afin d'assurer une bonne dispersion des huiles essentielles et des molécules dans les milieux de culture. On obtient des concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000 et 1/3000 (v/v). L'inoculum été préparé à partir d'une suspension en solution saline d'eau physiologique stérile (NaCl 0.7%) de spores

provenant d'une culture de moisissures en milieu PDA pendant 7 jours et sous forme de bouillon pour les bactéries à partir d'une culture de 18h-24h sur milieu gélosé TSA. L'inoculation a été réalisée par stries à l'aide d'une boucle de platine pour prélever le même volume d'inoculum. La lecture des résultats été faite après 7 jours d'incubation à une température de 25°C pour les moisissures et après 24h à 37°C pour les bactéries. Chaque essai a été établi en triple à fin de minimiser la marge d'erreur expérimentale.

Analyse statistique

Les résultats de cette étude ont été analysés en utilisant le logiciel Graph Prism version 8.0.1 pour effectuer le traitement statistique. ANOVA a été employée en tant que méthode statistique. Les écarts sont considérés comme importants lorsque p est inférieur à 0.05 par rapport au témoin.



PARTIE III

RÉSULTATS & DISCUSSION



Partie I : Etude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du cancer dans la région de Casablanca Settat

1. Introduction

Les plantes médicinales demeurent toujours un trésor d'information et une source importante des remèdes traditionnels dans les pays émergents tels que le Maroc, en l'absence d'un système médical contemporain (Tabuti *et al*.,2003), la richesse du Maroc en plantes médicinales et aromatiques lui permet de le classer parmi les pays méditerranéens qu'ont un trésor traditionnel assez profond et un savoir-faire phytothérapique et médicinal traditionnel (Scherrer *et al.*, 2005). Par sa situation géographique au Nord-Ouest de l'Afrique ainsi son bioclimat méditerranéen très diversifie, le Maroc offre une très grande diversité floristique et écologique avec un endémisme très marqué de plusieurs espèces botaniques. En effet, sur les 7000 espèces, sous-espèces et variétés vivent dans les terrains marocains, 537 sont endémiques du pays et 1625 sont rares ou menacées (Benabid.,2000). A pour objectif de contribuer à la valorisation et la conservation du savoir éthnomédicinal accumulé adurant des siècles et acquise par la population locale de la ville de Casablanca, nous avons réalisé une étude ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement des cancers.

2. Enquête ethnobotanique

2.1 Caractéristiques démographiques des personnes interrogées

- **Age**

L'utilisation des plantes médicinales dans la ville de Casablanca est répandue chez toutes les tranches d'âge d'une manière variable d'une tranche d'âge à une autre. Elle est prédomine chez les personnes ayant un âge varie entre 40 et 50 ans avec un taux d'utilisation de 40.46%, viennent ensuite les personnes âgées de 30 à 40 ans qu'ont une fréquence d'utilisation de 27.75%. Cependant, on note une fréquence d'utilisation de 21.73% pour les personnes âgées de plus de 50ans. Alors que pour les personnes les plus jeunes ; 18-29 ans, l'utilisation des plantes médicinales ne représente pas un grand intérêt thérapeutique (10.03%) (Figure 16), ce qui s'explique par la méfiance des jeunes aux traitements traditionnels y inclus les plantes médicinales, et ils n'ont plus croire aux vertus thérapeutiques de ces dernières.

Les résultats obtenus montrent que les personnes ayant un âge compris entre 40 et 50 ans fournissent des informations plus fiables par rapports aux autres tranches d'âge, cela est dû à la connaissance des propriétés et des usages des plantes médicinales qu'ont les personnes de cette tranche d'âge.

La prédominance des personnes les plus âgées au sujet de l'usage des plantes médicinales dans la médecine traditionnelle est confirmée par plusieurs auteurs. En effet, Mehdioui et Kahouadji, (2007) signalent que les personnes les plus âgées utilisent les plantes médicinales

d'une manière très fréquente par rapport aux autres classes d'âges. Cette fréquence d'utilisation élevée est due à leurs connaissances profondes en plantes médicinales et en médecine traditionnelle locale (Mehdioui & Kahouadji.,2007). Selon les recherches menées par Benkhnigue *et al*, 2010 rapportent que cette connaissance en plantes médicinales est en danger actuellement qui peut s'expliquer par la méfiance des jeunes qui ont tendance à ne pas trop croire en cette médecine traditionnelle, la raréfaction des ressources végétales ainsi que la mal transmission de ces connaissances d'une génération à une autre (Benkhnigue *et al*.,2010).

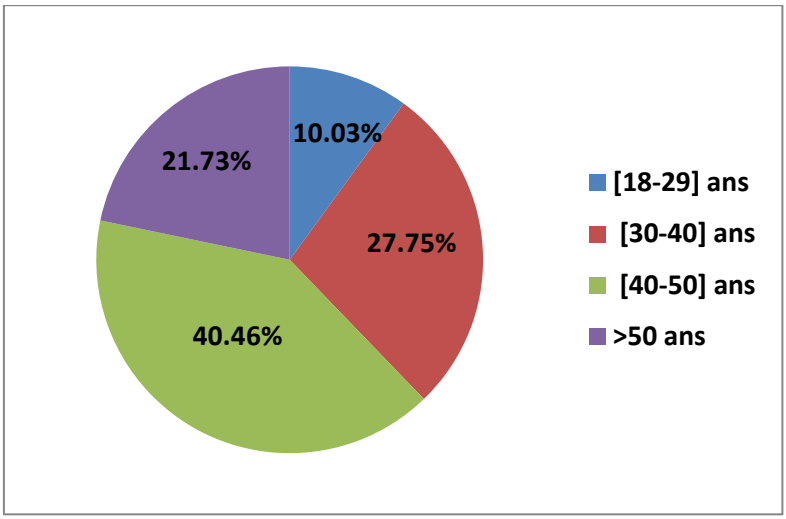


Figure 16 : Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par tranches d'âge dans la ville de Casablanca

- **Selon le sexe**

L'utilisation des plantes selon le sexe des intervenants, est présentée dans la figure 17, les plantes médicinales sont utilisées aussi bien pour les hommes que pour les femmes. Cependant, le sexe féminin prédomine avec un pourcentage de 64.21%, soit 192 femmes, contre 35.78 %, soit 107 hommes. Cela confirme que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapique traditionnel que les hommes, cela peut être dû à l'utilisation la plus fréquente des femmes aux épices et aux plantes aromatiques dans la cuisine Marocaine et en tant que des mères comme un premier soin pour leurs enfants. Ces résultats concordent avec les résultats d'autres études ethnobotaniques effectuées à l'échelle nationale, à savoir l'étude de Hmamouchi en 2001, l'étude de Mehdioui et Kahouadji en 2007, l'étude de Benkhnigue *et al* en 2010 et l'étude de Hamouche *et al* en 2012.

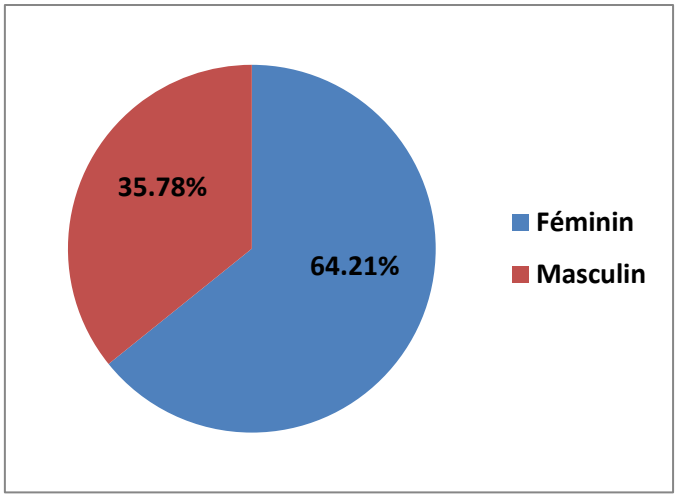


Figure 17 : Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes par sexe des intervenants dans la ville de Casablanca

- **Selon le niveau d'étude**

Concernant le niveau d'étude des personnes enquêtées, les résultats obtenus démontrent que plus du tiers de la population étudiée (32.77%) ont un niveau secondaire, alors que 23.41% sont des analphabètes, 22.07% ont un niveau universitaire et 21.73% ont un niveau primaire (Figure 18).

Les gens ayant un niveau d'étude secondaire et les analphabètes représentent plus que la moitié des usagés des plantes médicinales dans la ville de Casablanca, cela peut être due probablement à la structure des habitants de cette ville qui sont majoritairement des analphabètes ou ayant un niveau secondaire. Cela ressemble aux résultats des études menées par El Hilah *et al*.,(2015) et Bouzid et ses collègues (2017). Il est donc possible de remarquer que l'utilisation des PAM diminue à mesure que le niveau d'étude augmente.

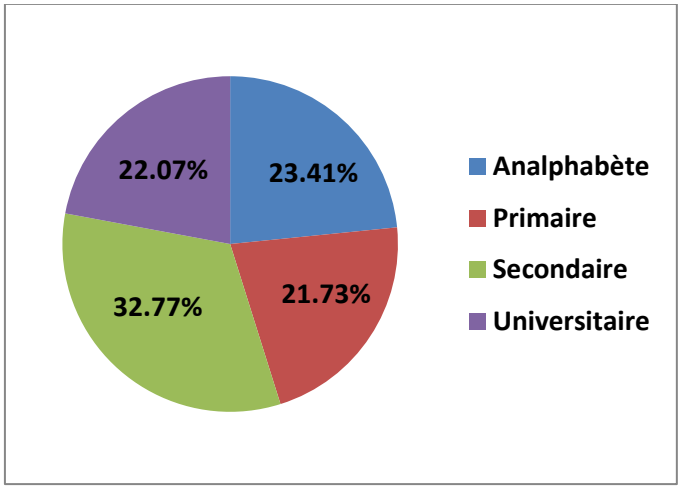


Figure 18 : Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales selon le niveau d'étude des personnes enquêtées dans la ville de Casablanca

- **Selon leur habitat**

Les personnes enquêtées se localisent sur toute la zone d'étude ; la ville, villages et douars qu'on au voisinage ou loin de Casablanca. Cependant, les plantes médicinales sont beaucoup plus utilisées par les habitants de la ville (71.23%), que par les habitants des villages (22.07%) et des douars (6.68%) (Figure 19).

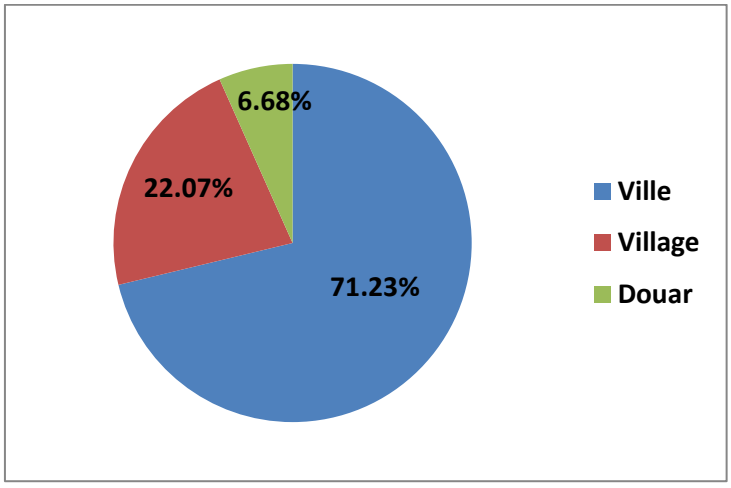


Figure 19 : Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par habitat dans la ville de Casablanca

La phytothérapie associée aux soins médicaux à savoir la chimiothérapie, radiothérapie, ou chirurgie (60.54%), est fréquemment utilisée par la population étudiée. Cette association a pour plusieurs raisons, avoir un effet synergique entre les plantes médicinales et un ou plusieurs médicaments de synthèse dont 70% des cas, renforcer le système immunitaire dont 18% des cas ou diminuer la toxicité de la chimiothérapie dans 12% des cas.

Les deux soins médical et phytothérapeutique ont la même fréquence d'utilisation de 19.73%, l'utilisation du premier soin seul par les enquêtées est expliquer par la méfiance de ces dernières aux traitements traditionnels et le manque de l'efficacité de ces derniers vis-à-vis les cancers, alors que celles qui utilisent la phytothérapie seule expliquent leurs choix par plusieurs explications ; le prix non couteux, une faible toxicité par rapport aux soins médicaux et pour le renforcement du système immunitaire.

3. Plantes médicinales utilisées par la population étudiée

3.1 Familles les plus citées

Notre enquête nous a permis de recenser 352 espèces appartenant à 49 familles (tableau 5). Par son effectif relativement élevé par rapport aux espèces des autres familles botaniques, la famille des *Lamiaceae* s'avère la plus domine et leurs espèces (73 espèces) sont les plus utilisées dans les soins soit (20.73%), viennent ensuite la famille des *Asteraceae* avec 49

espèces soit (13.92%), la famille des *Myrtaceae* avec 19 espèces soit (5.39%), celle des *Apocynaceae* avec 18 espèces soit (5.11%), celle des *Aristelochiaceae* avec 15 espèces soit (4.26%), celles des *Fabaceae* et des *Anacardiaceae* avec12 espèces pour chacune soit (3.40%), les autres familles botaniques restantes comptent 11 à 1 espèces chacune, avec des pourcentages varies entre 3.12% et 0.56% respectivement (*Compositaceae*, *Euphorbiaceae*, *Liliaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Moraceae*…) (Figure 20).

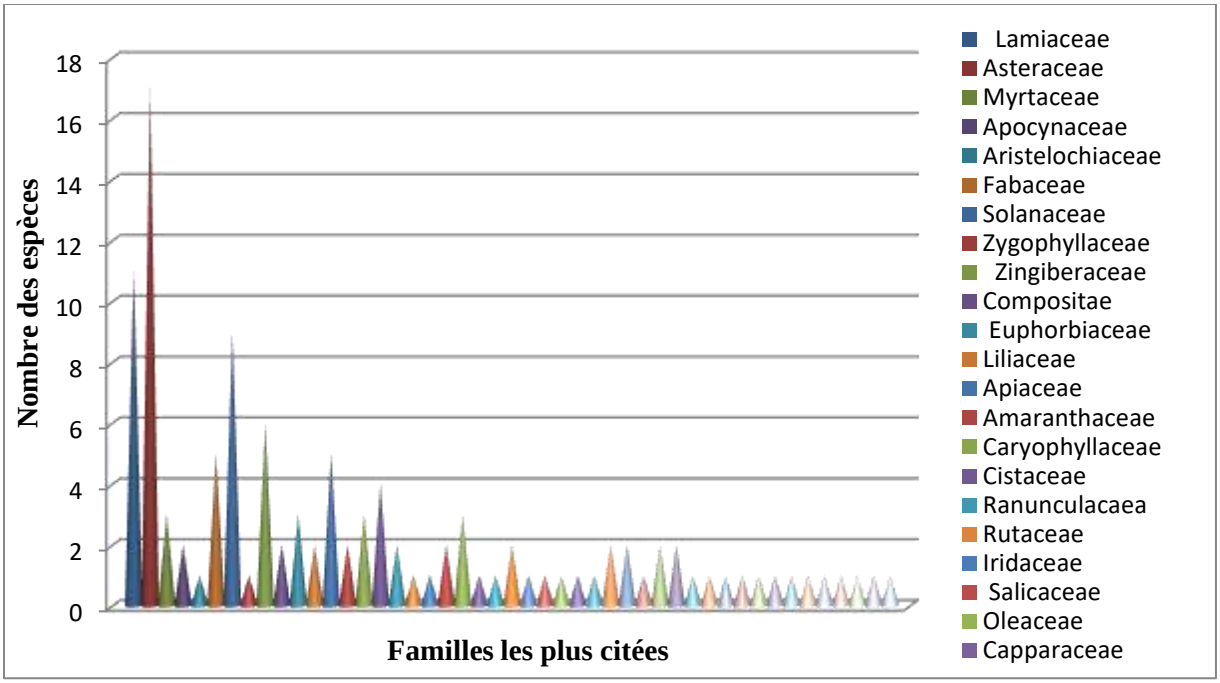


Figure 20 : Classification des familles les plus utilisées

Tableau 5 : Classification des familles selon leur nombre d'espèces les plus citées

Familles	Nombre d'espèces	% de citation
Lamiaceae	11	9,56
Asteraceae	17	14,78
Euphorbiaceae, Caryophyllaceae, Myrtaceae, Oleaceae	3	2,60
Solanaceae	9	7,82
Apiaceae, Fabaceae	5	4,34
Apocynaceae, Ranunculacaea, Rhamnaceae Amaranthaceae Urticaceae, Taxaceae, Compositae, Liliaceae, Salicaceae Brassicaceae, Pinaceae	2	1,73
Zingiberaceae	6	5,21
Cistaceae	4	3,74
Aizoacaea, Moraceae, Cucurbitaceae, Piperaceae, Rosaceae, Geraniaceae, Ericaceae, Asparagaceae, Rubiaceae Tamacicaceae, Boraginaceae, Annonaceae, Globulariaceae, Berberidacaea, Lemnaceae, Cactaceae, Astraceae, Zygophyllaceae Aristelochiaceae Chenopodiaceae, Berberidaceae, Capparaceae, Rutaceae, Iridaceae	1	0,87

4. Parties végétales utilisées

Les propriétés thérapeutiques d'une plante donnée diffèrent selon la partie utilisée, pour cela, les plantes médicinales peuvent être utilisées entières ou en partie (feuilles, tiges, graines, fruits, racines, écorce….). La figure 21 illustre les fréquences d'utilisation des différentes parties végétales. Les feuilles sont la partie la plus utilisée avec un taux de 26.38% ; suivie par la partie aérienne (25.55%), les racines (15.83%), les fleurs (13.61%) et les graines (6.38%). Le reste des parties végétales utilisées est représenté par un taux cumulatif de 8.58%.

Étant donné que la partie utilisée de la plante a un lien avec ses effets thérapeutiques (Cunningham, 1996). Plusieurs études confirment que les feuilles sont la partie la plus couramment utilisées des plantes médicinales.

À travers ses travaux, Mehdioui & Kahouadji.,(2007) notent que la partie aérienne ; à savoir les feuilles qui représentent la partie la plus fréquemment utilisée, représentant 30%. Selon Ould EL Hadj et ses collègues (2003), les feuilles sont utilisées avec le plus grand pourcentage, avec un pourcentage de 37,3%. Enfin, Chehma & Djebbar., (2008) enregistrent un taux d'utilisation de 84% pour la partie aérienne, y compris les feuilles.

L'utilisation la plus fréquente des feuilles par les populations, aussi bien dans notre étude que d'autres études, peut être expliquée par le fait que ces dernières sont le siège du phénomène de la photosynthèse et l'entreposage des métabolites secondaires responsables des activités biologiques et les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales.

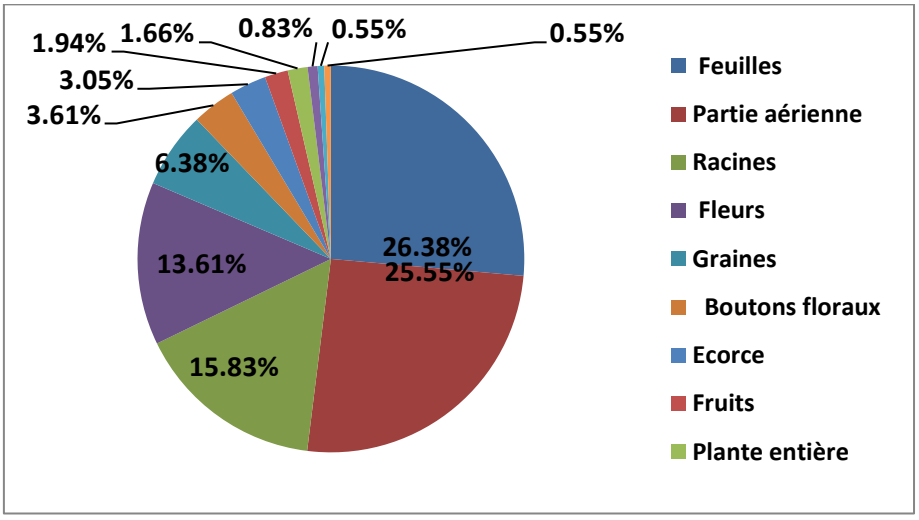


Figure 21 : Répartition des pourcentages des différentes parties utilisées des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca

5. Modes de préparation

Selon le type d'usage des plantes médicinales, plusieurs modes de préparation sont utilisés pour faciliter l'administration des principes actifs à savoir la macération, la décoction, l'infusion, la pulvérisation…Toutefois, la décoction, en poudre et l'infusion représentent les modes les plus utilisables avec des taux respectivement de 35.11%, 34.44% et 11.37%, les autres modes de préparations représentent un taux cumulatif de 19.05%. Ce résultat montre que la population questionnée croît à la décoction comme mode de préparation et d'utilisation des plantes médicinales soit pour réchauffer le corps ou pour éliminer les composants toxiques de la plante par la chaleur.

Selon Ould EL Hadj *et al*.,2003, les différentes méthodes de préparation des drogues végétales varient en fonction du principe actif visé. La macération, la décoction et l'infusion sont les principaux modes de préparation des drogues végétales dans la médecine traditionnelle. Tout comme dans les travaux de Mehdioui et Kahouadji (2007), la préparation par décoction est principalement utilisée à hauteur de 47%, suivie de la préparation en poudre à hauteur de 25%, tandis que les autres méthodes (macération, infusion, cataplasme, fumigation et autres) représentent 28% (figure 22).

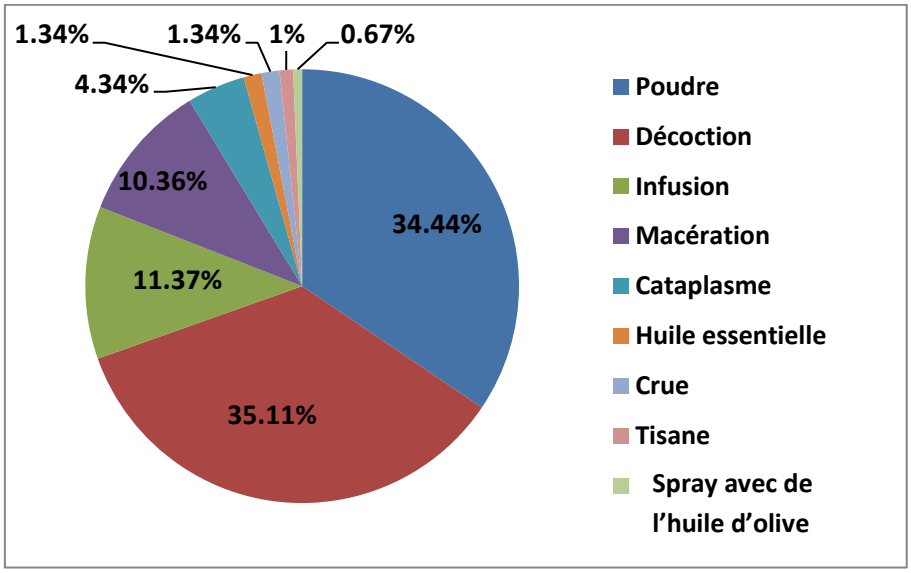


Figure 22 : Répartition des pourcentages des modes de préparation des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca

6. Voies d'administration

Dans notre zone d'étude, l'administration est majoritairement par voie orale avec un taux de 95.32%, suivie par la voie locale en cataplasme avec un taux de 4.34% et vienne en dernier

l'inhalation avec un taux de 0.34% (Figure 23). Cette fréquente utilisation de la voie orale comme moyen d'administration peut être due à la facilité de ce dernier ainsi que les types de cancers ciblés et pour bien bénéficié des composants actifs des plantes médicinales utilisées selon les personnes enquêtées.

La prédominance de la voie orale est confirmée par plusieurs auteurs au Maroc. En effet, Amrati et al (2021) ont montré que la voie orale est la plus dominante dans l'administration des drogues végétales avec un pourcentage de 95% de même Aboufaras et al (2022) signalent que l'administration orale est la plus préconisée. Cette voie demeure la forme la plus courante d'utilisation des drogues végétales.

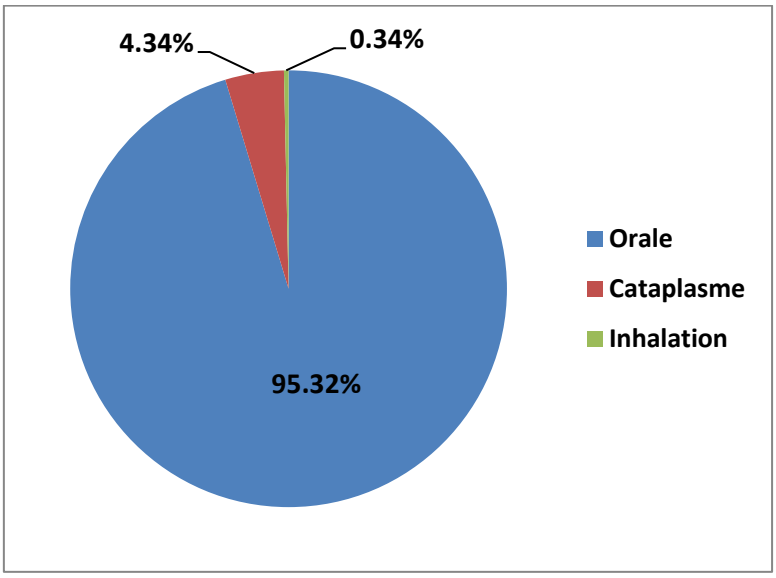


Figure 23 : Répartition des pourcentages des voies d'administration des plantes médicinales utilisées dans la ville de Casablanca

7. Choix des plantes sélectionnées

Les principes actifs issus des plantes médicinales jouent un rôle primordial dans le progrès de la médecine moderne. Les résultats des enquêtes éthnopharmacologiques en particulier l'utilisation des plantes médicinales connues depuis des siècles. Leurs effets thérapeutiques diffèrent ont permis la mise en place d'un grand nombre des médicaments d'une efficacité élevée. À fin de contribuer à l'identification des nouvelles molécules thérapeutiques, nous avons étudié les activités *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles de deux plantes médicinales.

Le choix des plantes de notre étude a été fait sur la base des résultats de l'enquête ethnopharmacologique auprès de la population de Casablanca et les résultats rapportés dans la littérature. Parmi ces plantes on a le *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba*.

8. Conclusion

Les résultats des enquêtes éthnopharmacologiques permettront d'avoir un aperçu général sur le pouvoir curatif des plantes médicinales sur la base des données recueillies auprès des patients ou des herboristes dans ces localités. Grâce à ces résultats, les études sur les composés actifs de ces plantes seront orientées et leurs activités pharmacologiques variées seront vérifiées *in vitro* et *in vivo*.

En outre, l'enquête éthnopharmacologique que nous avons menée dans la ville de Casablanca nous a permis de révéler l'existence de plusieurs plantes médicinales (352 espèces appartenant à 49 familles botaniques) et les différents mode de préparation par les patients qui peuvent offrir une réponse aux problèmes complexes et constitue une base pour des futures études de valorisation et de la recherche des nouvelles approches thérapeutiques à base des plantes médicinales.

Partie II : Etude phytochimique d'huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *thymus algeriensis*

1. Introduction

La maitrise des techniques biochimiques, le criblage à haut débit des molécules bioactives et le développement des techniques et méthodes de synthèse ont permet de rechercher et développer des nouveaux principes actifs ciblant plusieurs pathologies inflammatoires, cancéreuses, infectieuses et d'autres (Marinas *et al*.,2021). Dans cette étude nous avons choisi d'étudier deux plantes médicinales, *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba*, de la région d'Imizar-Azilal (grand Atlas du Maroc) qui sont utilisées largement par la population autochtone contre plusieurs pathologies liées aux cancers, étudier aussi son effet synergique en ciblant ainsi la recherche de sa composition phytochimique et des nouvelles molécules bioactives.

2. Rendement des huiles essentielles

Par hydrodistillation, les huiles essentielles ont été extraites par dans un appareil de type Clevenger. À la fin de chaque hydrodistillation, les huiles essentielles obtenues sont stockés en présence de sulfate de sodium anhydre à l'obscurité et à une température de 4°C. Le rendement moyen en huile essentielle des deux plantes étudiées est calculé sur la base de la matière végétale des parties aériennes sèches

L'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne d*e T.algeriensis* possède une couleur jaune foncée avec une odeur agréable. Les parties aériennes de la dite plante ont montré un taux relativement faible, d'environ 0.4%. Ce résultat est similaire à celui de Hazzit *et al*., (2009) pour la même espèce (0,4%), légèrement inférieur à celui découvert par Amarti *et al*., (2011) dans la région Rchida (région orientale du Maroc) (0,3 %), et très inférieur à celui obtenu par Dob *et al*., (2006) à partir des parties aériennes de Thymus algeriensis, qui s'élève à 1,13%.

L'huile essentielle de la plante *A.herba-alba* caractérisée par une couleur jaune clair et son odeur est agréable. Les parties aériennes d'*A.herba-alba* ont fourni un rendement de 0.6 %. Ce rendement est supérieur à celui trouvé par Tilaoui *et al.* (2011) à partir des parties aériennes d'*A.herba-alba* de la région d'Imilchil de province d'Er-Rachidia. Plusieurs études avaient montré que le rendement et la qualité des huiles essentielles s'influencent, d'une part ; par le temps de séchage de la plante, le cycle végétatif, les conditions environnementales, la période de récolte (Boukhatem *et al*.,2010; Abdallah & Ezzat., 2011; Michel.,2011) et d'autre part, par la technique d'extraction utiliser.

3. Identification des composés phytochimiques

3.1 Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS)

Afin d'identifier les constituants des huiles essentielles des 2 plantes médicinales étudiées *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba*, les composés majoritaires ainsi que les minoritaires, l'analyse de la composition chimique des huiles a été effectuée premièrement par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (CPG/FID). Deuxièment, par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM).

Les constituants chimiques de chaque huile essentielle sont identifiés en se basant sur leur spectre de masse obtenu grâce à la chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse, ainsi que sur leur indice de Kovats (IK) (Kovats, 1965). L'indice de chaque molécule a été calculé selon l'équation de Van Den Dool et Kratz en injectant un mélange des alcanes de C9 à C24 dans les mêmes conditions opératoires que l'huile essentielle.

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*

N°	Composés	IK	RT (mn)	Abondance %
1	Tricyclene	926	3,129	0,25
2	□-Thujene	931	3,453	0,54
3	α-Pinene	939	3,460	4,31
4	Camphene	948	4,175	0,38
5	β-Pinene	980	1,07	1,07
6	β-Myrcene	991	0,24	0,24
7	α-Terpinene	1018	0,20	0,20
8	Limonene	1030	1,14	1,14
9	-Terpinene	1068	0,19	0,19
10	α-thujone	1102	10,52	4,02
11	β-thujone	1114	10,95	0,57
12	**Chrysanthenone**	**1123**	**11,930**	**47,71**
13	cis-β-dihydroterpineol,	1138	12,191	0,80
14	**Camphor**	**1143**	**12,247**	**21,59**
15	Trans-β-dihydroterpineol,	1158	12,766	1,81
16	**β-terpineol, trans-**	1163	13,412	2,19
17	Terpin-4-ol	1177	13,948	0,39
18	□-Terpineol	1189	14,166	0,44
19	Piperitol, trans-	1205	14,382	0,40
20	Myrtanol, trans-	1258	15,294	0,56
21	Neo-3- thujyl acetate	1271	16,174	0,57
22	□-Terpin-7-al	1282	16,840	0,46
23	Neo-iso-acetateisopulegol	1315	18,871	0,61
24	Trans-dihydro-α terpinyl- acetate	1339	19,641	0,42
25	β-elemene	1373	19,751	2,81
26	Germacrene D	1480	19,811	3,15

27	α-Muuolene	1499	20,01	1,14
28	Caryophyllene alcohol	1568	20,193	0,25
29	Germacrene D-4-ol	1574	20,526	0,37
30	Davanone	1586	22,256	1,13
Total				99,71
KI: Kovats index ; RT: retention time				

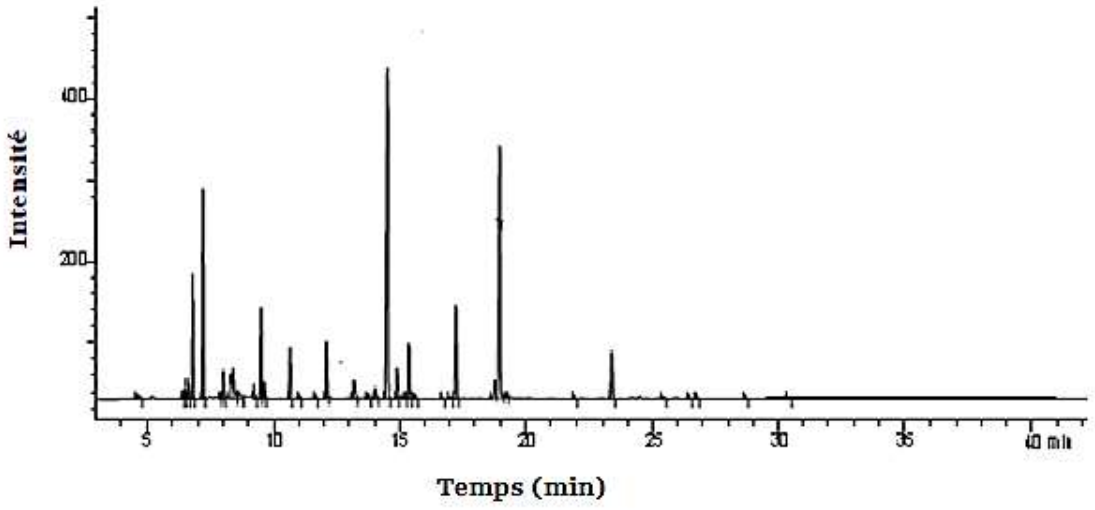


Figure 24 : Chromatogramme de CPG/MS d'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*

Les résultats d'analyse chromatographique de l'huile essentielle d'*A.herba-alba* ont révélé la présence de 29 composés (tableau 6) qui représentent environ 98,22% de la totalité de l'H.E de la plante. Les principaux constituants de l'huile essentielle testée sont le chrysanthénone (47,71%) et le camphre (21,45%), les résultats ont montré aussi l'absence de caryophyllène (figure 24).

Chrysanthenone, nommé aussi 2-Pinen-7-un est un monoterpénoïdes de formule chimique $C_{10}H_{14}O$, peut-être synthétisé chimiquement à partir de son isomère qu'est la verbenone par réaction de réarrangement chimique (Lisin *et al*.,1997). Ce composé est présent dans plusieurs huiles essentielles de plantes médicinales, *Chrysanthemum indicum L* (Meister *et al*.,1999), *Artemisia asictica* et *Chrysanthemum boreale* (Kyung-Mi & Gun-Hee.,2009).

Les études antérieures ont montré une variation entre la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* en fonction de l'origine géographique de l'espèce (Moumni *et al*.,2013). L'étude menée par Bessa *et al*.,2010 sur *A.herba-alba* a montré que l'acétate de cis-chrysanthényle (25,12%) est le composé majoritaire de l'huile essentielle de cette plante, suivi par 2E,3Z-2-éthyliden-6-méthyl-3,5-heptadiènal (8.39%), α-thujone (7,85%), acétate de myrtényle (7,39%) et la verbenone (7,19%). Cependant, Moumni *et al*., (2013) ont identifié 51 composés chimiques correspondant à 99.62% dans l'huile essentielle d'Artemisia herba-

alba de la région d'Errachidia, à savoir ; le davanone (37,71%), le caryophyllène oxyde (13,17%), 5,8,11-Heptadecatrien-1-ol (7.68%) et l'α spathulénol (6.48%). De même, Touil & Benrebiha.,2011 ont signalés que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* de la région de Djelfa-Algérie est un chémotype davanone qui représente le composé majoritaire avec un pourcentage de 62.6%, suivi par le carvacrol (4.88%), le davana ether (3.62%) et le camphor (3.48%).

Tableau 7 : Composition chimique de l'huile essentielle de Thymus *algeriensis*

N°	Composés	IK	RT (min)	Abondance %
1	□-Thujene	931	3,453	0,64
2	α-Pinene	939	3,460	0,35
3	Sabinene	973	4,175	0,56
4	□-3-Carene	1011	4,833	3,1
5	α-Terpinene	1018	4,973	2,3
6	p-Cymene	1026	5,27	0,47
7	1,8-Cineole	1031	6,34	2,63
8	□ -Ocimene,(E)-	1048	6,62	2.80
9	Sabinene-hydrate, cis-	1067	6,90	0,54
10	□-Terpinene	1068	7,53	0,74
11	Isoborneol	1159	13,16	1,87
12	**Borneol**	**1165**	**13,56**	**20,38**
13	Terpin-4-ol	1177	13,948	0,48
14	Verbenone	1204	14,56	0,08
15	Thymol methyl ether	1235	14,59	0,98
16	□-Terpin-7-al	1282	16,84	0,18
17	**Thymol**	1290	**17,59**	**46.03**
18	**Carvacrol**	**1298**	**18,38**	**5,86**
19	Caryophyllne oxide	1581	21,81	0,28
20	Caryophyllene acetate	1700	31,21	0,34
Total				99,71
KI: Kovats index ; RT: retention time				

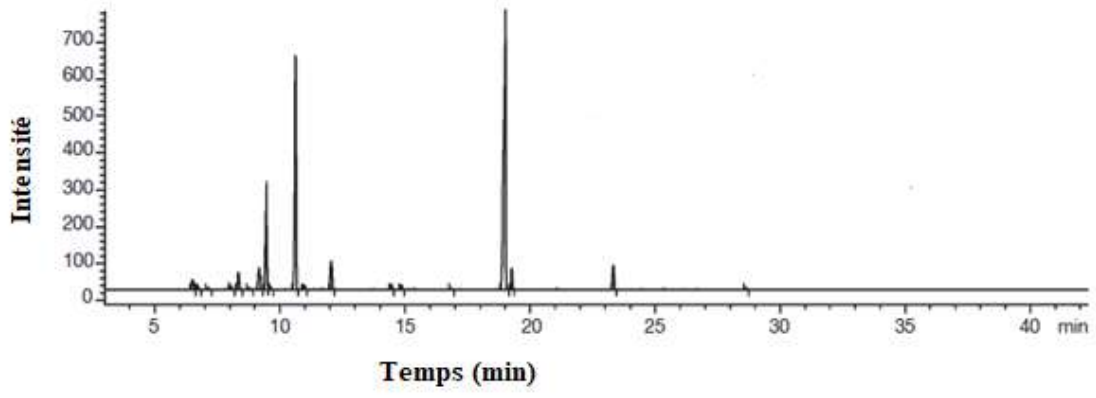


Figure 25 : Chromatogramme de CPG/MS d'huile essentielle de *Thymus algeriensis*

Dans le tableau et la figure sont reportés les 21 composés identifiés dans l'huile essentielle de la partie aérienne de *T.algeriensis.* Ces derniers représentent 91.05% de cette huile. Le Thymol (46,03%) est le composé principal, suivi par le bornéol (20, 38%) et le carvacrol (5,86%). D'autres constituants étaient présents avec des pourcentages d'abondance considérables, comme le δ-3-Carene (3.1%), le β-Ocimene, (E)- (2.80%) et le 1,8-Cineole (2.63%).

Thymol est un phénol monoterpène, incolore, cristallisé chimiquement nommé 2-isopropyl-5-methylphenol (Kintzios,.2002), très abondant dans plusieurs plantes médicinales, *Thymus algeriensis* (El Ouahdani *et al*.,2023), *Thymus vulgaris* (Amarti *et al*.,2010), *Nigella sativa* (Yadav & Kamble.,2009) *Thymus pectinatus* (Dob *et al*.,2006) et *Satureja intermedia* (Tilaoui *et al*.,2011).

Des études précédentes ont démontré une variation entre les compositions chimiques. Par d'exemple, l'analyse de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* effectuée par Amarti *et al*,(2010) a révélé le camphre (27,7%) comme composé majoritaire.

Les résultats d'analyses de l'huile essentielle de différentes espèces de thym (*T. willdenoivii, T. munbyanus, T. villosus, T. leptobotrys et T. ciliatus*) issues de différentes régions du Maroc montrent qu'elles se caractérisent toutes par la présence de Thymol comme composé majoritaire avec respectivement (59,1 ; 70,4 ; 61,5 ; 49,8 et 442 %) (Nikoli´c *et al*.,2014; Amarti *et al*.,2011).

4. Conclusion

Cette partie de ce travail été consacrée à l'étude phytochimique des huiles essentielles des parties aériennes d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis*. Cette étude a abouti à l'identification et la quantification de divers composés chimiques. Pour la poursuite de nos investigations sur ces deux plantes, nous pensons nous consacrer plus particulièrement aux études toxicologiques et pharmacologiques des deux huiles essentielles et de leur effet synergique qui jusqu'à présent, n'a fait l'objet d'aucune étude pharmacologique. Cela nous permettra peut-être d'identifier les composés chimiques participants à l'activité d'huiles essentielles de ces deux plantes médicinales.

Partie III : Investigations toxicologiques et pharmacologiques des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis in vivo* et *in vitro*

I. Investigations toxicologiques

L'utilisation de toute plante médicinale en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques ne garantit en rien son innocuité. Si la composition chimique de deux huiles essentielles a été déterminée dans la partie précédente, leur toxicité est généralement méconnue. En fait, la détermination de l'innocuité de ces huiles essentielles est importante avant d'évaluer ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé une étude de la toxicité aigüe et subaigüe ainsi que l'étude de l'hépatotoxicité des huiles essentielles séparément.

1. Etude de la toxicité aiguë

1.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité

L'étude sur la toxicité a été ajustée en fonction de celle de la ligne directrice 423 (OECD.,2002). Le suivi continu des signes cliniques chez les rats des quatre lots a été effectué tout au long de la période d'étude de la toxicité aigüe (14 jours).

Les résultats de l'étude sur la toxicité aigüe de l'huile essentielle de *T.algeriensis* individuellement ont montrés que l'administration orale de ce dernier à une dose de 150mg/kg de pc provoquait une seule signe de toxicité, qu'est apparue sous forme des douleurs abdominales (contorsions) chez les rats traités. Cependant, les rats ayant reçu l'huile essentielle d'*A. herba-alba* à une dose de 150mg/kg de pc ont présenté quelques signes cliniques de toxicité à savoir ; l'anorexie, convulsions, contractions abdominales et des difficultés respiratoires (Tableau 8). Tous les animaux ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation.

D'après Bouzidi.,2016 l'alpha-thujone constitue le composé bioactif le plus toxique dans l'huile essentielle d'*A.herba-alba*. En effet, à forte dose, il a des effets convulsivante, neurotoxique, abortive et hémorragique. Notre huile essentielle d'*A.herba-alba* contient l'alpha-thujone avec un pourcentage de 4,02% tandis que ceux de *T.algeriensis* est dépourvue de ce dernier. En pratique même si la toxicité d'une huile essentielle est attribué principalement à ses composés majoritaires, les signes cliniques qu'ont été apparaîtraient chez le groupe des rats traités par l'huile essentielle d'*A.herba-alba* peuvent être induites par ses composants de faible quantité comme l'alpha-thujone.

Une autre étude recherchée les effets génotoxiques de l'huile essentielle d'*A.herba-alba* sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré que cette dernière n'induit aucun événement génétique nucléaire (recombinaison mitotique inter ou intra génique, mutations ponctuelles) (Mohamed *et al*.,2010). Dans une autre étude utilisant des souches de fusion Lac-Z, recherchée le pouvoir de l'huile essentielle d'*A.herba-alba* à induire des dommages d'ADN,

ils indiquent que cette dernière provoque de dommages mitochondriaux mais en masquant toute survenue d'événements génétiques nucléaires cela indique que cette huile essentielle n'entraine aucune modification génétique nucléaire et que toutes les mutations mitochondriales semblent étroitement liées au processus cytoprotecteur exercé par l'huile essentielle d'*A.herba-alba*.

Concernant la toxicité d'huile essentielle de *T.algeriensis* aucune étude n'a été rapportée. Cependant, les douleurs abdominales apparues chez les rats traités par cette huile essentielle dans notre étude peuvent être expliquées par l'abondance de thymol qu'est d'après Wichlt et Anton, 1999 provoque des douleurs abdominales ainsi qu'un léger collapsus s'il est administré à des dose comprises entre 0.3 et 0.6 grammes.

L'administration par voie orale de la mixture des deux huiles essentielles d'*A. herba-alba* et de *T. algeriensis* (ratio 1/1) à une dose de 150mg/kg n'entraine aucun comportement anormal (signe de toxicité) ni décès chez les rats (Tableau 8). Tous les animaux ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation. Ces résultats impliquent que la DL_{50} de cette mixture est supérieure à 150mg/kg de pc selon le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (EMA/HMPC/166517/2015). Cependant, les substances ayant une DL_{50} comprise entre 50 et 500 mg/kg de pc sont toxiques et celles avec une DL_{50} supérieure à 5000 mg/kg sont pratiquement non toxiques. En nous rapportant à cette classification de Diezi, que la mixture a une toxicité modérée par voie orale chez les rats Swiss.

Tableau 8 : Résultats d'observation des animaux durant tous les jours pendant 14 jours après administration orale des huiles essentielles de *(T.a), (A.h)* et leur mixture à une dose de 150mg/Kg.

Signes cliniques de toxicité /lot	Groupe 1 (Contrôle négatif)	Groupe 2 *T.a*	Groupe 3 *A.h*	Groupe 4 Mix
Somnolence	-	-	-	-
Anorexie	-	-	+	-
Diarrhée	-	-	-	-
Difficultés Respiratoires	-	-	+	-
Sensibilité à la douleur et au bruit	-	-	-	-
Douleurs abdominales	-	+	+	-
Convulsion	-	-	+	-
Tremblement	-	-	-	-
Coma	-	-	-	-
Mortalité	-	-	-	-

(+) : présence de signes ; (-) : Absence de signes

Pendant les 14 jours d'expérience, un suivi du poids corporel des rats a été effectué chaque jour. Les données du suivi des variations de poids corporel des trois lots des rats traités par les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* individuellement ainsi que leur mixture à une dose de 150 mg/Kg indiquent que le poids corporel (pc) les rats des trois lots reste presque stable en fonction du temps. Cependant, la variation de poids corporel entre les rats traités et ceux du témoin reste non-significative pendant 14 jours (Figure 26).

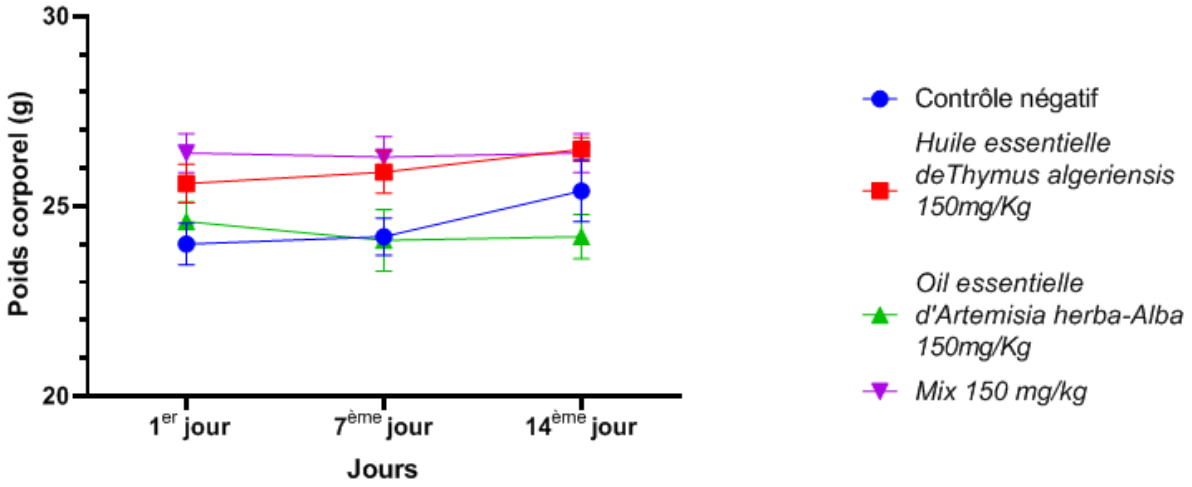


Figure 26 : Variations de poids des rats en fonction du temps d'administration de l'huile essentielle de (*T.a*), d'(*A.h*) et de leurs mixtures par voie orale. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin. (n=5)

1.2 Poids relatifs des organes (ROW)

Les organes prélevés à la fin du traitement chez les rats traités par les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* individuellement ainsi que leur mixture à une dose de 150 mg/kg n'ont connu aucune variation significative entre les rats traités et les témoins en termes de poids du foie, reins et la rate. Le tableau reporte le poids des organes prélevés.

Tableau 9 : Effet des huiles essentielles et de leur mixture administrées par voie orale à une dose de 150 mg/Kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 14 jours de traitement.

	Contrôle négatif	***T. algeriensis* 150 mg/kg**	***A.herba-alba* 150 mg/kg**	**Mixture 150 mg/kg**
"Foie"	1,507±0,104	1,533±0.206	1,591±0,285	1,540±0,189
"Reins"	0,450±0,005	0,463±0.07	0,480±0,130	0,436±0,06
"Rate"	0,154±0,006	0,161±0,052	0,164±0,071	0,151±0,096

Les valeurs sont des moyennes ± erreurs standards, chaque lot comprenant 5 rats (n=5).

1.3 Paramètres biochimiques

Le dosage sérique des paramètres biochimiques (urée, créatinine et ASAT, ALAT) de trois groupes des rats traités a montré que l'administration orale des deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* séparément et de leur mixture à une dose de 150 mg/kg n'entraine aucune altération des taux de ces paramètres biochimiques comparés avec ceux du groupe contrôl (Tableau 10). Cette stabilité de ces paramètres biochimiques chez les trois groupes des rats traités on peut la considérer comme signe d'intoxicité des huiles ainsi que la mixture à une dose de 150 mg/kg.

Tableau 10 : Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 14 jours de l'administration unique des huiles essentielles et de leur mixture à la dose de 150 mg/kg.

Paramètres	Contrôle négatif	*T. algeriensis* 150 mg/kg	*A. herba-alba* 150 mg/kg	Mixture 150 mg/kg
"Urée (g/l)"	0,39±0,03	0,33±0,04	0,41±0,03	0,37±0,03
"Créatinine (mg/l)"	3,67±0,33	3,83±0,16	3,59±0,33	4,05±0,57
"ASAT (UI/l)"	196±4,72	202±8,03	222,33±5,54	181,33±8,36
"ALAT (UI/l)"	26,67±3,84	21±3,05	22,33±3,38	25,8±1,26

Suite aux résultats de toxicité aigüe qui indiquent que l'administration unique par voie orale de la mixture des deux huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis* à une dose de 150 mg/Kg n'entraine ni signes cliniques de toxicité, ni variation du poids corporel ou ceux d'organes, ni paramètres biochimiques nous avons resté focaliser sur l'étude de toxicité de cette mixture des huiles essentielles par administration multiple, journalière et pendant une longue période (toxicité subaigüe).

2. Etude de la toxicité subaiguë

2.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité

Après avoir administré la mixture par voie orale à une dose de 150 mg/kg/jour pendant 4 semaines (28 jours), aucun changement significatif n'a été observé dans le comportement général, la santé physique ou la mortalité des rats traités. Tout au long de la période d'étude, les groupes témoin et traité sont restés en bonne santé. Le poids corporel des deux groupes des rats est resté stable au fil du temps et il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans la variation du poids corporel entre les groupes témoin et traité pendant 28 jours (Figure 27).

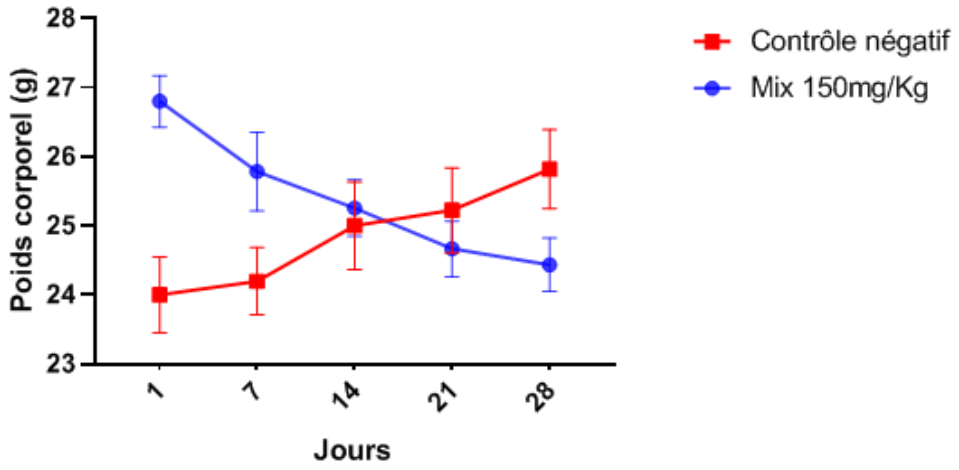


Figure 27 : Effet du traitement par la mixture des huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis*, administrée par voie orale à une dose de 150 mg/kg, sur l'évolution du poids corporel des rats traités par rapport au contrôle négatif. Les valeurs sont exprimées en moyenne± erreur type de la moyenne avec (n=5).

2.2 Poids relatifs des organes (ROW)

Le poids relatif des organes (foie, reins et la rate) a été mesuré après 28 jours d'administration orale de la mixture d'huiles essentielles d'*A.h*erba-alba et de *T.algeriensis* à une dose de 150 mg/kg/jour. Les résultats présentés dans le tableau indiquent que la mixture n'a provoquée aucune conséquence significative sur le poids des organes prélevés ainsi la variation du poids relatif des organes entre le groupe contrôle et le groupe traité reste toujours non-significative. Le tableau ci-dessous reporte le poids des organes prélevés. Les résultats obtenus confirment ceux de la toxicité aigüe et prouvent que la mixture à une dose de 150 mg/kg n'entraine aucune variation significative de poids relatifs d'organes étudiés.

Tableau 11 : Effet de la mixture des huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis administrée* par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 28 jours de traitement.

Organes	Contrôle négatif	Mixture 150 mg/kg
"Foie"	2,146±0,350	2,913±0,197
"Reins"	1,397±0,06	1,450±0,08
"Rate"	0,864±0,05	0,974±0,03

2.3 Paramètres biochimiques

La toxicité hépatorénale chez les rats traités par la mixture d'huiles essentielles à une dose de 150 mg/Kg/jours durant 28 jours a été étudiée par le dosage de certains paramètres

biochimiques à savoir l'urée et la créatinine, ASAT et ALAT. Les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

En ce qui concerne l'effet de l'administration de la mixture sur l'intégrité du tissu hépatique, le dosage sérique de certaines enzymes hépatiques utilisées pour évaluer cette intégrité (Wallace & Sharon.,2010) indique que les taux des enzymes ASAT et ALAT des rats traités n'ont pas significativement variés par rapport à ceux des rats lots témoin. De plus, aucune variation sur le poids relatif du foie par rapport à ceux du groupe contrôle n'a été observée. Ceci suppose que l'administration subchronique de la mixture à une dose de 150 mg/Kg/jour n'entraine pas des lésions du tissu hépatique, ni altérations de leur fonctionnement. L'étude histopathologique qui va confirmer ou infirmée ces suppositions-là.

Les reins sont des organes exceptionnellement vulnérables à la toxicité des xénobiotiques entrer à l'intérieur de l'organisme (Gobe *et al*.,2015). En effet, la principale fonction des reins est le maintien de l'homéostasie plasmatique en réalisant la filtration glomérulaire, la réabsorption et l'excrétion tubulaire (Leriverens *et al*.,2016) et par conséquent produisent des urines contenant des déchets métaboliques tels que l'urée et la créatinine. La néphrotoxicité ainsi que le dysfonctionnement rénal peuvent être évalués à partir du dosage de ces deux marqueurs rénaux.

L'impact de l'administration de la mixture des huiles essentielles sur les fonctions l'intégrité des reins a été évaluée à travers le dosage de deux marqueurs sériques rénaux (urée, créatinine). L'analyse de ces résultats relève que le taux sérique de l'urée n'a pas été significativement varié comparativement à ceux des rats du groupe contrôle. En revanche, la mixture a augmentée de manière significative le taux sérique de créatinine (tableau 12). Ces résultats laissent supposer que cette mixture pourrait provoquer une néphrotoxicité en administration subchronique. La lecture et l'analyse des coupes histologiques du tissu rénal qui vont confirmer ou infirmées les résultats décrites précédemment.

Tableau 12 : Valeurs des paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 28 jours de l'administration de la mixture d'huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* à la dose de 150 mg/kg/jour.

Paramètres biochimiques	Contrôle négatif	Mixture 150 mg/kg
"Urée (g/L)"	0,29±0,02	0,32±0,04
"Créatinine (mg/L)"	3,67±0,33	5,05±0,48
"ASAT (UI/L)"	198±3,39	201±2,62
"ALAT (UI/L)"	44±1,26	41±2,04

2.4 Histopathologie des organes

Le tissu hépatique des rats traités par la mixture montre la présence de plusieurs espaces portes, contenant chacun un canal biliaire non obstrués, de l'artère hépatique et une branche de la veine porte hépatique avec l'absence totale d'anomalies tissulaires autour de ces espaces portes, aussi bien dans les rats du contrôle négatif que dans les rats traités comme le montrent les photographies.

L'étude microscopique des différentes coupes tissulaires du foie des rats du groupe contrôle et des rats traités par la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour a montré une structure anatomique normale sans aucune désorganisation de l'architecture hépatique ou lésions cellulaires ou tissulaires de type nécrose, stéatose ou obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques. Dans l'observation microscopique du parenchyme hépatique, les espaces péri portaux et centrolobulaires observés ont gardé leur structure anatomique normale. En définitive, la mixture de deux huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* à une dose de 150 mg/kg/jour n'aurait pas d'effets délétères sur l'intégrité tissulaire et le fonctionnement hépatique (figure 28).

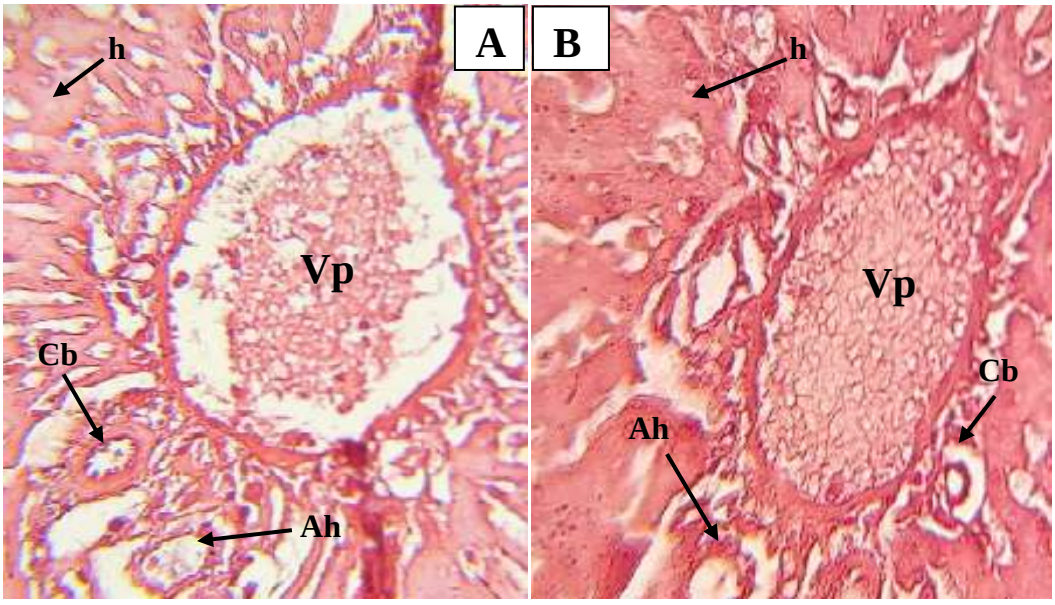


Figure 28 : Tissu parenchymateux hépatique des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour (B). Grossissements : × 100 ; Coloration par *Hémalun éosine*

Vp : Veine porte ; **Cb** : Canal biliaire ; **Ah** : Artère hépatique ; **h** : hépatocyte

Concernant l'influence de l'administration subchronique de la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour sur les reins, l'analyse des résultats d'étude histopathologique ont montré que la mixture n'a pas provoquée de modifications rénales significatives chez les rats.

Il faut rappeler que les reins se forment d'environ un million d'unités structurales appelées néphrons. Chaque néphron contient des tubules et d'un glomérule entourés par des vaisseaux sanguins. Quant à l'effet, l'étude microscopique des coupes tissulaires rénales supposerait que la mixture n'induit aucune destruction de ces unités structurales rénales (néphrons) et que les glomérules ont gardé leur structure anatomique normale avec des pelotons capillaires denses, capsule de Bowman restreinte et d'espace glomérulaire fermée. Le tube contourné distal, est reconnaissable par la présence d'une grande lumière avec absence de bordure en brosse alors que le tube contourné proximal est caractérisé par la présence de bordure en brosse formée de nombreuses microvillosités. Par conséquent, l'administration subchronique de la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour n'affecterait pas ni intégrité ni fonctions des structures rénales (figure 29).

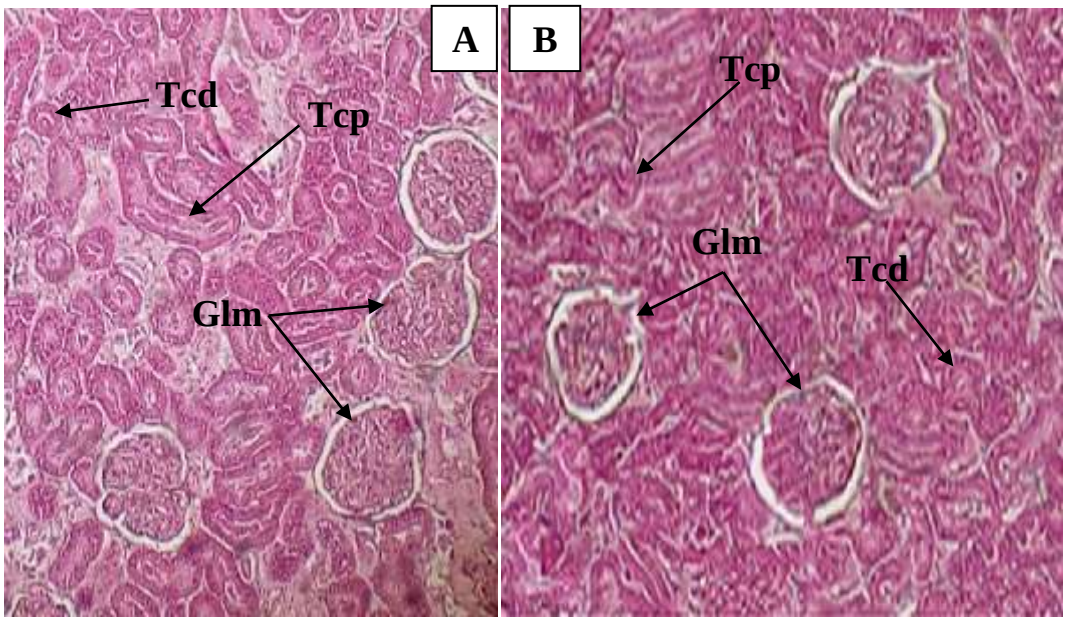


Figure 29 : Tissu cortical rénal des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour (B). Grossissement : × 100 ; Coloration par *Hémalun-éosine*

Glm = glomérule ; **Tcd** = tube contourné distal ; **Tcp** = tube contourné proximal

2.5 Hépatotoxicité

2.5.1 Analyse des paramètres biochimiques

Le dosage des transaminases (ASAT et ALAT) est souvent utiliser dans l'étude des fonctionnements hépatiques après exposition à des traumatismes. Les résultats de dosage des taux des transaminases (ASAT (U/L) ; ALAT (U/L)) des rats recevant ou non de la mixture de *T.a* et d'*A.h* après administration de tétrachlorure de carbone sont présentés dans le tableau 13. Les taux de deux enzymes hépatiques dosé dans le sérum récupéré des rats traités par le

tétrachlorure de carbone seul (groupe 3) sont révélés significativement très élevés que celles dosé dans le sérum des rats traités avec le tétrachlorure de carbone et la mixture (CCl_4+Mix) (groupe 4). De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les taux des transaminases des rats témoins (non traités) (groupe 1) et ceux traités par la mixture uniquement (groupe 2) ni ceux recevant le CCl_4 et la mixture parallèlement. Les taux des transaminases ont augmenté de manière hautement significative chez les rats recevant seulement le CCl_4 (groupe 3) par rapport à ceux des rats non-traités (groupe 1).

Sur la base de ces résultats, il est évident que l'administration orale de la mixture à une dose de 150 mg/Kg maintenu le taux des transaminases autour des valeurs normales chez les rats ayant un foie endommagé par le CCl_4 (groupe 4) durant toute la période du traitement ce qui prouve peut être que cette dernière menée d'une activité hépatoprotectrice.

Tableau 13 : Doses de taux sériques des transaminases (ASAT ; ALAT) des rats témoins (groupe1), mixture d'huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* (groupe 2), CCl_4 seul (groupe 3) et CCl_4 combiné de 150 mg/kg de la mixture (groupe 4).

Paramètres biochimiques	**Groupes des rats**			
	Groupe contrôle 1	**Groupe 2 (Mix)**	**Groupe 3 (CCl_4 seul)**	**Groupe 4 (CCl_4 +Mix)**
ASAT (U/L)	196±40,72	201±2,62	872±58,89	283±39,93
ALAT (U/L)	43,13±1,041	47,29±1,583	73±2,31	45±1,57

2.5.2 Altérations macroscopiques et histopathologiques

L'examen histopathologique du foie excisé des rats non traités (groupe 1) indique que ces derniers présentent un tissu hépatique normal avec une architecture cellulaire normale formée des hépatocytes teintées, veine centrale bien différenciée et d'espaces sinusoïdaux (Figure 29 A). Cependant, le foie des rats intoxiqués par CCl_4 (groupe 3) ont montré de graves modifications histopathologiques centrolobulaires et graisseuses indiquant une hypertrophie, dégénérescence ballonnée, nécrose, cavitation, infiltration lymphocytaire avec la présence des cellules de Kupffer ainsi que des kystes de tailles différentes. Si on le compare avec le foie des rats traités simultanément par la mixture et CCl_4 (groupe 4) ces dernières montres, après étude histopathologique, un parenchyme hépatique normal sans aucune lésion décrites précédemment. Cependant, aucune lésion histopathologique n'a été détectée dans les coupes histologiques du foie des rats traités par la mixture uniquement (groupe 2) par rapport à ceux des rats non-traités (groupe 1) (figure 30 et 31).

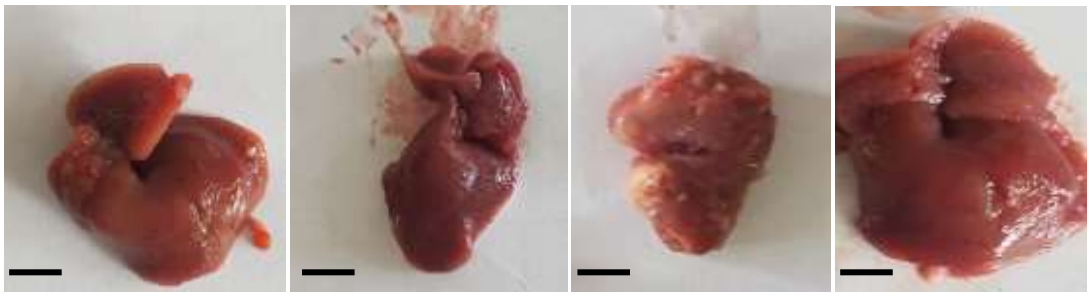


Figure 30 : Photographies du foie récupérées des rats expérimentaux. (**A**) : Foie des rats non traités ; (**B**) : Foie des rats du groupe 2 traités par la mixture ; (**C**) : Foie des rats recevant CCl_4 seul ; (**D**) : Foie des rats recevant CCl_4 et traités par la mixture (groupe 4). La barre d'échelle : 10 mm

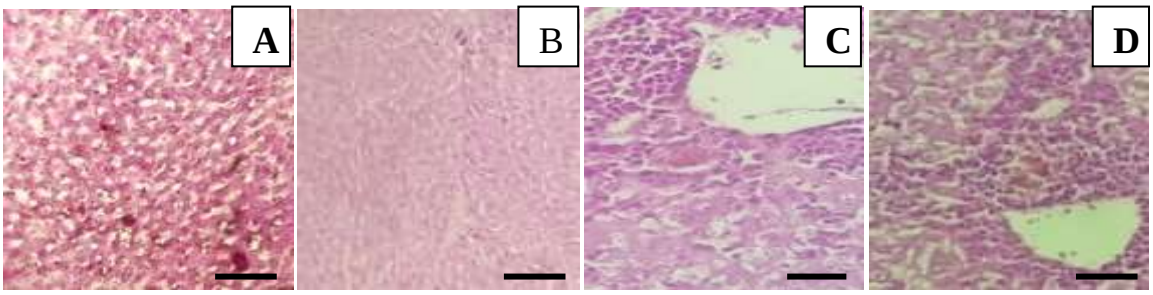


Figure 31 : Photomicrographies microscopiques des sections de foie colorées par l'hématosine et éosine. Grossissement : X40 (**A**) : Section hépatique du parenchyme normal des rats non-traités (groupe 1) ; (**B**) : section hépatique du parenchyme normal des rats traités par la mixture seule (groupe 2) ; (**C**) section hépatique des rats recevant CCl_4 avec dégénérescence, cavitation et nécrose (groupe 3) ; (**D**) : section hépatique des rats traités simultanément par CCl_4 et la mixture avec des modifications histologiques non-significatives. Barre d'échelle : 10 mm

Le foie représente l'organe clé de régulation, impliqué dans divers processus physiologiques dont la détoxification, métabolisme des xénobiotiques ainsi qu'un rôle immunitaire. Plusieurs substances chimiques peuvent provoqués des lésions hépatiques chroniques tels que le tétrachlorure de carbone (CCl_4) qui induit une hépatotoxicité suite à leur transformation en CCl_3 qu'a une grande affinité aux lipoprotéines conduisant ainsi à une peroxydation des lipides du réticulum endoplasmique. Le model d'induction d'hépatotoxicité par CCl_4 *in vivo* est un modèle largement utilisé pour étudier les lésions hépatiques chimio-induites, les dysfonctionnements hépatiques et pour évaluer le pouvoir hépatoprotecteur des xénobiotiques.

Dans notre étude, après prétraitement des rats par la mixture à une dose de 150 mg/Kg on souligne que les coupes histologiques ne montrent aucune altération biochimique ni histologique du tissu hépatique. Cependant, le traitement curatif des rats par la mixture après intoxication par CCl_4 (groupe 4) ne présente aucune altération tissulaire par rapport aux rats non traités intoxiqués par CCl_4.

Les résultats de cette étude histopathologique prouve que l'administration orale de la mixture de *T.a* et d'*A.h* à une dose de 150 mg/kg a un grand pouvoir hépatoprotecteur contre les lésions hépatiques induites par CCl_4 en maintenant les taux sériques des enzymes hépatiques autours des valeurs normales et en bloquant l'apparition des lésions tissulaires hépatiques.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons abordé la toxicité aigüe, subaigüe ainsi que l'hépatotoxicité des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *thymus algeriensis* ainsi que leur mixture à une dose de 150 mg/kg. Suite aux résultats d'études biochimiques et histopathologiques nous avons prouvé l'innocuité de la mixture et que cette dernière ne présente aucun signe de toxicité biochimique ou histologique. Pour la poursuite de nos investigations sur les deux huiles essentielles et de leur mixture, nous pensons nous consacrer plus particulièrement aux études pharmacologiques *in vivo* qui ne font l'objet d'aucune étude pharmacologique. Cela nous permettra peut-être d'identifier les vertus thérapeutiques pharmacologiques des huiles et de la mixture.

II. Activités pharmacologiques *in vivo* des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* et de *Thymus algeriensis* et leur mixture

1. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation du pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis* ainsi que leur mixture a été testé selon la méthode de Winter (Winter.,1962). Après ce test pharmacologique, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition des œdèmes et comparés à ceux de l'anti-inflammatoire de référence, la Diclofénac à 1%.

La figure 32 montre l'évolution de pourcentage d'inhibition d'œdème induit par la carragénine en présence de traitement par la Diclofénac (1%), d'huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis* et de mixture de deux huiles essentielles (ratio 1/1) à une dose de 150 mg/kg.

La mixture, composée de deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* à une dose de 150 mg/kg montre un pouvoir important à inhiber d'une manière significative l'œdème de la patte postérieure avec une inhibition maximale atteinte de 89.99±4.08 dans les mêmes conditions, la Diclofénac (1%) a une inhibition maximale de 88.57±0.81 à la 6ème heure après l'injection de la carragénine. Ainsi les huiles essentielles de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* à une dose de 150 mg/kg l'en inhibe de 83.33±00 et 79.11±3.22 respectivement à la même heure. Cela suggère que les huiles essentielles de deux plantes étudiées séparément ont un effet anti-inflammatoire inférieur à ceux de la Diclofénac 1%. Cependant, ces pourcentages d'inhibition indiquent que la mixture de deux essentielles d'*A.h* et de *T.a* à une dose de 150 mg/kg est dotée d'une activité anti-inflammatoire plus puissante que celle de l'anti inflammatoire de référence (la Diclofénac 1%). À partir de ces résultats nous avons noté que nos échantillons inhibent l'œdème d'une manière dose-dépendante et à toutes les phases et nous permettent de les classer par rapport au Diclofénac selon leur pouvoir anti-inflammatoire par ordre décroissant :

Mix (150 mg/kg) > Diclofénac 1% > *T.a* (150 mg/kg) > *A.h* (150 mg/kg)

L'œdème induit par l'injection de la carragénine est considéré comme un modèle animal, largement utilisé pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire des nouveaux composés ainsi que pour étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le processus inflammatoire (Suresh *et al*.,2018). La carragénine est un mucopolysaccaride sulfaté provoque la libération des pro-inflammatoires (médiateurs chimiques stimulateurs du processus

inflammatoire périphérique) à savoir l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et les prostaglandines (Chelucci *et al*.,2014).

Malgré le large champ d'efficacité des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), sont utilisés ainsi pour la prise en charge de plusieurs pathologies à savoir les douleurs, la fièvre et les inflammations. Ces médicaments ont plusieurs effets indésirables (les ulcères gastro-intestinaux, les troubles rénaux …) résultent de l'inhibition de COX2 (Cyclooxygénase 2) qu'est une protéine constitutive joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité tissulaire (Klein & Eliakim.,2010). Ces effets indésirables rendent le recours vers les plantes médicinales, comme source alternatif d'exploitation des nouvelles molécules efficaces sans effets indésirables une nécessité.

Cette puissante activité anti-inflammatoire de notre mixture serait alors imputable aux interactions synergiques entre les composés phénoliques présents dans ces deux huiles essentielles. Ainsi la forte inhibition de l'œdème a été observée après cinquième heure de l'injection de la carragénine aussi bien pour la mixture que pour la Diclofénac 1%. Cela suggère que l'action inhibitrice de la mixture s'exercerait d'avantage sur les cyclooxygénases qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines.

Dans la littérature, aucune étude *in vivo* sur l'activité anti-inflammatoire de *T.a* et d'*A.h* n'a été abordée. En revanche, les deux études qu'ont été réalisées par Sharma., 2011 & Habibur *et al*., 2015 sur le potentiel anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*A.herba-alba in vitro* sur la dénaturation des protéines de BSA ont montrées que l'huile essentielle d'*A.herba-alba* à une dose de 50 mg/kg a un pourcentage d'inhibition de dénaturation supérieure à celle du médicament de référence (Diclofénac) et par conséquence, un potentiel anti-inflammatoire important puisque la dénaturation protéique est une des causes de l'inflammation (Bagad *et al*., 2011). D'autre part et d'après les résultats de Sobeh *et al*.,(2020), l'extrait alcoolique de *T.a* d'Algérie a démontré une activité inhibitrice de COX2 encore plus élevé que le Celecoxib et Diclofénac (1%) utilisés comme contrôles positifs. Les résultats de ces études confirment les nôtres et prouvent que la *T.algeriensis* et *A.herba-alba* sont dotées du pouvoir anti-inflammatoire plus important.

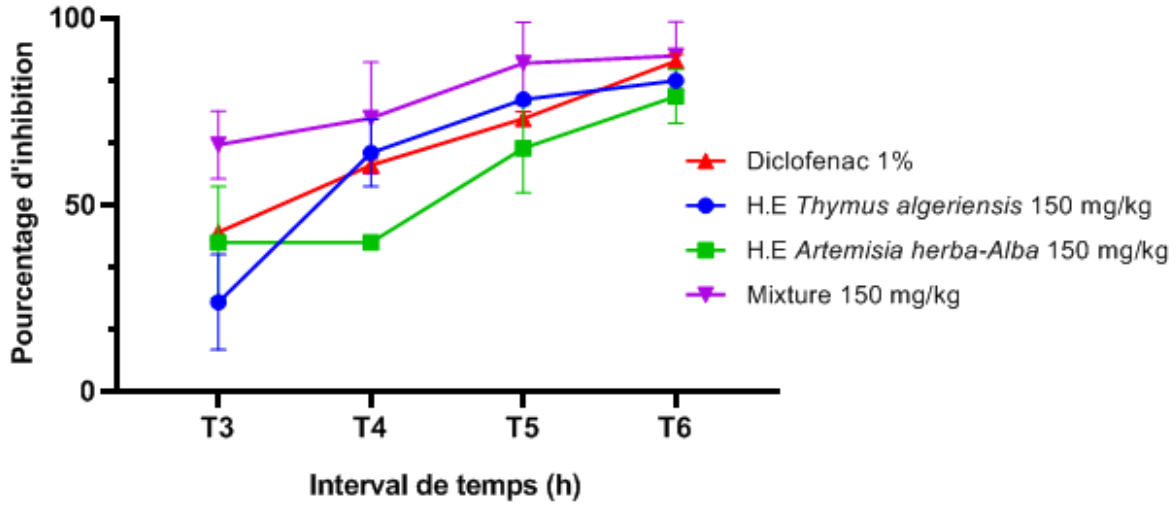


Figure 32 : Effet anti-inflammatoire des huiles essentielles de *T.a* et *A.h* ainsi que sa mixture administrée par voie orale à une dose de 150 mg/kg et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit par la carragénine chez le rat. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin. (n=3)

2. Activité analgésique

L'étude de l'effet analgésique périphérique de deux huiles essentielles et de leur mixture est basée sur les contractions induites par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique.



Figure 33 : Disposition d'un lot de quatre rats après test de torsion induite par l'acide acétique.

Au fil du temps, on observe une augmentation du nombre de contraction abdominale et d'étirement des membres postérieurs. Cette augmentation est plus significative chez les lots traités avec l'huile essentielle de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* à une dose de 150 mg/kg que chez les lots traités avec l'analgésique de référence (sodium salicylate) et la combinaison d'huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* (ratio 1/1/) à une dose de 150 mg/kg. Les résultats de cette expérience sont illustrés dans la figure 34.

Nous avons noté que les rats traités par la mixture à une dose de 150 mg/kg ont un nombre des crampes (contractions abdominales) significativement moins élevé que celui du groupe

traité par l'analgésique de référence (Sodium salicylate), avec 29,80±1,92 et 42,00±2,70 respectivement. Quant aux deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* administrés séparément à une dose de 150mg/kg ont un effet analgésique légèrement inférieur à celui de Sodium salicylate avec un nombre de torsions respectivement d'ordre de 52,40±3,10 et 47,20±1,74.

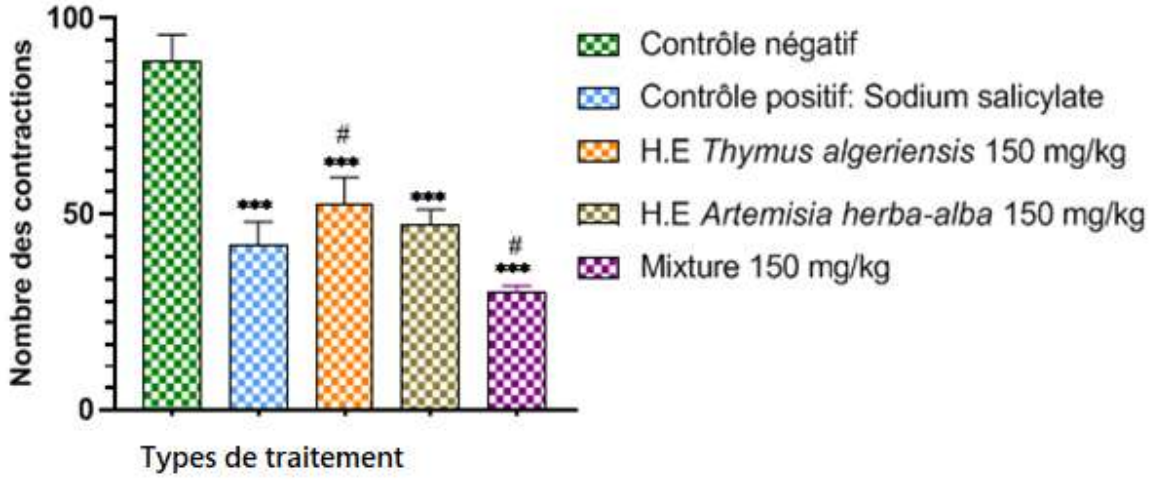


Figure 34 : Activité analgésique des huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* et de leur mixture comparés à celle du contrôle positif (Sodium salicylate). Les valeurs sont exprimées en moyen± erreur standard moyen (n=5) ; *** : p <0.001 comparer au contrôle négatif ; ≠ : p<0.05 comparer au contrôle positif.

Le test de writhing est un test qui permet de déterminer le pouvoir analgésique périphérique. Suite à l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique aux rongeurs, plusieurs médiateurs chimiques ont été mis en évidence dans ses exsudats péritonéaux (Xin *et al*.,2012), ce qui implique que l'acide acétique favorise le mécanisme nociceptif périphérique par libération de nombreux médiateurs chimiques tels que l'histamine, les prostaglandines PGE2 et PGEα, la sérotonine et la bradykinine (Suresh *et al*.,2018). Dans une autre étude, l'extrait méthanolique de *Vitex congolensis,* qui appartient à la même famille de *T.algeriensis* (Lamiaceae), montre une excellente activité analgésique à une dose de 300 mg/kg **(**Sobeh *et al*.,2020). La mixture des deux huiles essentielles de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* à une dose de 150 mg/kg de pc présente un effet analgésique très significatif qui pourrait être en rapport avec la présence des composés phénoliques au sein des deux plantes.

La bioactivité des huiles essentielles et de leur mixture pourrait être attribuées à certains composants identifiés à l'analyse chromatographique, comme le thymol. L'étude de Marsika *et al*., indique que le potentiel du thymol comme une molécule anti-inflammatoire à une dose de 100 mM via l'altération de la biosynthèse de la prostaglandine en inhibant la

cyclooxygénase (COX) (Marsik *et al*.,2005). Dans une autre étude *in vivo*, le thymol isolé de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia gracilis* a démontré une puissante capacité à inhiber la formation d'œdème induite par la carragénine à une dose de 200 mg/kg (Mendes *et al*.,2010) D'autres études ont rapporté la capacité de la molécule à inhiber la réponse immunitaire des lymphocytes T, à améliorer les cellules T-Helper-1 (Th1) et à inhiber la peroxydation lipidique, la glycation et la dyslipidémie . Il a été signalé également que le thymol exerce un effet analgésique important via les récepteurs A2-adrénergique des cellules nerveuses (Ku *et al*.,2013).

Conclusion

Les résultats significatifs obtenus lors de ces études pharmacologiques ont montré que les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* uniques ou combinés en une mixture à une dose de 150 mg/kg dotés d'une activité anti-inflammatoire et analgésique très importantes par rapport eu médicaments de référence ainsi qu'une capacité hépatoprotectrice intéressante. Ces résultats constituent une base scientifique qui justifie l'utilisation traditionnelle fréquente de *T.a* et d'*A.h* dans la prise en charge de plusieurs pathologies à composante inflammatoire comme l'eczéma, le paludisme, l'ulcère gastrique, la Polyarthrite rhumatoïde et les cancers. Cela ouvre de nouvelles possibilités d'utilisation de ces huiles essentielles à des pathologies inflammatoires plus précises ou à d'autres applications liées à l'industrie pharmaceutique.

III. Activités biologiques *in vitro*

Il y'a peu de recherches consacrées à l'étude des propriétés biologiques des huiles essentielles de deux plantes médicinales étudies (*T.algeriensis* & *A.herba-alba*). Afin d'évaluer l'impact de ses composés chimiques, ceci nous incités à étudier l'activité antioxydante, antibactérienne et cytotoxicité de ces huiles essentielles et à les comparer à celles des molécules synthétiques ou semi-synthétiques.

1. Activité antioxydante

L'activité anti-oxydante d'un composé reflète sa capacité de résister à l'oxydation induite par les radicaux libres **(**Mohsen & Ali.,2009). Plusieurs méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Cependant, deux essais ont été réalisés pour la mesure de l'activité antioxydante des huiles essentielles des 2 plantes investiguées, y compris le test de DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) et le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Les potentiels antioxydants des huiles essentielles des plantes étudiées ont été déterminés et comparés à l'activité du composé anti-radicalaire étalon, le BHT (Butylhydroxytoluene). Les résultats obtenus sont exprimés en termes de concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres (IC_{50}) sont présentés dans le tableau 14. Les pourcentages d'inhibition sont présentés dans les figures ci-dessous 35 et 36.

Le pouvoir antiradicalaire des huiles essentielles s'accompagne par la réduction du radical $DPPH^{\cdot}$ ainsi que son passage de la coloration violette, qui caractérise la solution initiale de DPPH, en coloration jaunâtre. Ce changement de couleur été mesuré par spectrophotomètre à 517nm, à partir des valeurs obtenues nous avons calculé les pourcentages d'inhibitions en utilisant ainsi la formule décrite précédemment. Grâce à ces pourcentages d'inhibition on a pu tracer les courbes, présentées dans la figure 35, qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en huile essentielle. Ces courbes nous a permis de calculer les valeurs des IC_{50} présentées dans le tableau 14.

Les résultats obtenus ont montré que la mixture des huiles essentielles des deux plantes étudiées a présenté une IC_{50} la plus faible d'ordre de 4,38±0,98 µg/ml, ce qui montre une inhibition significative de l'oxydation induite par le radical DPPH. Cette activité anti-oxydante reste supérieure à celui de la BHT, antioxydant de référence, qu'il a une IC_{50} de l'ordre de 6,16±0,28 µg/ml, nous remarquons aussi que les huiles essentielles des deux plantes médicinales *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba* ont un pouvoir antiradicalaire inférieur à celui de la substance de référence avec des IC_{50} respectivement de 67,85±1,21 µg/ml et 7,84±0,72 µg/ml. Il est évident que la forte activité anti-radicalaire de la mixture est

due aux interactions synergiques entre les composants actifs présents dans ces deux huiles essentielles comme il est déjà d'écrit par Vardar-Unlu *et al*., 2003. Cependant la forte activité anti-oxydante de l'huile d'*Artemisia herba-alba* peut être due à leur profil phytochimique riche en composés phénoliques qui agissent comme des donneurs de l'oxygène et de l'hydrogène singulier (Pérez-Rosés *et al*.,2016). Quant à l'huile de *Thymus algeriensis*, sa valeur d'IC_{50} montre son faible pouvoir anti-radicalaire, le chémotype de *Thymus algeriensis* de la région de Rchida (région orientale du Maroc), été déjà caractérisé par Amarti *et al.*,(2011) comme un faible anti-oxydant avec une IC_{50} d'ordre de 745,6 µg/ml.

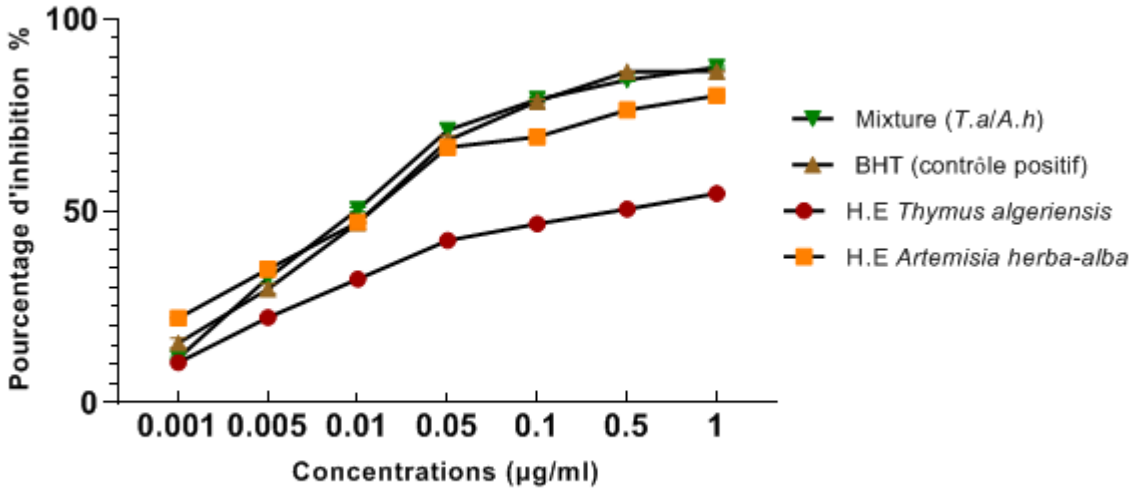


Figure 35 : Profil d'activité anti-oxydante de BHT (butylhydroxytoluène), d'huiles essentielles (*Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba*) et leur mixture. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM ; (n=3)

Tableau 14 : Concentration de BHT, d'huiles essentielles de *T.algeriensis*, d'*A.herba-alba* et de leur mixture (1/1) inhibitrice de 50% (IC_{50}) dans le test DPPH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM ; (n = 3)

Échantillons	IC_{50} (µg/ml)
H.E *Thymus algeriensis*	67,85±1,21
H.E *Artemisia herba-alba*	7,84±0,72
Mixture	4,38±0,98
BHT	6,16±0,28

La réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) est l'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer le potentiel antioxydant des composants des plantes médicinales. Nous avons utilisé la méthode FRAP pour confirmer le pouvoir antioxydant des huiles essentielles ainsi que leur mixture prouvé précédemment par la méthode DPPH.

Les résultats obtenus nous a permis de tracé les histogrammes de la variation de pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations mentionnés sur la figure 36. Ils indiquent que l'étalon (BHT) possède l'effet antioxydant le plus important, avec un pourcentage d'inhibition de 85.77±0.84 µg/ml à une concentration de 1µg/mL, suivi par la mixture avec un pourcentage d'inhibition de 77.32±0.67 µg/ml à concentration de 1µg/mL, en fin, les huiles essentielles d'*A.herba-alba* et de *T.algeriensis* ont montrés des pourcentages d'inhibition maximale de 71.51±0.36 et 69.34±0.06 µg/ml respectivement. Nous remarquons que plus la concentration augmente plus le pouvoir réducteur de nos échantillons augmente ce qui signifié que la capacité de réduction de Fer est proportionnelle à l'augmentation de concentration.

La forte activité antioxydante de l'huile essentielle d'*A.herba-alba* peut être due à ses principaux composés phytochimiques, la chrysanthenone et le camphre, qui peuvent agir comme des donneurs d'oxygène et d'hydrogène (Pérez-Rosés *et al*.,2016). Cependant, la valeur d'IC_{50} de l'huile essentielle de *T.algeriensis* reflète la faible activité antioxydante de cette dernière similaire aux résultats d'Amarti *et al*.,(2011) sur le chémotype de l'est du Maroc (Amarti *et al*.,2011). L'activité antioxydante de la mixture des deux huiles essentielles donne des résultats supérieurs par rapport à l'effet singulier qui indiquait une parfaite synergie des huiles essentielles conduisant à une meilleure activité antioxydante.

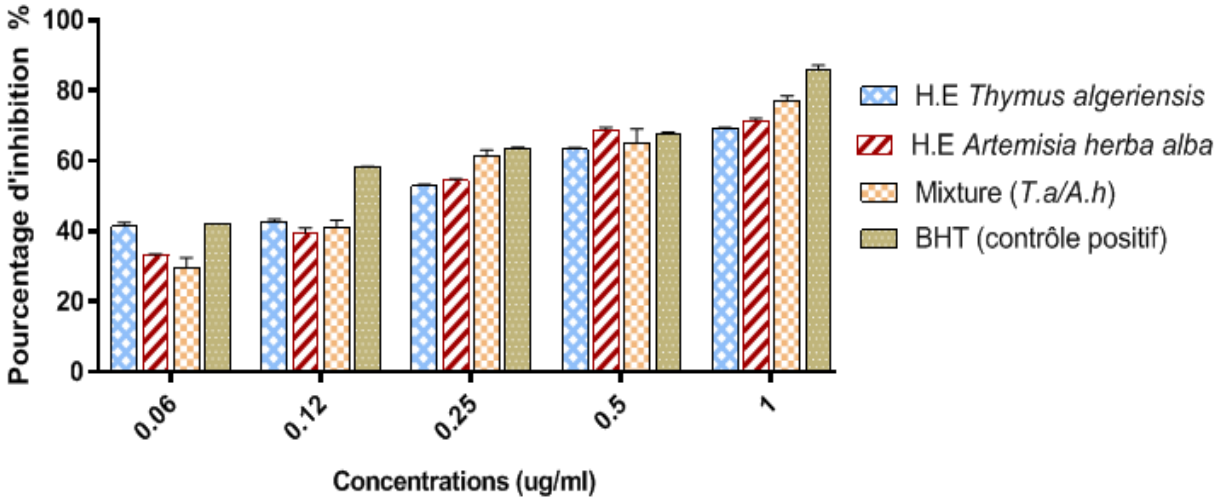


Figure 36 : Histogramme de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin. (n=3)

Les résultats obtenus montrent clairement que l'interaction des molécules ayant une activité antioxydante avec les oxydants ($DPPH^{\cdot}$ et le fer ferrique (Fe^{3+})) dépend de ses structures chimiques. Cela pourrait expliquer cette disparité au niveau des résultats obtenus dans les

deux tests de DPPH et FRAP. Athamena *et al.,* (2010) indiquent que certaines molécules réagissent très rapidement avec le radical DPPH qu'avec d'autres radicaux libres. Ainsi, El Moussaoui *et al,* (2019) montrent que le pouvoir antioxydant d'une huile essentielle ou d'un extrait d'une plante médicinale dépend du temps et de cycles d'extraction. En effet plus ces derniers augmentent plus le potentiel antioxydant des extraits ou d'huile essentielle augmente.

2. Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des huiles essentielles des deux plantes sélectionnées *in vitro*, vis-à-vis trois lignées cellulaires cancéreuses Hep-G2, MCF-7 et MDA-MB-231, a été réalisé à travers la mesure de viabilité cellulaire estimée par l'activité métabolique mitochondriale utilisant le test WST1. Les cellules cancéreuses ont été traitées par les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* uniques ainsi que leur mixture à des concentrations croissantes (0-50 µg/ml) durant 24h à 37°C. Des histogrammes représentant la variation de pourcentage de viabilité cellulaire en fonction des concentrations des différents échantillons sont présentés dans les figures 37,38 et 39.

Les histogrammes ont démontré qu'il y avait une corrélation dose-réponse entre les huiles essentielles ainsi que sa mixture pour l'intervalle des concentrations testées [0-50 µg/ml], bien que plus la concentration augmente la viabilité cellulaire diminue et donc le potentiel antiprolifératif augmente.

D'après les résultats illustrés ci-dessous, il est observé que la mixture d'huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* (ratio1/1) induit un grand pouvoir antiprolifératif d'une manière temps et dose dépendante par rapports aux deux huiles testées séparément vis-à-vis les trois lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF-7 et HepG2 avec des IC_{50} respectivement d'ordre de 0.557±0.018 µg/mL, 0.323±0.040 µg/mL et 0.719±0.012µg/mL. Cet important potentiel antiprolifératif de la mixture peut-être due aux interactions synergiques entre les composants actifs présents dans ces deux huiles essentielles. Nous remarquons aussi que ces dernières ont un pouvoir antiprolifératif inférieur à celui de la mixture, avec des IC_{50} respectivement d'ordre de 0.764±0.010µg/ml, 0.776±0.038µg/ml et 0.986±0.014 µg/ml pour *Artemisia herba-alba* alors que l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* présente des IC_{50} les plus élevées et donc un faible pouvoir antiprolifératif avec des IC_{50} respectivement d'ordre de 1.866±0.030µg/ml, 1.556±0.044µg/ml et 1.026±0.033µg/ml.

Nous avons remarqué que la lignée cellulaire MCF-7 est la lignée la plus sensible à la mixture alors que HepG2 est la lignée la plus résistante. En revanche, l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* exerce un effet cytotoxique puissant contre la lignée cellulaire MDA-MB-231

qu'est une lignée cellulaire cancéreuse mammaire résistante vis-à-vis le traitement chimiothérapeutique cancéreux classique. Toutefois, l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* ne présente pas le potentiel antiprolifératif notable par rapport à l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* avec des IC_{50}>1µg/ml.

Selon Abdeslam Jaafari *et al*.,(2007) *Thymus algeriensis* de la région d'Ait Aatab-Azilal (Haut Atlas de Maroc) dont son composé majoritaire est le carvacrol a une forte activité cytotoxique *in vitro* vis-à-vis la lignée cellulaire tumorale P815 avec une concentration inductrice de 50% de lyse cellulaire (IC_{50}) d'ordre de 0.01%, la même étude prouve que *Thymus maroccanus* de la région d'Asni moulay Brahim- Marrakech (haut Atlas du Maroc) a un pourcentage de lyse atteint 100% à une concentration de 0.5% (v/v) vis-à-vis la même lignée cellulaire tandis que *Thymus satureoides* de la région de Tiznit- (Sud West du Maroc) a une IC_{50} d'ordre de 0.24% avec un pourcentage de lyse atteint seulement 18% à une concentration de 0.0625% (v/v) (Micucci *et al*.,2020). Cette étude suggère que les chémotypes de *Thymus* dont les composés majoritaires sont soit Thymol ou carvacrol ont une activité cytotoxique plus importante que celles avec des composés majoritaires borneol ou paracymene. Dans l'ensemble, l'activité cytotoxique de l'huile essentielle de *T.a* peut-être attribué à ses composés majoritaires tels que le thymol, borneol et carvacrol (El Ouahdani *et al*.,2021).

L'étude d'Arai.,(1988) montre que le Thymol (30–300 mg/ml) d'une manière dose dépendante a une forte activité cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des cellules cancéreuses mammaires on inhibant ainsi la synthèse des acides nucléiques ainsi que les protéines cellulaires. L'étude de Abdelmajid Zyad *et al*.,(2011) montre que les parties aériennes d'*Artemisia herba-alba* dont leur composé abondant est le Verbenol ont une activité anticancéreuse très importante avec une IC_{50} d'ordre de 3 µg/mL, par opposé cette huile essentielle n'a aucun effet cytotoxique ni génotoxique vis-à-vis les cellules normales de l'organisme (PBMC). La forte activité cytotoxique de notre mixture est attribué à la synergique des composés majoritaires des deux huiles essentielles qu'ils ont un grand pouvoir anticancéreux *in-vitro* vis-à-vis plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.

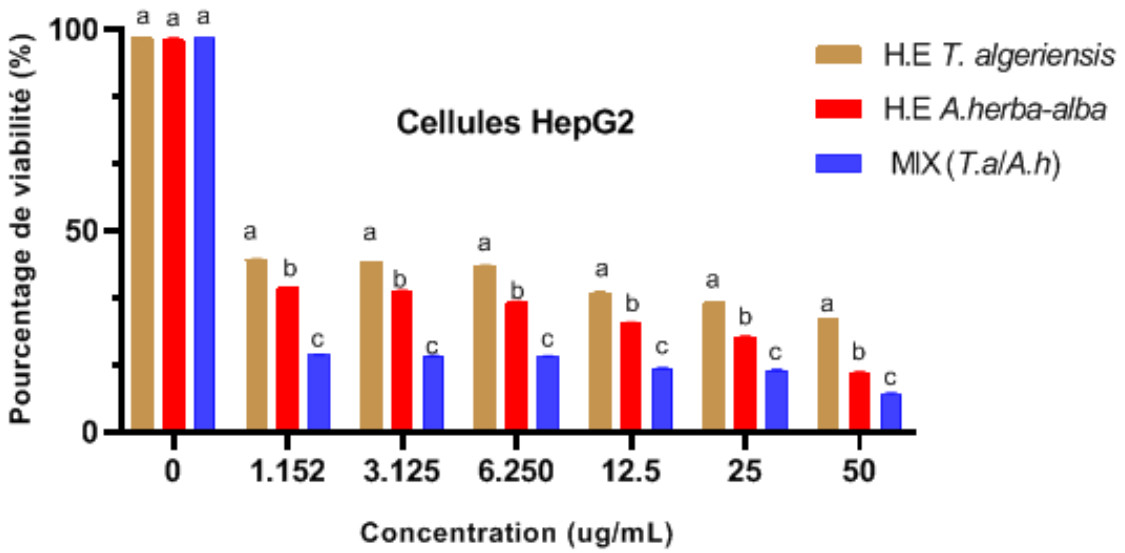


Figure 37 : Histogrammes de l'effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse HepG2. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

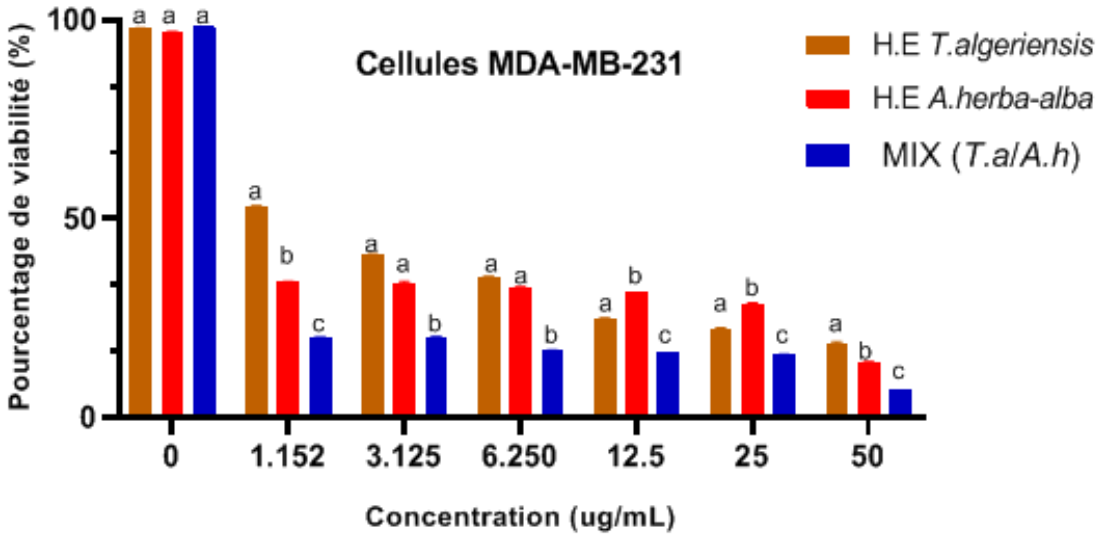


Figure 38 : Histogrammes de l'effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

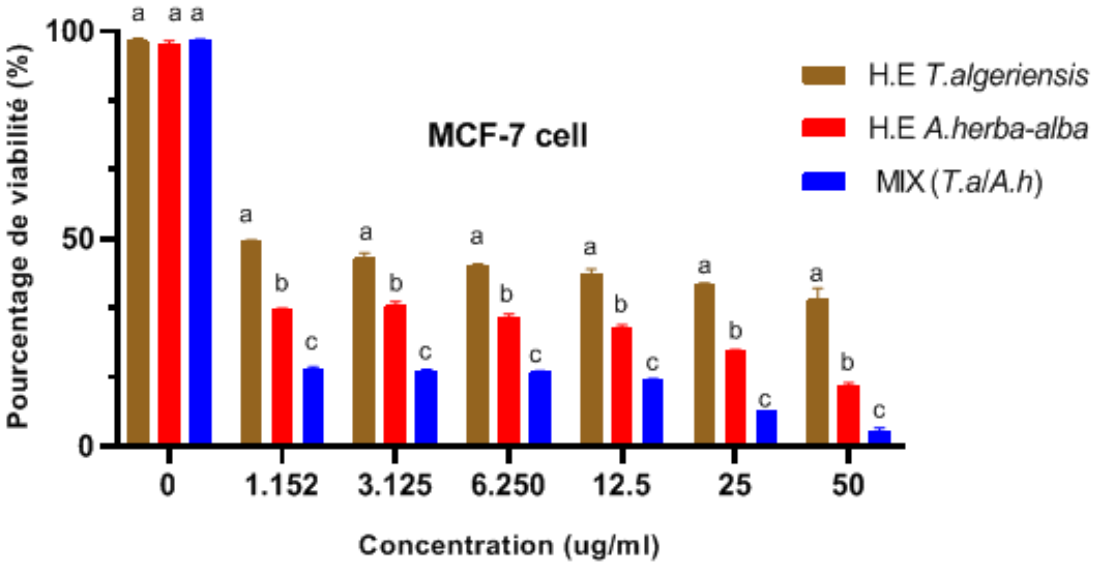


Figure 39 : Histogrammes de l'effet cytotoxique des huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A.herba-alba* et leur mixture vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

Autre que le souci de la résistance bactérienne aux antibiotiques chez les sujets sains qui demeure toujours une des préoccupations des scientifiques, la chimiothérapie anticancéreuse induit l'augmentation des souches mutantes résistantes aux différents antibiotiques chez les patients atteints les différents types de cancers. La recherche des nouvelles molécules d'origine naturelle pour faire face à ce problème devient une nécessité qui nous pousse à évaluer l'activité antibactérienne et antifongique *in vitro* vis-à-vis trois souches bactériennes et deux fongiques.

3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenus à partir des parties aériennes de deux plantes médicinales à savoir *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba* a été testée en utilisant la méthode de diffusion par disque contre trois souches bactériennes : *Bacillus subtilis* ATTC 4230, *Staphylococcus aureus* ATTC 43, *Micrococcus luteus* ATTC 9314 et deux souches fongiques : Ca*ndida albicans* et *Penicillium digitatum*. Le choix de ces souches microbiennes est basé sur leur pathogénicité élevée ainsi que leur fréquence élevée à induire des infections.

Tableau 15 : Inhibition de croissance microbienne de l'huile essentielle de *T.algeriensis*

		Concentration (µg/mL)						
		Contrôle négatif	**50**	**25**	**12.50**	**6.250**	**3.125**	**1.156**
Souches bactériennes	*Bacillus subtilis*	+	-	-	-	-	-	+
	Micrococcus luteus	+	-	-	-	-	+	+
	Staphylococcus aureus	+	-	+	+	+	+	+
Souches fongiques	*Candida albicans*	+	-	+	+	+	+	+
	Penicillium digitatum	+	-	-	-	-	+	+

(+) : Résistance ; (-) : Inhibition.

Tableau 16 : Inhibition de croissance microbienne de l'huile essentielle d'*A.herba-alba*

		Concentration (µg/mL)						
		Contrôle négatif	**50**	**25**	**12.50**	**6.250**	**3.125**	**1.156**
Souches bactériennes	*Bacillus subtilis*	+	-	+	+	+	+	+
	Micrococcus luteus	+	-	+	+	+	+	+
	Staphylococcus aureus	+	-	-	-	-	-	+
Souches fongiques	*Candida albicans*	+	-	-	-	-	+	+
	Penicillium digitatum	+	-	-	-	-	+	+

(+): Résistance ; (-) : Inhibition.

Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle de *T.algeriensis* témoigne d'une activité antibactérienne et antifongique intéressante vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Penicillium digitatum* avec des concentrations d'inhibition d'environ 3.125 µg/ml et 06.25 µg/ml respectivement. À l'opposé, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, hautement pathogènes, ont été les micro-organismes les plus résistantes et ont montré la concentration inhibitrice la plus élevée de 50 µg/ml. C'est résultats ont également été rapportés par Giordani *et al*.,(2008) qui ont constaté que l'huile essentielle de *T.algeriensis* d'Algérie avait une faible activité antifongique contre *Candida albicans*. Par ailleurs, la grande résistance de *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram positif) vis-à-vis cette huile essentielle peut être due à la présence de glycocalyxe ainsi que l'hétérogénicité de la paroi externe bactérienne renfermant l'exopolysaccharide et l'acide téchoïque ainsi que d'autres composés donnent aux

polymères fortement réticulé une forte résistance vis-à-vis les composés chimiques (Perry *et al.*, 2004).

Les résultats illustrés dans le tableau 16 indiquent que l'huile essentielle d'*A.herba-alba* présente une forte activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis les bactéries et les champignons pathogènes testés. Plus précisément, *Staphylococcus aureus*, une bactérie hautement pathogène, a montré une très forte sensibilité à cette huile essentielle avec une concentration inhibitrice de 3.125 µg/ml. Une bonne activité a également été constaté contre *Candida albicans* et *Penicillium digitatum* avec une concentration inhibitrice d'ordre de 06.25 µg/mL. À l'opposé, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis* ont été les bactéries les plus résistantes avec une concentration inhibitrice d'ordre de 50 µg/ ml.

La différence entre l'activité des deux huiles essentielles est due principalement à la composition chimique de ces dernières ainsi qu'aux composés majoritaires. Cette grande activité antibactérienne et antifongique peut-être reliée dans le cas de *T.a* à la présence du thymol, carvacrol et borneol qui sont des composés majoritaires. Certains travaux ont souligné que plus la teneur en composés phénoliques importante, l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles sera élevée (Giordani *et al*.,2007). Le Thymol est un des composés phénoliques qu'ils ont un large spectre d'activité antimicrobienne. Plusieurs études ; Christian & Carole.,(2003) ; Diniz *et al*.,(2020) et parmi lesquelles celle de l'Organisation Mondiale de la Santé ont prouvé que ce composé possède une forte activité antibactérienne et antifongique contre de nombreuses espèces, y compris *S. aureus, E. coli* et *Aspergillus* sp. L'étude de Marino *et al*.,(1999) a révéler que le thymol (32.55%) purifiée de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L a* montré une activité bactériostatique contre plusieurs bactéries Gram positif et négatif. Ainsi une autre étude prouve que le thymol (le composé majoritaire d'huile essentielle de *T.algeriensis*) a une forte activité antibactérienne vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli,* avec des concentrations minimales inhibitrices de 0,31 mg/ml et 5,00 mg/ ml respectivement. Il perturbe les lipides de la membrane plasmique bactérienne qui conduit au relargage du matériel intracellulaire (Sim *et al*.,2019). Trombetta *et al*.,(2005) indiquent que le thymol inhibe la croissance d'*E. coli* on induisant la perméabilité et la dépolarisation de la membrane plasmique bactérienne. L'étude de Pemmaraju *et al*.,(2013) montre aussi que le thymol à 0.12% a une activité antifongique contre *C. albicans* MTCC 227 alors que cette dernière a présenté une résistance vis-à-vis l'huile essentielle de *T.algeriensis*. Tous ces résultats prouvent que les composés phénoliques contenus dans l'huile essentielle de *T.algeriensis* y

compris le composé majoritaire (thymol) sont derrières les activités antifongique et antibactérienne de cette dernière.

L'importante bioactivité de l'huile essentielle d'*A.h* est due à leur richesse en composés oxygénés, Chrysanthenone et camphor comme composés majoritaires ainsi que d'autres composés oxygénés quels que α-terpin-7-al, et trans-β-terpineol. En effet, l'étude de Kordali *et al*.,(2016) a montré que les huiles essentielles des autres espèces d'*Artemisia*, *A. santonicum* et *A. spicigera*, sont caractérisés par leurs richesses en composés monoterpéniques ; ces composés ont un grand pouvoir antimicrobien contre plusieurs souches bactériennes (Rúa *et al*.,2019). Cependant, Channaoui & El araki., (2017) ont montré que l'activité antibactérienne des composés terpéniques diffère d'un composé à l'autre dans l'ordre décroissant suivant :

Hydrocarbures<cétones<alcools<Aldéhydes.

Même si l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est souvent due essentiellement à ses composés majoritaires, d'après Masyita *et al*.,(2022) les interactions entre ces composés induisant soit un effet synergique ou antagoniste doivent être considérées. En outre, Belmekki *et al*.,(2013) mentionnent que les composants minoritaires de l'huile essentielle interagissent avec les composés actifs en contribuant également à un effet synergique ainsi qu'un effet antimicrobien de l'huile essentielle.

Conclusion

À l'issue des tests biologiques effectués dans cette partie de thèse, il ressort que les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* ainsi que leur mixture, ont montré qu'ils sont dotés d'une activité anti-oxydante, antimicrobienne et antiproliférative très remarquables. En plus de l'effet synergique entre les composés des deux huiles essentielles qui rend la mixture remarquablement bioactive vis-à-vis les oxydants et les cellules cancéreuses.

Ces deux huiles essentielles constituent une source de composés chimiques bioactives. Du fait de la richesse d'*A.h* et de *T.a*, en phénols monoterpènes, terpénoïdes et en composés oxygénés. Pour la suite de notre étude, nous avons testés la bioactivité des composés majoritaires d'huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* respectivement la chrysanthenone et le thymol vis-à-vis l'oxydation, la douleur, l'inflammation, le cancer et les infections d'origines microbiennes et fongiques ainsi que l'innocuité de ces deux composés à travers l'étude de toxicité aigüe et subaigüe.

Partie IV : Investigations toxicologiques et pharmacologiques de chrysanthenone et de thymol *in vivo* et *in vitro*

I. Investigations toxicologiques

1. Toxicité aiguë

1.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité

L'étude sur la toxicité de nos molécules a été réalisée selon la ligne directrice 407 (OCDE.,2003). Les signes cliniques apparus chez les rats des quatre lots ont été suivis continuellement le long de la durée d'étude de la toxicité aigüe (14 jours).

Comme le montre le tableau 17, l'administration unique par voie orale de la chrysanthenone seul et de la mixture combinée (chrysanthenone/thymol) n'a entrainé aucun changement notable du comportement général (signes de toxicité) tandis que le lot des rats traité par le thymol unique ont montrés quelques changements du comportement général (à savoir ; l'anorexie, diarrhée et les douleurs abdominales. Les rats de tous les lots traités ont resté en vie après 14 jours d'observation.

Ces résultats impliquent que la DL_{50} de la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) est supérieure à 150mg/kg de pc selon le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques. Cependant, les substances ayant une DL_{50} comprise entre 50 et 500 mg/kg de pc sont toxiques et celles avec une DL_{50} supérieure à 5000 mg/kg sont pratiquement non toxiques. D'après Wichlt & Anton.,(1999) le thymol provoque des douleurs abdominales ainsi qu'un léger collapsus s'il est administré à des doses comprises entre 0.3 et 0.6 grammes. Cependant, aucune étude n'a été rapportée sur la toxicité de chrysanthenone.

Tableau 17 : Résultats de l'observation des animaux durant tous les jours pendant 14 jours après administration orale de thymol, chrysanthenone et leur mixture à la dose de 150 mg/kg

Signes cliniques de toxicité/lot	Group 1 Contrôle négatif	Group 2 Thymol (150mg/kg)	Group 3 Chrysanthenone (150 mg/kg)	Group 4 Thymol/Chry (150mg/kg)
Vomissement	-	-	-	-
Anorexie	-	+	-	-
Diarrhée	-	+	-	-
Difficultés respiratoires	-	-	-	-
Sensibilité à la douleur au bruit	-	-	-	-
Douleur abdominale	-	+	-	-
Convulsion	-	-	-	-
Tremblement	-	-	-	-
Coma	-	-	-	-
Mortalité	-	-	-	-

présence ; (-) : absence

Pendant la période de traitement, le poids corporel des rats du lot contrôle et des deux lots traités par la chrysanthenone unique et par la mixture a resté presque stable, avec une différence non significative de la variation du poids corporel entre les rats traités et ceux du lot contrôle durant 14 jours, tandis que les rats traité par le thymol ont montré une diminution très significative du poids corporel par rapport à ceux du lot contrôle (figure 40). En accord avec L'Agence Européenne des Plantes Médicinales (EMA/HMPC/166517/2015) la mixture (Chrysanthenone/thymol) ainsi que la chrysanthenone à une dose de 150mg/kg sont considérer non toxiques et d'après the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals la DL_{50} de la mixture est supérieure à 150 mg/kg.

L'étude de toxicité de thymol et de chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg montre que l'administration de la combinaison de ces deux molécules par voie orale n'altère jamais la santé des rats et n'induit aucune signe de toxicité.

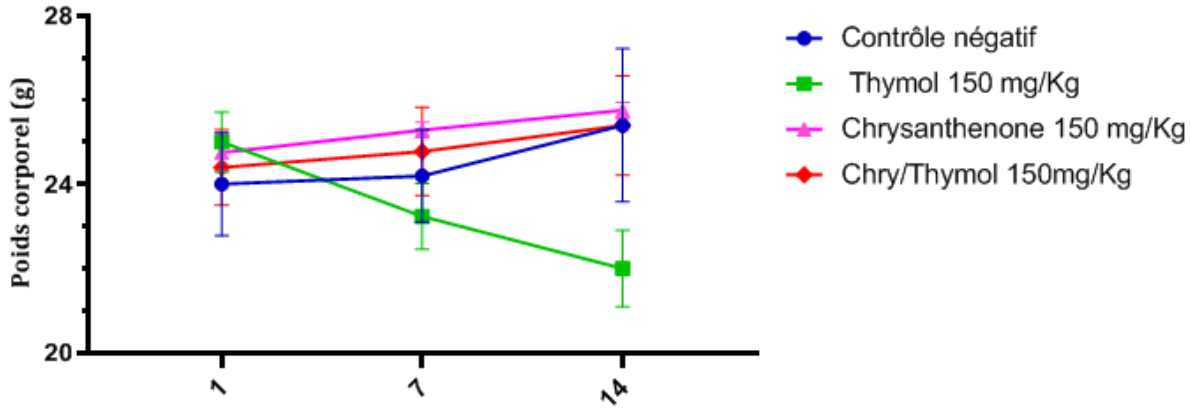


Figure 40 : Variations de poids en fonction du temps des rats traités par le thymol, chrysanthenone et de leurs mixtures administrées par voie orale. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin. (n=5)

1.2 Poids relatifs des organes (ROW)

Après 14 jours du traitement ; les reins, le foie et la rate de tous les rats euthanasiés ont été prélevés et pesés afin de déterminer leurs poids relatifs.

Durant toute la période d'expérimentation, aucune différence significative des valeurs du poids relatifs des organes des rats traités par la chrysanthenone seule et par la mixture (Thymol/chrysanthenone) à une dose de 150mg/kg par rapport à ceux des rats du lot contrôle n'a été observé. Cependant, les poids relatifs des organes des rats traités par le thymol seul à une dose de 150mg/kg ont hautement significatifs par rapport à ceux du groupe contrôle (Tableau 18).

Tableau 18 : Effet de thymol, chrysanthenone et de leur mixture administrée par voie orale à une dose de 150 mg/Kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 14 jours de traitement

Organes	Doses mg/kg			
	Contrôle négatif	**Thymol (150 mg/kg)**	**Chrysanthenone (150 mg/kg)**	**Thymol/Chry (150 mg/kg)**
″Foie″	1,477± 0,094	1,604±0,096	1,511±0,007	1,505±0,008
″Reins″	0,450± 0,005	0,503±0,08	0,462±0,003	0,453±0,002
″Rate″	0,154 ± 0,006	0,159±0,009	0,145±0,004	0,156±0,001

1.3 Paramètres biochimiques

Les analyses biochimiques ont été effectuées pour évaluer les éventuelles altérations des fonctionnements hépatiques et rénales. Cette étude biochimique confirme les résultats précédents de mesure du poids relatifs des organes. L'administration orale de chrysanthenone unique et de la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) n'entraine aucune augmentation significative dans le taux des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, urée et créatinine) en comparaison avec le lot témoin.

Une augmentation très significative a été observée pour l'ASAT, l'ALAT et la créatinine chez les rats du groupe qui a reçu le thymol à une dose de 150 mg/kg par rapport à ceux du groupe contrôle (Tableau 19). Une augmentation des taux d'enzymes hépatiques pourrait indiquer une hépatotoxicité induite par le thymol ainsi le changement dans le niveau plasmatique de la créatinine peut a eux seul indiquer une altération du fonctionnement rénal. D'autant plus que l'étude de variation du poids relatif d'organes a montré une augmentation hautement significative du poids du rein, la rate et le foie chez les rats traités par le thymol à une dose de 150 mg/kg.

Selon Mukinda *et al*.,(2005), l'analyse des paramètres biochimiques, lors de l'évaluation de l'innocuité des plantes médicinales et des xénobiotiques, joue un rôle très important dans l'étude des altérations ou des allergies pouvant être induites par les plantes médicinales.

Tableau 19 : Effet de thymol, chrysanthenone et sa combinaison administrés oralement sur les paramètres biochimiques chez les rats après 14 jours de traitement.

Paramètres	Contrôle négatif	Thymol (150 mg/kg)	Chrysanthenone (150 mg/kg)	Thymol/Chry (150 mg/kg)
"Urée (g/l)"	0,39 ± 0,02	0,42±0,05	0,37±0,07	0,38±0,02
"Créatinine (mg/l)"	3,67 ± 0,33	3,99±0,42	3,71±0,24	3,63±0,23
"ASAT (UI/l)"	196 ± 2,72	203±2,05	194±2,09	193±1,86
"ALAT (UI/l)"	26,67 ± 2,19	28,04±2,41	25,94±1,64	23,17±2,06

Suite aux résultats de toxicité aiguë qui indiquent que l'administration unique par voie orale de la mixture cde thymol/chrysanthenone combinée à une dose de 150 mg/Kg ne montre aucuns signes cliniques de toxicité, n'entraine ni variation du poids corporel ou ceux d'organes, ni variation des paramètres biochimiques. Nous avons resté focaliser sur l'étude de toxicité de cette mixture combinée, ainsi que les deux molécules de thymol et de chrysanthenone par administration multiple, journalière et pendant une longue période (toxicité subaigüe).

2. Toxicité subaiguë

2.1 Suivi du poids corporel des animaux et signes de toxicité

L'administration orale de chrysanthenone et de la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) par voie orale à une dose de 150 mg/kg/jour durant 4 semaines (28 jours), n'a pas entrainé la mort des rats. Tout au long de la période d'étude les observations n'ont révélées aucun changement statistiquement significatif dans le comportement général, la santé physique ou la mortalité des rats des deux lots traités. Le poids corporel des deux groupes des rats est resté stable au fil du temps et il n'y avait pas de différence significative dans la variation de ce dernier en comparaison à ceux des rats témoins pendant 28 jours (Figure 41).

L'observation des rats traités par le thymol durant 28 jours de gavage a montré l'apparition des signes de toxicité, une diminution statistiquement significative du poids corporel des rats de ce lot en comparaison à ceux des rats du lot control. Aucun cas de mortalité n'a été constaté.

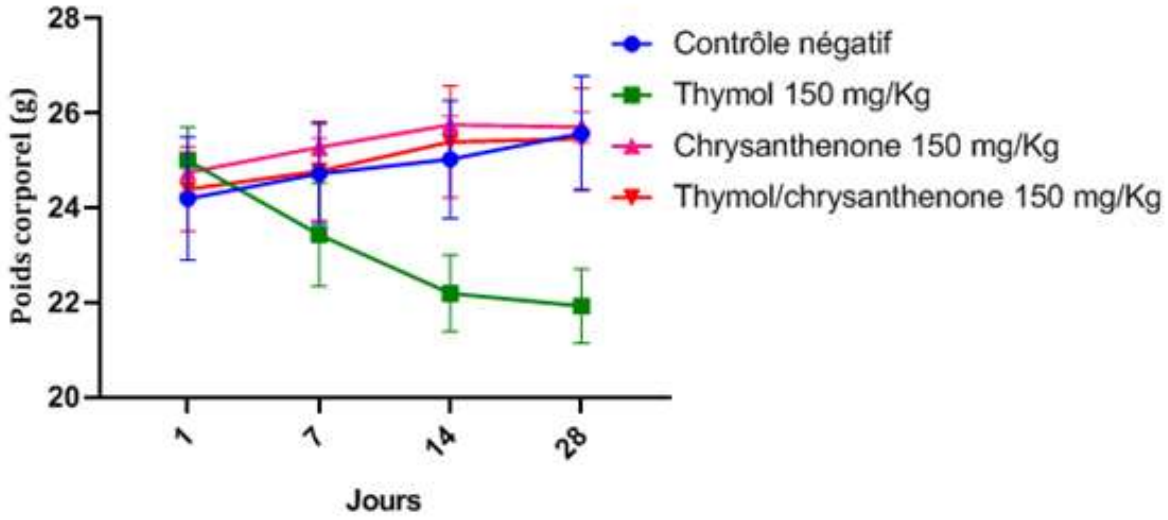


Figure 41 : Effet du traitement par le thymol, chrysanthenone et leur mixture combinée, administrés par voie orale à une dose de 150 mg/kg, sur l'évolution du poids corporel des rats traités par rapport au contrôle négatif. Les valeurs sont exprimées en moyenne± erreur type de la moyenne avec (n=5).

2.2 Poids relatif des organes

L'examen macroscopique des trois organes prélevés (le foie, les reins et la rate) après 28 jours de gavage n'a montré aucun changement morphologique, de couleur ou de la texture des organes des rats traités par le chrysanthenone et par la mixture combinée (Thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg en comparaison avec ceux des rats témoins (contrôle négatif). Aucune variation significative du poids des organes n'a été indiquée entre les trois organes des rats traités et ceux des rats témoins. On suggère que l'administration quotidienne de la mixture à une dose de 150 mg/kg durant 28 jours n'entraine aucune altération sur la croissance normale des rats. Cependant, les trois organes prélevés des rats traités par le thymol à une dose de 150 mg/kg présentent des variations morphologiques à savoir ; l'hypertrophie, changement de la texture ainsi que la couleur du foie et des reins avec une augmentation significative du poids des organes par rapport à ceux des rats témoins (Tableau 20). l'hypertrophie et l'augmentation du poids du foie peut être due à due à la congestion avec une réservation du sang à l'intérieur du foie (Ramezani *et al*.,2008).

Tableau 20 : Effet de thymol, chrysanthenone et de leur mixture administrée par voie orale à la dose de 150 mg/kg sur le poids des organes prélevés chez les rats après 28 jours de traitement

	Contrôle négatif	**Thymol 150 mg/kg**	**Chrysanthenone 150 mg/kg**	**Thymol/chrysanthenone 150 mg/kg**
"Foie"	1,477± 0,033	1,610±0,058	1,509±0,038	1,489±0,036
"Reins"	0,471± 0,014	0,567±0,048	0,487±0,006	0,481±0,01
"Rate"	0,154 ± 0,005	0,164±0,004	0,157±0,002	0,159±0,006

2.3 Paramètres biochimiques

Après 28 jours du traitement, le dosage de certains paramètres biochimiques a été effectué afin d'étudier l'effet de l'administration de thymol, chrysanthenone et de leur mixture combinée sur l'intégrité et le fonctionnement des reins et du foie. Les résultats sont figurés dans le tableau ci-dessous confirment les résultats précédents de mesure du poids relatifs des organes.

En superposant nos résultats obtenus pour les différents traitements, il apparait qu'à la fin du traitement que l'administration quotidienne de chrysanthenone et de la mixture combinée à une dose de 150 mg/Kg durant 4 semaines n'entraine aucune augmentation significative des taux sériques d'ASAT, ALAT, d'urée et de créatinine en comparaison avec ceux des rats témoins. Concernant l'effet toxique du thymol, après 28 jours d'administration quotidienne on

constate qu'il ya augmentation significative de taux de toutes les enzymes sériques hépatiques (ASAT et ALAT) et rénales (urée et créatinine) en comparaison à ceux des rats non traités. Suggérant que l'administration du thymol peut être induite des altérations tissulaires au niveau du foie et des reins. Ces résultats confirment les résultats précédant du poids relatifs d'organes.

Au niveau fonctionnel, les reins ont pour rôle l'épuration sanguine ainsi que l'élimination des déchets métaboliques, alors que le foie a pour rôle la détoxification et la neutralisation des xénobiotiques (Lonare *et al*.,2014). L'évaluation de la toxicité des xénobiotiques, des médicaments et des extraits des plantes peut donc être étudiée à partir du dosage sérique des différents marqueurs hépatiques et rénaux tels que l'ASAT, l'ALAT, la créatinine et l'urée.

L'analyse des résultats de cette étude ont montré que la chrysanthenone ainsi que la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg n'ont provoqués aucune modification significative des taux sériques des enzymes hépatiques et rénales. Ceci suppose que ces deux échantillons n'influencent pas des mécanismes hépatiques et rénales responsables de la régulation du métabolisme des xénobiotiques.

Par contre, le thymol à une dose de 150 mg/kg induit l'augmentation des taux sériques d'enzymes hépatiques et rénales révélant ainsi une altération des fonctionnements hépatiques et rénaux qui endommagerait les structures hépatiques et rénales.

Tableau 21 : Effet de thymol, chrysanthenone et sa combinaison administrés oralement sur les paramètres biochimiques chez les rats après 28 jours de traitement.

Paramètres	Contrôle négatif	Thymol (150 mg/kg)	Chrysanthenone (150 mg/kg)	Thymol/Chry (150 mg/kg)
"Urée (g/l)"	0,425±0,036	0,527±0,028	0,481±0,012	0,493±0,024
"Creatinine (mg/l)"	3,63 ±0,105	4,136±0,124	3,781±0,071	3,757±0,109
"ASAT (UI/l)"	194 ±3,162	206±5,12	194,60±1,140	196±1,87
"ALAT (UI/l)"	26,63± 0,762	28,780±0,221	27,053±0,131	26,114±0,606

Afin de s'assurer l'hépatotoxicité et la toxicité rénale du thymol ainsi que l'innocuité de la chrysanthenone et de la mixture combinée, des analyses approfondies sont nécessaires qui vont les confirmées ou infirmées les résultats précédents.

2.4 Histopathologie des organes

À propos l'influence de thymol, à une dose de 150 mg/kg, sur l'intégrité et le fonctionnement du foie, l'analyse des résultats histologiques a révélé une architecture anomale partiellement effacée du tissue hépatique en raison d'une souffrance hépatocytaire avec des veines anormaux marquant des congestions vasculaires, des amas de polynucléaires neutrophiles et

des lymphocytes en péri-veine centrolobulaire ainsi qu'un infiltrat inflammatoire modéré (figure 42/B) par rapport aux coupes tissulaires du foie des rats du groupe contrôle qui montrent une structure anatomique normale sans aucune désorganisation de l'architecture hépatique ou lésions cellulaires ou tissulaires (Figure 42/A). Ces résultats expliquent souvent la diminution du poids corporel et l'amaigrissement l'hypertrophie du foie des rats traités par le thymol (Rasheed *et al*.,2009).

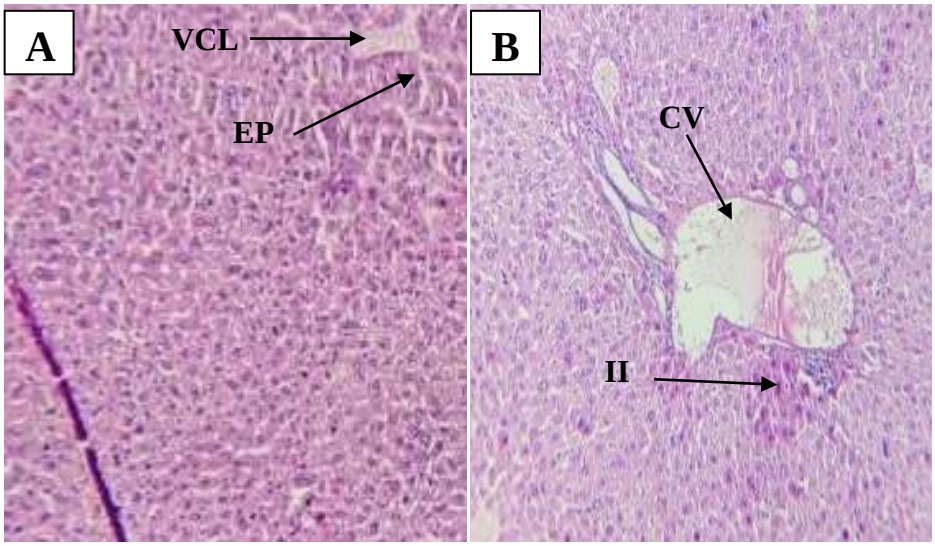


Figure 42 : Tissu parenchymateux hépatique des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par le thymol à une dose de 150 mg/Kg/jour (B). Grossissements : × 100 ; Coloration par Hémalun éosine

VCL : Veine centrolobulaire ; **EP** : espace porte ; **Cv** : Congestion vasculaire ; **II** : infiltrat inflammatoire

Concernant l'influence de l'administration subchronique de thymol à une dose de 150 mg/kg/jour sur les reins, l'analyse des résultats d'étude histopathologique a démontré des modifications histopathologiques caractérisés par des nécroses tubulaires, des congestions veineux et des infiltrats inflammatoires rénaux ainsi que des foyers de polynucléaires en comparaison avec le tissu rénal des rats du groupe contrôle qui montrent une architecture normale avec des tubules, des glomérules normaux et des vaisseaux (figure 43/B).

Partant de ce fait, ces altérations structurales dans le tissu hépatique et rénal suite à l'administration uni-quotidienne répétée de thymol suggèrent de classer ce dernier dans la catégorie des substances toxiques à la dose de 150 mg/kg/jour. Étant donné que durant les 28 jours de l'étude, le thymol a induit une chute très remarquable de la croissance pondérale des rats traités. Toutefois, il y'a eu une différence très significative du poids corporel à la dernière pesée (28 ^{éme} jours). Concernant le poids relatif d'organes une augmentation significative a été trouvée entre le groupe contrôle et le groupe des rats traités par le thymol à une dose de 150

mg/kg, cette augmentation qui pourrait être due à la congestion vasculaire (Ramezani et *al*.,2008). Les analyses biochimiques réalisées ont montrés une augmentation significative des taux sériques d'enzymes hépatiques (ASAT/ALAT) et d'enzymes rénales (urée/créatinine).

Les transaminases ou les amino-transférases (ASAT/ALAT) sont des enzymes synthétisées au niveau du cytoplasme des cellules hépatiques, rénales, pancréatique et musculaire de et déchargées dans la circulation sanguine, lorsque ces cellules sont endommagées (Pari *et al*., 2004) en cas d'infarctus du myocarde, de myopathie ou de rhabdomyolyse bien que l'ASAT, spécifiquement en cas d'hémolyse. L'ASAT est un peu plus sensible alors que l'ALAT est plus spécifique d'une atteinte hépatique (Pal & Manoj.,2011). L'urée et la créatinine sont les deux principaux marqueurs de la néphrotoxicité bien que l'urée est le marqueur sérique le plus sensible et le plus fiable (Palani *et al*.,2009). Tous ces résultats prouvent que le thymol à une dose de 150 mg/kg/jour a une toxicité modérée spécifiquement sur le foie et les reins.

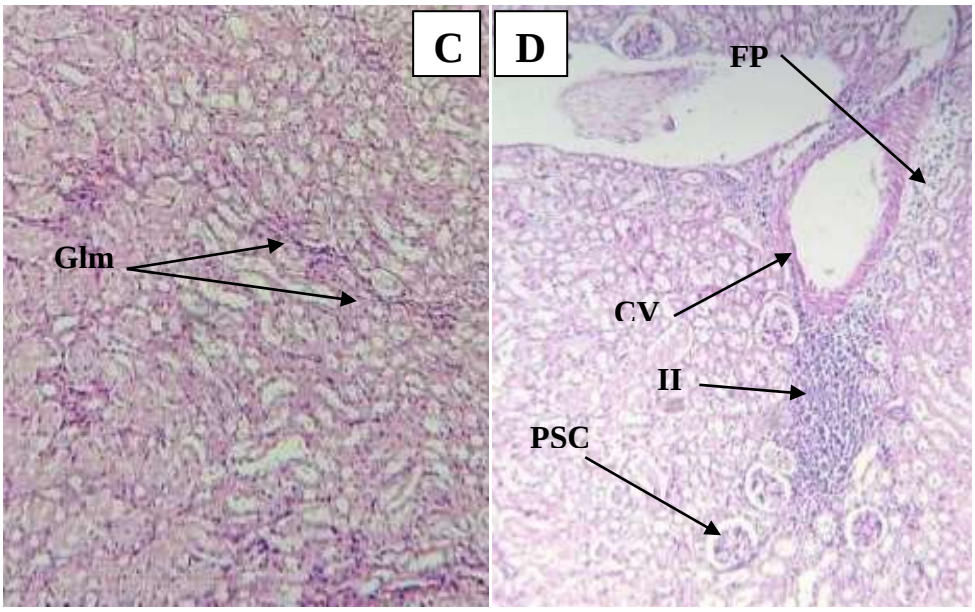


Figure 43 : Tissu cortical rénal des rats du groupe contrôle (A) et ceux traités par le thymol à une dose de 150 mg/Kg/jour (B). Grossissement × 100 ; Coloration par Hémalun-éosine
Cv : Congestions vasculaires ; **PSC** : Plage de souffrance cellulaire ; **FP** : foyers des polynucléaires

Pour la chrysanthenone, l'analyse des coupes tissulaires hépatiques du groupe des rats traités par cette dernière à une dose de 150 mg/kg/jour a montré un parenchyme hépatique partiellement normal avec des hépatocytes bien distincts, canaux biliaires intra-hépatiques normaux à l'exception d'une nécrose lobulaire moyennement intense (Figure 43/A).

Au demeurant, comme indiqué précédemment l'administration uni-quotidienne de la chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg/jour n'induit aucune modification significative du poids corporel, ni poids relatif d'organes durant la période d'étude ainsi, les taux d'enzymes

hépatiques (ASAT/ALAT) restent non-significatives en comparaison à ceux des rats du groupe contrôle. En revanche, l'analyse des coupes tissulaires hépatiques indique que le parenchyme hépatique a gardé sa structure anatomique normale à l'exception d'une nécrose lobulaire. En définitive, la chrysanthenone n'aurait plus d'effet délétère sur le fonctionnement hépatique chez les rats traités.

En ce qui concerne l'effet de la mixture (thymol/chrysanthenone) sur l'intégrité du tissu hépatique nous avons remarqué que le parenchyme hépatique présent un aspect normal avec des hépatocytes bien distincts, sans aucune lésion cellulaire ou tissulaire de type nécrose, stéatose ou obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques, les espaces péri portaux et centrolobulaires observés ont gardé leur structure anatomique normale (figure 44/B) sauf qu'il y'a présence des signes d'une inflammation modérée apparues sous forme des infiltrats hépato-inflammatoires. En revanche, aucun signe montrant une toxicité ou des dommages cellulaires tels que la désorganisation de l'architecture hépatique, nécrose, stéatose, ou obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques n'a été observée.

À la lumière de ces résultats obtenus, il est évident que l'administration uni-quotidienne de la mixture à une dose de 150 mg/kg n'entraine aucune altération ni histologique ni fonctionnelle du foie ce qui peux expliquer les résultats des tests précédents qui indiquent que la mixture à une dose de 150 mg/kg/jour n'induit aucune modification significative du poids corporel des rats traités, ni du poids relatif du, ni des taux sériques d'enzymes hépatiques toute au long de la période d'étude en comparaison aux rats du groupe contrôle.

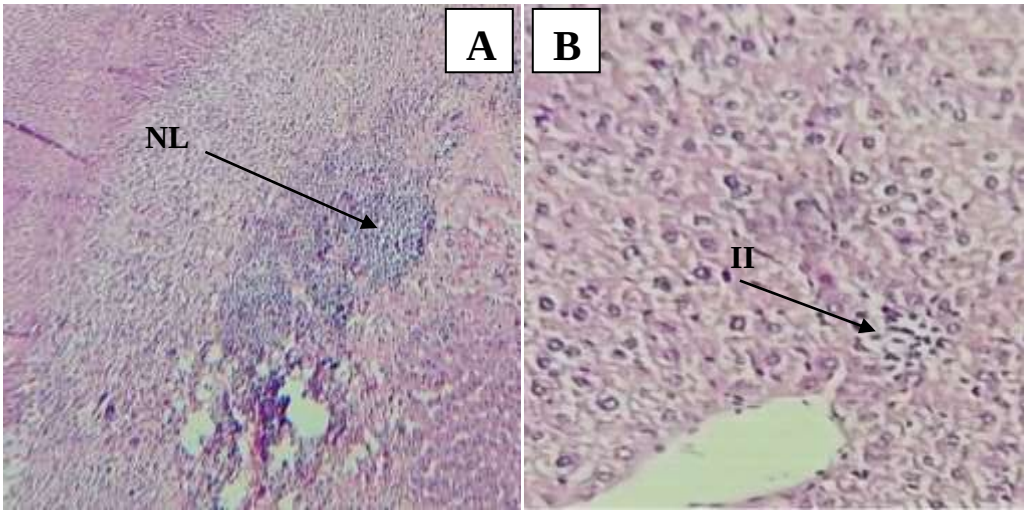


Figure 44 : Tissu parenchymateux hépatique du groupe des rats traités par la chrysanthenone (A) et ceux traités par la mixture combinée à une dose de 150 mg/kg/jour (B). Grossissements : ×100 ; Coloration par Hémalun éosine

NL : nécrose lobulaire ; **II** : infiltrat inflammatoire

Le tissu rénal des rats traités par la chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg/jour montre la présence des tubules normaux sans aucune caractéristique de type cytolyse, nécrose ou stéatose inhérentes à une éventuelle toxicité avec apparition d'une congestion vasculaire, probablement due au sacrifice, et des infiltrats glomérulonéphrites indiquant la présence d'une inflammation au niveau glomérulaire. Au regard des résultats des tests précédents on a constaté que l'administration de chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg/jour n'induit chez les rats traités aucune modification significative du poids relatif des reins ou des taux sériques d'urée et de créatinine. À noter que la créatinine, métabolite résultant essentiellement du catabolisme de la créatine-phosphate représente un paramètre de choix pour évaluer le débit de filtration glomérulaire (Ruiz & Sotelo.,2001). De ce fait, sa concentration normale chez les rats traités par la chrysanthenone témoignerait donc que l'inflammation glomérulonéphrite n'influence pas le fonctionnement excrétoire de ces structures rénales. Ceci suppose que l'inflammation induite par la chrysanthenone n'influence pas les mécanismes de régulation d'urée et donc n'a aucune conséquence sur le fonctionnement normal de cet organe.

En ce qui concerne l'effet de la mixture (thymol/chrysanthenone) sur le tissu rénal, l'étude microscopique des coupes tissulaires des reins a révélé un parenchyme rénal partiellement normal sans aucun changement significatif aux niveaux des structures anatomiques rénaux, à l'égard d'une congestion vasculaire non-intense et des infiltrats inflammatoires déclarant une inflammation rénale (figure D).

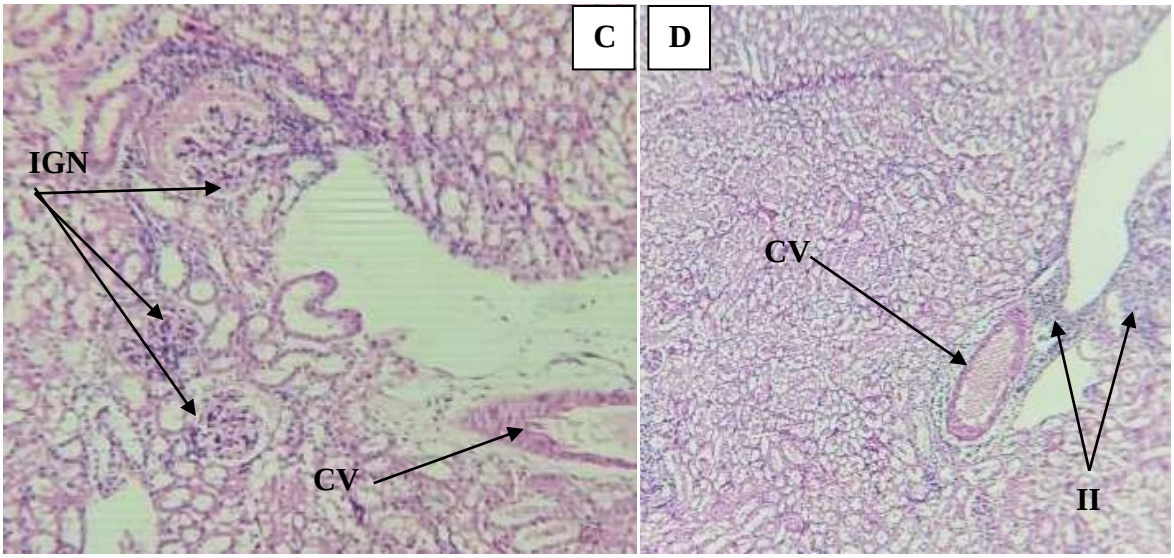


Figure 45 : Tissu cortical rénal des rats traités par la chrysanthenone (C) et ceux traités par la mixture à une dose de 150 mg/Kg/jour (D). Grossissement : × 20; Coloration par Hémalun-éosine

CV : congestion vasculaire ; **IGN** : infiltrat glomérulonéphrite ; **II** : infiltrat inflammatoire

En effet, l'inflammation induite par la mixture peut être due à un de ses composés ; thymol ou chrysanthenone. En revanche, l'administration de la mixture (thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg/jour n'induit aucun changement significatif du poids relatif des reins ni des taux sériques d'urée et de créatinine, ceci suppose que la mixture n'induit pas des dysfonctionnements rénaux après une administration uni-quotidienne de la dose de 150 mg/kg/jour.

3. Hépatotoxicité

3.1 Analyse des paramètres biochimiques

La capacité d'un composé à préserver l'intégrité tissulaire du foie, protéger leurs mécanismes de fonctionnement et minimiser les effets dommageables d'une substance hépatotoxique sont des indices de son pouvoir hépatoprotecteur. Les biomarqueurs hépatiques ASAT et ALAT ont été dosés pour évaluer ce pouvoir hépatoprotecteur de thymol, chrysanthenone ainsi que leur mixture combinée.

Les résultats de cette étude ont révélé une augmentation très significative des taux d'enzymes hépatiques ASAT et ALAT après exposition à CCl_4, indiquant la présence des dommages hépatocellulaires.

Le prétraitement préventif des rats par le thymol à une dose de 150 mg/kg entraine une diminution significative des taux d'enzymes hépatiques (389±25,83 pour l'ASAT) et (51,86±2,93 pour l'ALAT) en comparaison à ceux des rats non traités recevant CCl_4 seul (groupe 2). En revanche, nous avons noté une baisse hautement significative des taux d'ASAT (236±19,48) et d'ALAT (44,40±1,47) chez les rats traités de manière curative par la chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg par rapport aux rats intoxiqués au CCl_4 ayant des taux d'ASAT et d'ALAT respectivement de 196±40,72 et 43,13±1,041 sans jamais atteindre les mêmes taux que ceux des rats normaux (groupe 1 contrôle). Néanmoins, nous avons noté une réduction très significative des taux d'ASAT (201±12,95) et d'ALAT (42,94±1,73) chez les rats traités par la mixture combinée (chrysanthenone/thymol) à une dose de 150 mg/kg par rapport aux rats non traités recevant CCl_4. Il faut signaler qu'il y'a aucune significativité entre les taux d'enzymes hépatiques chez les rats traités par la mixture à une dose de 150 mg/kg (groupe 4) et ceux des rats témoins non traités et tous les paramètres étaient dans la norme comparativement au lot témoin (groupe 1) (tableau 22).

D'après ces résultats, une diminution significative globale pour l'ensemble de groupes des rats ayant subi un traitement curatif a été observé par rapport au groupe des rats recevant seulement le CCl_4 (groupe 2).

La restauration des marqueurs biochimiques (ASAT et ALAT) vers les normes chez les rats traités curativement par la mixture combinée (groupe 4) après leur augmentation suite à une hépato-intoxication par CCl_4 illustre sa capacité à assurer une protection de l'intégrité des membranes hépatocytaires manifester par l'arrêt de relargage et de fuite des substrats enzymatiques hépatiques du compartiment intra-cytoplasmique des hépatocytes vers la compartiment vasculaire.

L'effet hépatoprotecteur de la mixture combinée peut être attribue aux deux éléments phytochimiques thymol et chrysanthenone. En effet, Aeschbach *et al*.,(1994) ont montré que la carvacrol, isomère de thymol, présente un effet hépatoprotecteur en prévient le foie de stéatose induite par un régime alimentaire riche en graisse via l'activation de voie de signalisation SIRT1-AMPK. Ainsi, l'étude de Janbaz *et al* (2003) indique que le prétraitement par le thymol induit une diminution significative des taux d'enzymes sériques (ASAT, ALAT et phosphatase alcaline) chez les rats ayant hépatotoxicité induite par le paracétamol.

Étant donné que la transformation de tétrachlorure de carbone CCl_4 en radical réactif trichlorométhyl est le facteur clé de pathogénicité de CCl_4. Cela trouve que le prétraitement par un inhibiteur du métabolisme de CCl_4, un agent antioxydant, un inhibiteur de péroxydation lipidique ou encore un anti-inflammatoire peuvent réduisent les signes de l'hépatotoxicité et protègent l'homéostasie du foie.

Au bout de nos tests pharmacologiques, le thymol ainsi que la chrysanthenone ont montré un effet antiradicalaire important, *in vitro*, supérieur à ceux d'anti-oxydants de synthèse (BHT) et un pouvoir anti-inflammatoire crucial *in vivo*, dépassant l'anti-inflammatoire de référence (Diclofénac 1%). Néanmoins, Nagoor *et al*.,(2012) ont suggéré que le thymol a une aptitude à inhiber la péroxydation lipidique ainsi que l'oxydation non enzymatique. Par conséquence le mécanisme hépatoprotecteur du thymol peut être dû exceptionnellement à ses effets antioxydants et anti-inflammatoires.

Ces résultats illustrent l'effet hépatoprotecteur de la mixture (thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg, soit par son effet oxydant que par son effet anti-inflammatoire, qu'est plus important par rapport aux effets de thymol et de chrysanthenone étudier séparément, est qu'est due essentiellement à la synergie entre ces deux molécules, cette synergie qu'était prouvée dans d'autres tests pharmacologiques.

Tableau 22 : Effet de prétraitement par la mixture thymol/chrysanthenone combinée sur le taux sérique des enzymes hépatiques

Paramètres biochimiques	Groupes des rats				
	Groupe 1 Contrôle	**Groupe 2 CCl_4 seul**	**Groupe 3 Thymol/CCl_4**	**Groupe 4 Chry/CCl_4**	**Groupe 5 (Mix)**
ASAT (UI/I)	196±40,72	872±58,89	389±25,83	236±19,48	201±12,95
ALAT (UI/I)	43,13±1,041	73±2,31	51,86±2,93	44,40±1,47	43,94±1,73

3.2 Altérations macroscopiques et histopathologiques

Les résultats d'étude des coupes histologiques du foie allaient dans le même sens vu que les diminutions des taux sériques d'enzymes hépatiques étaient meilleures avec la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) qu'avec le thymol et la chrysanthenone séparés.

L'observation microscopique des coupes du foie des rats normaux (groupe1) a révélé une architecture lobulaire normale marquée par la présence des veines centrolobulaires entourés radiairement par des hépatocytes normales séparées par des sinusoïdes bordées des cellules endothéliales (figure 46/A). Cependant, les coupes histologiques du foie des rats intoxiqués par CCl_4 (figure 46/B) ont montré de modifications ; histopathologiques centrolobulaires et graisseuses, indiquant une hypertrophie, dégénérescence ballonnée, stéatose microvacuolaire, cavitation et infiltration lymphocytaire avec présence des cellules de Kupffer ainsi que des kystes de tailles différentes traduisant une souffrance hépatique majeure.

Après traitement curatif au thymol à une dose de 150 mg/kg des rats intoxiqués par CCl_4, les coupes histologiques soulignent qu'il ya régression des lésions hépatiques chimio-induites. Ainsi le parenchyme hépatique reste quasi-normal avec présence des signes d'infiltrats inflammatoires lympho-plasmocytaires sans aucuns signes de nécrose, stéatose ou dégénérescence (figure 46/C).

Chez les rats traités d'une manière curative par la chrysanthenone à une dose de 150 mg/kg, les signes de souffrance hépatiques sans moins prononcés. Une architecture hépatique pratiquement normale et reconnaissable a été observée avec des signes minimes de toxicité qui présente une congestion importante persiste autour des veines centrolobulaires, ainsi les hépatocytes sont quasi-normaux. Aucun signe de stéatose, nécrose ou dégénérescence n'a été observé (figure 46/D). En ce qui concerne la mixture combinée (thymol/chrysanthenone), l'examen histologique du foie des rats traités d'une manière curative montre un parenchyme hépatique reconnaissable avec une disparition de tous les signes de toxicité qu'ont été apparue après intoxication par CCl_4 (figure 46/E).

Les résultats des tests préventifs par le thymol et la chrysanthenone séparément à une dose de 150 mg/kg montrent que ces derniers n'ont pas été en mesure de réparer totalement les lésions tissulaires hépatiques induites par le CCl_4, mais pourraient les limiter. Cependant, les résultats de test préventif par la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg étaient spectaculaires, tous les signes d'intoxication induits par CCl_4 ont disparu.

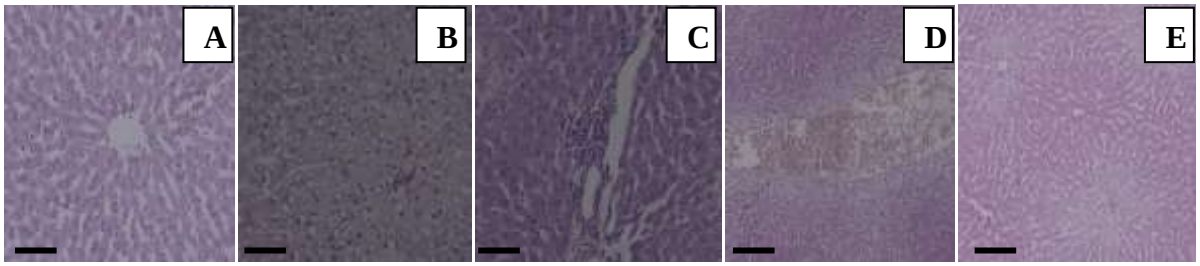


Figure 46 : Photomicrographies microscopiques des sections de foie colorées par l'hématosine et éosine. Grossissement : X40 (**A**) : Section hépatique du parenchyme normal des rats non-traités (groupe 1) ; (**B**): section hépatique du parenchyme des rats intoxiqués par CCl_4 (groupe 2) avec dégénérescence ballonnée, stéatose microvacuolaire et cavitation ; (**C**) : section hépatique des rats intoxiqués par CCl_4 recevant le thymol (groupe 3); (**D**): section hépatique des rats intoxiqués par CCl_4 et traités par la chrysanthenone (groupe 4) ; (**E**) : Section hépatique du parenchyme des rats intoxiqués par CCl_4 traités par et la mixture combinée (thymol/chrysanthenone). Barre d'échelle : 10 mm

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est un hépatotoxique dose dépendant à action prévisible de type indirect. Sa toxicité est due essentiellement à l'augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées qui induisent un stress oxydatif et une péroxydation des lipides membranaires, aboutissant à la destruction des membranes d'hépatocytes et par conséquence la fuite des enzymes hépatiques dans la circulation sanguine (Consso *et al*.,2000). L'élévation du taux sériques d'enzymes hépatiques ainsi que les différentes lésions tissulaires apparues lors de l'étude des coupes histologiques hépatiques fournira des indicateurs fiables d'un dysfonctionnement hépatique causée par une intoxication par CCl_4.

En outre, nos deux composés ; thymol et chrysanthenone ; se sont avérés hépatoprotecteurs, cet effet protecteur se manifestait par la diminution des taux sériques d'enzymes hépatiques (ASAT/ALAT) et la réduction des signes de souffrance hépatique. L'administration répétée de thymol et de chrysanthenone séparément à une dose de 150 mg/kg protège le foie contre les lésions hépatiques provoquées par CCl_4. En revanche la mixture à une dose de 150 mg/kg a démontrée clairement un pouvoir hépatoprotecteur, où il a agit efficacement contre l'intoxication induite par CCl_4 et maintien l'intégrité tissulaire et le fonctionnement du foie. Cela été traduise par le rétablissement à la normale des taux sériques d'enzymes hépatiques, histologie normale du foie ainsi que la disparition totale des signes d'intoxication hépatique

chez les rats traités par la mixture. Au total, le traitement préventif avec la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) semble avoir le meilleur pouvoir hépatoprotecteur face à l'intoxication au CCl_4.

Conclusion

Les résultats de l'étude de toxicité aigüe et subaigüe nous a permis de prouvé l'innocuité de la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) à une dose de 150 mg/kg. Ainsi les deux composés administrés séparément n'induisaient aucun dysfonctionnement rénal ou hépatique. En revanche, la mixture combinée (thymol/chrysanthenone) a montré une puissante vertu hépatoprotectrice élucidée par le rétablissement à la normale du taux des marqueurs hépatiques (ASAT/ ALAT) chez les rats. Aussi cette mixture a montré une aptitude à inhiber l'apparition des lésions hépatiques après intoxication par CCl_4.

Les essais toxicologiques représentent des bonnes techniques d'étude des nouveaux composés chimiques. Toutefois ils n'apportent pas assez d'éléments de réponses à propos ses effets thérapeutiques. C'est pourquoi nous pensons nous consacrer plus particulièrement aux études pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* qui ne font l'objet d'aucune étude pharmacologique, cela nous permettra peut-être d'identifier les vertus thérapeutiques pharmacologiques des composés et de leur mixture combinée.

III. Activités pharmacologiques *in vivo* de chrysanthenone et de thymol

1. Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de Chrysanthenone, thymol est réalisée par la mesure du pourcentage de réduction de l'œdème des pattes postérieures droites induit par la carragénine dans les différents essais, par rapport au témoin positif (Diclofénac 1%) (médicament de référence). Les résultats sont représentés dans la figure 47.

Les pourcentages de réduction de l'œdème ont révélés que le lot traité par la combinaison des deux molécules (Chrysanthenone et thymol) présente un potentiel anti-inflammatoire remarquable où le pourcentage d'inhibition était de 96,998±3,698, dans les mêmes conditions Diclofénac 1 % à une inhibition maximale atteindre 88,57±0,81 après 6 heures de l'injection de carragénine. Tandis que la Chrysanthenone et le thymol utilisés séparément ont un pourcentage d'inhibition de 83,33±0,00 et 79,11±7,219 respectivement. Ces résultats montrent que la combinaison des deux molécules a un effet anti-inflammatoire assez élevé par rapport au médicament de référence (Diclofénac 1%). Ainsi, nos molécules inhibent l'œdème induite par la carragénine d'une manière dose dépendante et durant toutes les phases.

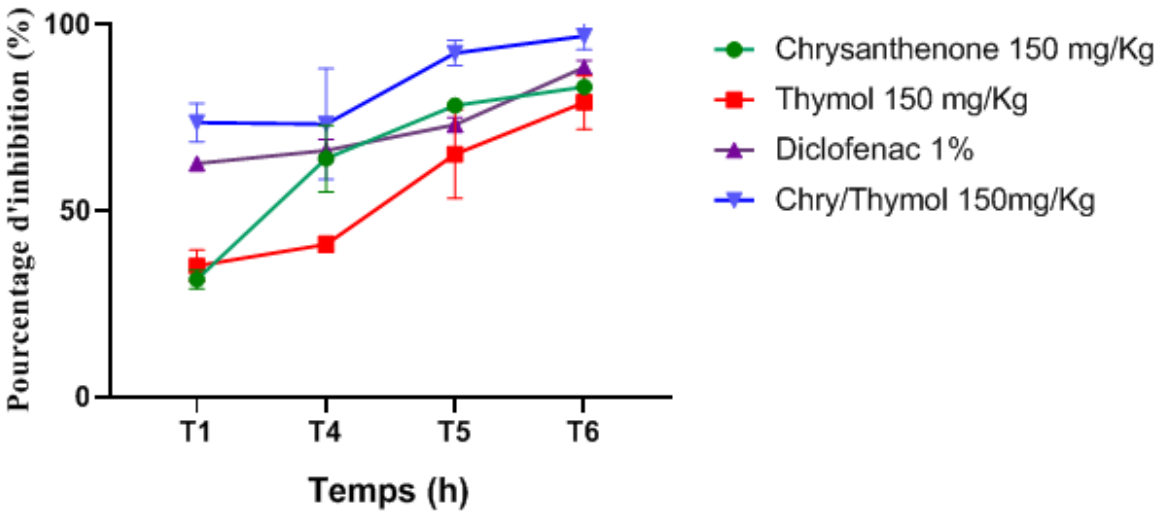


Figure 47 : Activité anti-inflammatoire de Chrysanthenone, Thymol et leur mixture. SEM (n = 5), *** : $p < 0.001$ comparer au control négatif, $p < 0.05$ comparer au control positif

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs) peuvent être pris pour réduire ou supprimer les symptômes liés à l'inflammation, ils exercent ses effet on inhibant le cyclooxygénase 2 qu'est une protéine constitutive qui joue un rôle important dans l'intégrité tissulaire (Klein & Eliakim.,2010). Cependant, son inhibition par les NSAIDs induit des effets indésirables multiples (Chelucci *et al*.,2014) comme les ulcères gastriques, disfonctionnements rénales, somnolence et des nausées (Nagoor *et al*.,2012). Tous ces effets indésirables poussent les chercheurs de trouver des nouvelles molécules bioactives ayant un effet anti-inflammatoire alternantes de ces NSAIDs. Le modèle standard et pratique de l'inflammation aiguë induite chez la souris par l'injection de la carragénine est largement employé pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires de divers agents (Suresh *et al*.,2018). La combinaison de thymol/chrysanthenone à une dose de 150mg/kg montre un effet anti-inflammatoire supérieur à ceux de Diclofénac qu'est un anti-inflammatoire de référence. Conformément à Mendes et *al*.,(2010) thymol isolé de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia gracilis*, administrer à une dose de 200mg/kg a un pouvoir d'inhibition de l'œdème induite par l'injection de carragénine similaire à ceux de l'acide acétylsalicylique. À une dose de 7.5 mg/kg thymol induit une inhibition de la peroxydation, glycation, dyslipidémie et de l'inflammation chimio-induite (Nagoor *et al*.,2012). Le pourcentage d'inhibition de l'œdème induite par l'injection de carragénine de la combinaison de thymol/chrysanthenone est très supérieure à ceux de thymol et de chrysanthenone utilisé séparément ce qui prouve l'effet synergique entre ces deux molécules.

2. Activité analgésique

L'activité antalgique a été évaluée sur des torsions abdominales provoquées par administration intrapéritonéale d'un agent algogène (solution d'acide acétique 0,7%) à des souris. Les résultats de ce test sont figurés dans la figure 46. Les souris traitées par la combinaison des deux molécules (Chrysanthenone/ Thymol) par voie orale, à une dose de 150 mg/Kg ont un nombre significativement faible des contorsions abdominales (27,40±0,40) par rapport au groupe contrôle (42,00±2,70) traité par l'antalgique de référence (Tramadol). La molécule de Chrysanthenone (39,60±0,81) et du thymol (32,80±0,58), administrée à une dose de 150mg/Kg a eu un effet antalgique légèrement faible par rapport au Tramadol (figure 48).

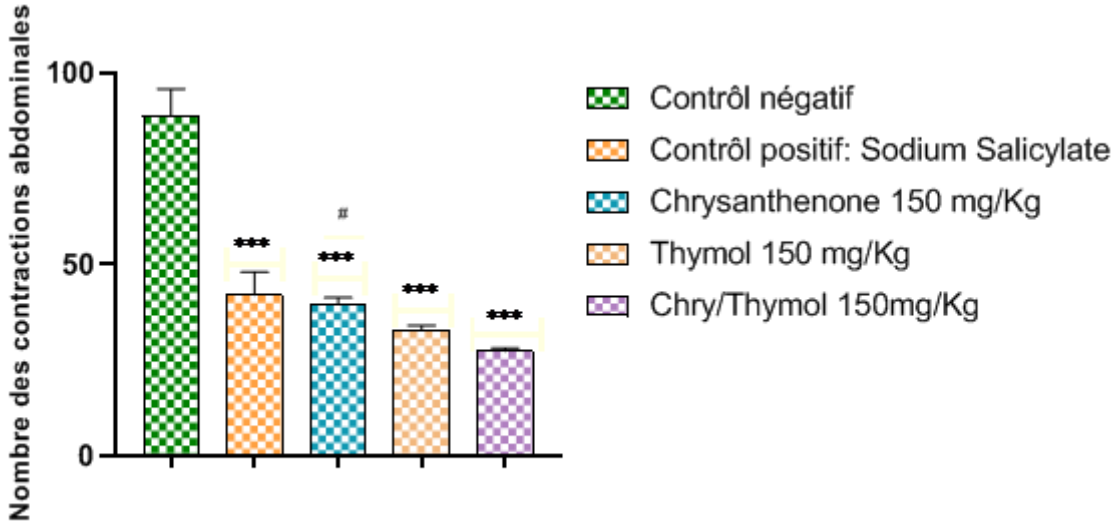


Figure 48 : Activité analgésique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée comparés à celle du contrôle positif (Sodium salicylate). Les valeurs sont exprimées en moyen± erreur standard moyen (n=5) ; *** : p <0.001 comparer au contrôle négatif ; ≠ : p<0.05 comparer au contrôle positif.

Pour évaluer le potentiel thérapeutique antalgique de nos molécules nous avons suivre le Writhing Test. L'injection intrapéritonéal de l'acide acétique stimule l'activation des mécanismes des douleurs périphériques par la production et la libération des médiateurs chimiques différents comme l'histamine, sérotonine, bradykinine et les prostaglandines PGE 2 et PGEα (Xin *et al*.,2012). Des études ont montré que thymol et son isomère carvacrol induisent la suppression de l'expression et la production de TNF-α et IL-6 *in vitro* et *in vivo* qui sont deux marqueurs inflammatoires (Li *et al*.,2018). Cependant, une autre étude montre que le thymol exerce son effet anti-inflammatoire par inhibition des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β et TNF-α (Chamanara *et al*.,2019), via les récepteurs adrénergiques A2 des cellules nerveuses (Beer *et al*.,2007). La mixture de

thymol/chrysanthenone a un effet antalgique supérieur à ceux de l'acide salicylate qu'est un analgésique de référence et à ceux des deux molécules testés séparément.

Conclusion

Les résultats significatifs obtenus lors de ces études pharmacologiques ont montré que les huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* uniques ou combinés en une mixture à une dose de 150 mg/kg dotés d'une puissante activité anti-inflammatoire et analgésique par rapport aux médicaments de référence ainsi qu'une capacité hépatoprotectrice intéressante. Ces résultats constituent une base scientifique qui justifie l'utilisation traditionnelle fréquente de *T.a* et d'*A.h* dans la prise en charge de plusieurs pathologies à composante inflammatoire comme l'eczéma, le paludisme, l'ulcère gastrique, la Polyarthrite rhumatoïde et les cancers. Cela ouvre de nouvelles possibilités d'utilisation de ces huiles essentielles à des pathologies inflammatoires plus précises ou à d'autres applications liées à l'industrie pharmaceutique.

III. Activités biologiques *in vitro*

Très peu de travaux ont été consacrés à l'étude des propriétés biologiques des composés phytochimiques. Pour évaluer les effets de nos composés chimiques : thymol et chrysanthenone, nous incités à étudier l'activité antioxydante, antibactérienne et cytotoxicité de ces composés et les comparer à celles des molécules de synthèse.

1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de nos composés ; thymol et chrysanthenone ainsi que leur mixture combinée (thymol/chrysanthenone) a été évalué par deux méthodes in *vitro* à savoir la méthode au DPPH (2,2-diphényle-1 picrylhydrazyle) dont le DPPH est un radical libre utilisé pour évaluer l'effet antioxydant des composés pures ou de mélange complexe et la méthode au FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

La première méthode utilisée pour déterminer le pouvoir antiradicalaire de nos composés est la méthode de DPPH (2.2- diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole de (Wang *et al*.,2021). Les profils d'activité antiradicalaire obtenue révèlent que la mixture (thymol/chrysanthenone) combiné possède l'activité antiradicalaire la plus importante avec une IC_{50} de 3,07±0,61µg/ml (inférieure à celle du contrôle positif BHT) suivi par la chrysanthenone avec une IC_{50} de 5,40±0,73µg/ml ainsi le thymol présente une faible activité antiradicalaire avec une IC_{50} de 8,94±0,62 µg/ml. La formulation entre le thymol et la chrysanthenone (ratio 1/1) a démontré un effet antioxydant intéressant supérieur à ceux d'antioxydant de référence (BHT) aussi bien pour la chrysanthenone qu'a présentée un effet

antiradicalaire important que le BHT. Sur la contrepartie, le thymol a démontré un pouvoir antiradicalaire inférieur à ceux d'antioxydant de référence (p< 0.001) (figure 49). Ces résultats permettent de classer les composés par rapport au standard selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant :

Mixture (thymol/chrysanthenone)>Chrysanthenone>BHT>Thymol

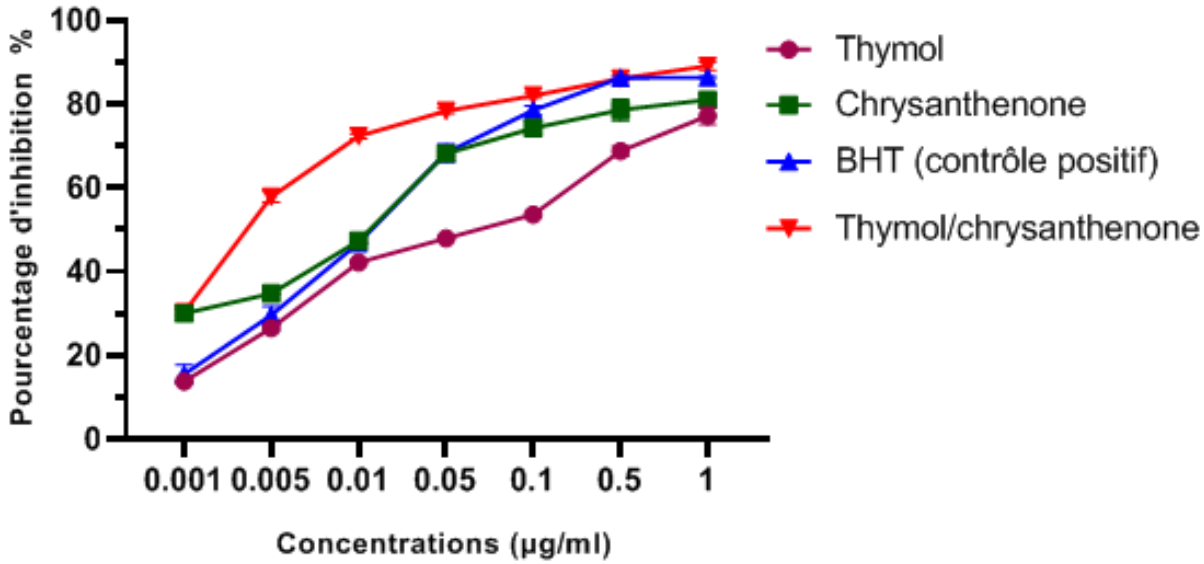


Figure 49 : Profil d'activité anti-oxydante de BHT (butylhydroxytoluène), de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée (ratio 1/1). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM ; (n=3)

Yanishlieva *et al*.,(1999) ont déjà prouvé le fort pouvoir antioxydant de thymol, ainsi les composés phénoliques agissent comme agents réducteurs grâce à leurs caractéristiques donneurs de l'oxygène singulier et de l'hydrogène. Autres que les composés phénoliques certains composés phytochimiques tels que ; le γ-terpinene et les monoterpènes possèdent aussi un fort pouvoir antioxydant (Ruberto & Barrata, 2000), ce qui explique le pouvoir antioxydant important de chrysanthenone. En revanche, l'activité antioxydante des composés phytochimiques (thymol et chrysanthenone) testés séparément montrent un pouvoir antioxydant inférieurs comparés au pouvoir antioxydant de la mixture (thymol/chrysanthenone) combinée. D'après Vardar-Unlu *et al*.,(2003) les interactions synergiques entre les différents composés phytochimiques sont à l' origine d'un pouvoir antioxydant plus intéressant.

Tableau 23 : Concentration du BHT (butylhydroxytoluène), de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée, leur mixture (1/1) inhibitrice de 50% (IC_{50}) dans le test DPPH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM ; (n = 3)

Composés	IC_{50} (µg/ml)
BHT	6,16±0,28
Thymol	8,94±0,62
Chrysanthenone	5,40±0,73
Thymol/chrysanthenone (1/1)	3,07±0,61

La réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) nous a permis de confirmer l'activité antioxydante de nos composés prouvé précédemment par la méthode DPPH. Les résultats obtenus sont différents de ceux du test précédant et révèlent que l'antioxydant de référence (BHT) a un effet antioxydant plus puissant avec un pourcentage d'inhibition de 85,77±0,84 à une concentration de 1 µg/mL, suivi par la mixture (thymol/chrysanthenone) combinée avec un pourcentage d'inhibition de 84,32±0,11 à une concentration de 1 µg/ml. En fin, la chrysanthenone et le thymol respectivement avec des pourcentages d'inhibition d'ordre de 78,17±0,04 et 69,34±0,06 (figure 50). On constate que la capacité de réduction de Fer est proportionnelle à l'augmentation de concentration des composés, cela signifié que nos composés agissent d'une manière dose-dépendante.

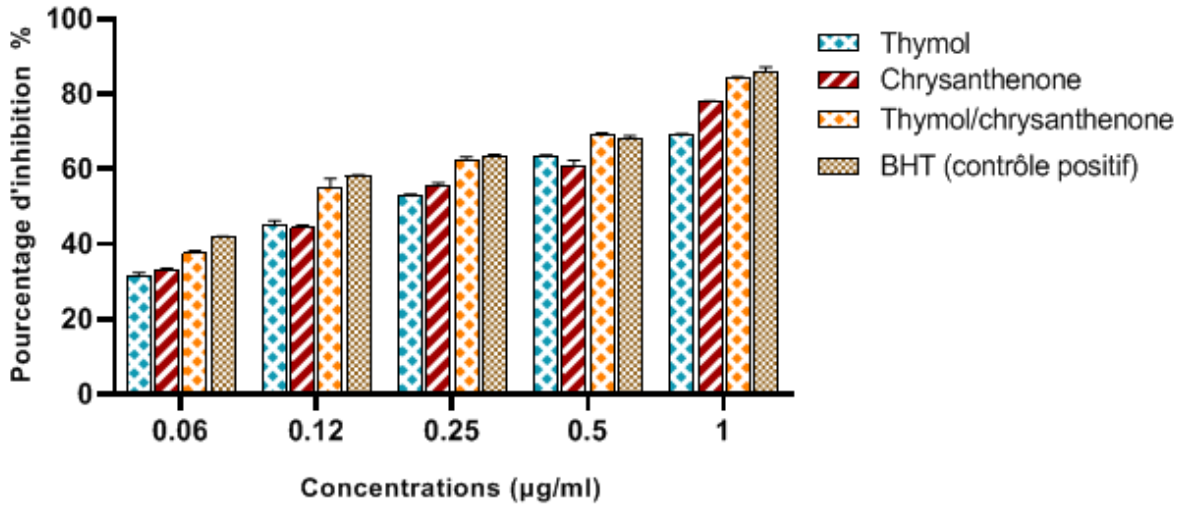


Figure 50 : Histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de thymol, chrysanthenone et leur mixture combinée. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin. (n=3)

D'après Athamena *et al.*,(2010) l'activité antioxydante d'un composé diffère selon le test utilisé, ainsi certains composés ont une cinétique élevée et réagissent rapidement avec le DPPH qu'avec d'autres oxydants. Cette différence peut être expliquée par les résultats

obtenus dans les deux tests. À partir de ces derniers, Il est évident que l'interaction de deux composés antioxydants, thymol et chrysanthenone, avec le DPPH et le FRAP dépend de leurs structures chimiques. En effet, les molécules ayant un pouvoir antioxydant sont capables de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Leopoldini *et al*.,2011). L'activité antioxydante de thymol est attribuée à sa structure phénolique qui joue un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres (Pincemail *et al*.,2007). En comparant les propriétés structurelles des dérivés de verbenone (chrysanthenone), leur pouvoir antiradicalaire a été expliqué par l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Cette radicalisation naissance à des espèces stables par les liaisons hydrogènes. Il convient de signaler que dans le test de FRAP, tous les composés réduits réagissent dans le milieu réactionnel (Rojo *et al.,* 2009). Par ailleurs, le pouvoir antioxydant est influencé non seulement par la quantité d'oxydant présente, mais aussi par sa structure et sa composition chimique (Falleh *et al*., 2008).

Dans les deux tests d'activité antioxydante, la formulation de thymol/chrysanthenone (ratio 1/1) présente un puissant effet antioxydant en comparaison avec les deux composés testés séparément ce qui prouve l'effet synergique entre les deux composés.

2. Cytotoxicité

À fin de contribue à la recherche et l'identification des nouvelles molécules anticancéreuses, nous avons évalué la cytotoxicité, *in vitro*, de deux composés, thymol et chrysanthenone ainsi que leur mixture thymol/chrysanthenone combinée (ratio 1/1), vis-à-vis trois lignées cellulaires cancéreuses Hep-G2, MCF-7 et MDA-MB-231 à travers la mesure de viabilité cellulaire estimée par l'activité métabolique mitochondriale utilisant le test WST1. Les cellules cancéreuses ont été traitées par le thymol et la chrysanthenone uniques ainsi que leur mixture à des concentrations croissantes [0-50 µg/ml] durant 24h à 37°C. Les histogrammes représentant les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction des concentrations des composés (thymol, chrysanthenone) sont présentés ci-dessous (figure 51-53). Ces résultats montrent qu'il y'a proportionnalité entre l'activité cytotoxique et la concentration des composés, ce qui indique la bonne corrélation dose-effet pour l'intervalle de concentration utilisées [0-50 µg/ml]. Les concentrations inhibitrices à 50 % (IC_{50}) ont été calculées par extrapolation et les valeurs sont exprimées par la moyenne ± SD et données par µg/mL.

Les résultats obtenus montrent aussi que la mixture thymol/chrysanthenone combinée (ratio1/1) possède des activités antiprolifératives plus puissantes. Elle induit une inhibition de la prolifération et la croissance des cellules cancéreuses d'une manière temps et dose

dépendante vis-à-vis les trois lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF-7 et HepG2 avec des IC_{50} respectivement d'ordre de 1,525±0,035 µg/ml, 0,323±0,040 µg/ml et 0,719±0,012 µg/ml. Cet important potentiel antiprolifératif de la mixture peut-être due aux interactions synergiques entre ses deux composants actifs ; thymol et chrysanthenone. En revanche, ces derniers présentent des activités cytotoxiques inférieures à celui de la mixture (thymol/chrysanthenone) vis-à-vis les lignées cancéreuses MDA-MB-231, MCF-7 et HepG2. En effet, les IC_{50} sont d'ordre de 2,084±0,07 µg/ml, 1,690±0,041 µg/ml et 2,486±0,240 µg/ml respectivement pour le thymol et 1,681±0,027 µg/ml, 0,938±0,030 µg/ml et 0,646±0,074 µg/ml pour la chrysanthenone. D'une manière générale, la mixture thymol/chrysanthenone combinée semble avoir un puissant effet antiprolifératif avec une efficacité relativement importante sur les lignées cellulaires MCF-7 et HepG2 que la lignée cellulaire MDA-MB-231.

La présence de chrysanthenone dans la mixture thymol/chrysanthenone combinée pourrait expliquer au moins en partie l'activité antiproliférative mise en évidence. En effet, le thymol montre une forte activité pour bloquer la prolifération des cellules cancéreuses en supprimant la croissance cellulaire, induisant l'apoptose, en dépolarisant le potentiel membranaire mitochondriale et en activant les protéines mitochondriales pro-apoptotiques Bax, caspases (cystéine aspartases) et polymérase poly-ADP ribose dans les cellules gastriques humaines (Kang *et al*.,2016). Étonnamment, le dérivé de verbenone (isomère de chrysanthenone) obtenu par des modifications chimiques simples a montré une inhibition de croissance des cellules cancéreuses mammaires triples négatives testées (TNBC). Ce qui était étroitement lié à la mort des cellules cancéreuses par apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire, via l'activation des molécules pro-apoptotiques, en arrêtant la progression du cycle cellulaire à la phase S, ce composés a également montré fort effet inhibiteur de l'invasion des cellules MDA-MB-231 fortement mobiles. Ceci est en accord avec les résultats d'autres études montrant que la verbenone inhibe la croissance tumorale et les métastases pulmonaires dans un modèle de souris en xénogreffe (Kang *et al*.,2016). De plus, Yanishlieva *et al*.,(2017) ont rapporté que la verbenone (isomère de chrysanthenone) bloque l'invasion *in vitro* des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Une récente étude a rapporté l'activité antiproliférative de verbenone en inhibant l'activité transcriptionnelle du NF-κB responsable de la prolifération cellulaire, la survie et la motilité des cellules cancéreuses (Kim *et al*.,2021).

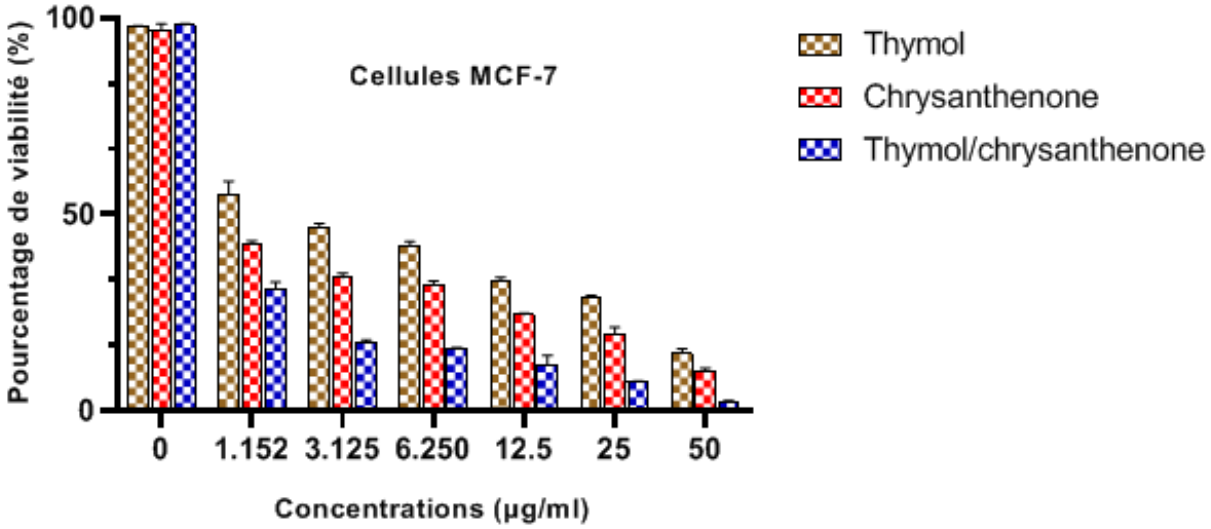


Figure 51 : Histogrammes de l'effet cytotoxique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

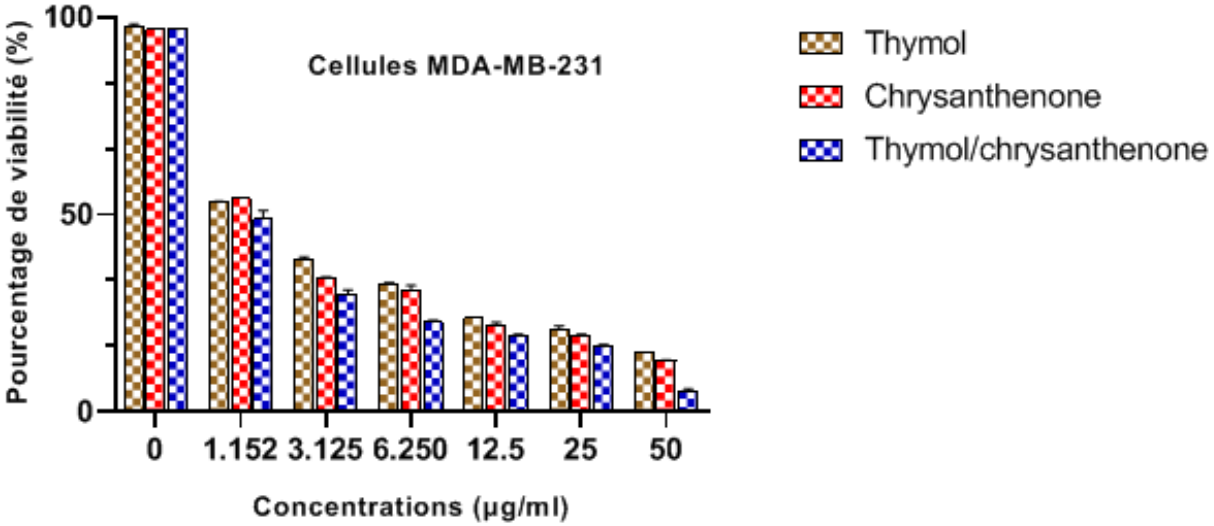


Figure 52 : Histogrammes de l'effet cytotoxique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

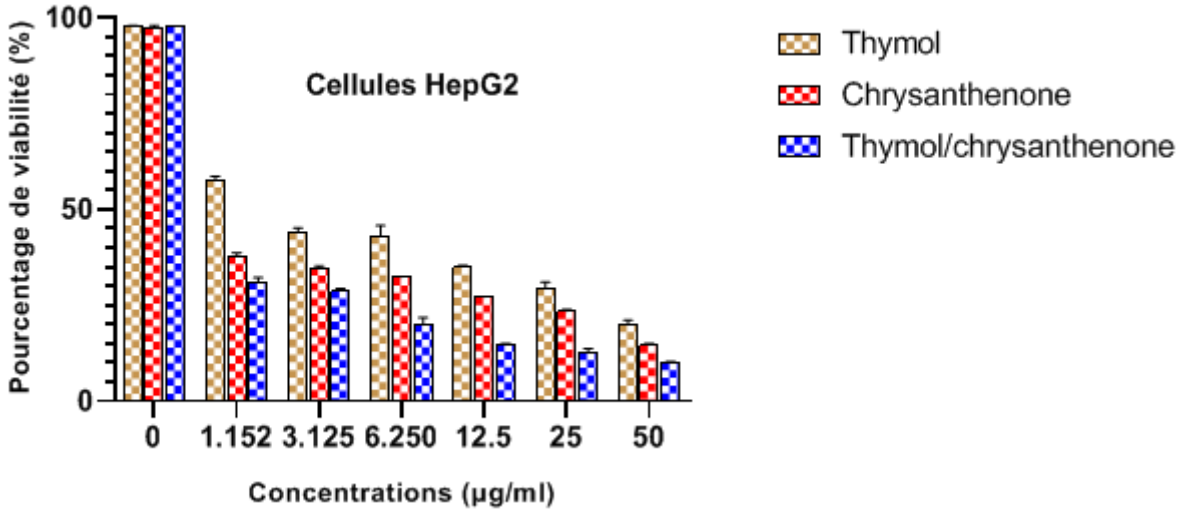


Figure 53 : Histogrammes de l'effet cytotoxique de thymol, chrysanthenone et leur mixture thymol/chrysanthenone combinée vis-à-vis la lignée cellulaire cancéreuse HepG2. Les lettres (a, b, c) indiquent la différence significative à $p<0.05$ entre les traitements. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

Les données obtenues de cette étude ont révélé que la mixture thymol/chrysanthenone combinée (ratio 1/1) a montré un effet cytotoxique important temps et dose-dépendant vis-à-vis des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et HepG2. Les IC_{50} de cette mixture est comprise entre 0.41 et 1.52 µg/mL. Selon l'Institut National du Cancer (NCI) les composés ayant une IC_{50}<30 µg/mL sont considérés cytotoxiques, suggérant que la mixture est dotée d'une activité cytotoxique très puissante vis-à-vis 3 lignées cellulaires tumorales différentes.

Autre que le problème de résistance bactérienne aux antibiotiques chez les sujets sains qui demeure toujours une des préoccupations des scientifiques, la chimiothérapie anticancéreuse induit l'augmentation des souches mutantes résistantes aux différents antibiotiques chez les patients atteints les différents types de cancers. La recherche des nouvelles molécules d'origine naturelle pour faire face à ce problème devient une nécessité qui nous pousse à évaluer l'activité antibactérienne et antifongique *in vitro* vis-à-vis trois souches bactériennes et deux fongiques.

3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de thymol, chrysanthenone et de leur mixture thymol/chrysanthenone combinée (ratio 1/1) a été testée contre les souches microbiennes : *Bacillus subtilis* ATTC 4230, *Staphylococcus aureus* ATTC 43, *Micrococcus luteus* ATTC 9314 et deux souches fongiques : C*andida albicans* et *Penicillium digitatum*, en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Le choix de ces souches microbiennes est basé sur leur pathogénicité élevée ainsi que leur fréquence élevée à induire des infections (Sim *et al*.,2019).

Tableau 24 : Inhibition de croissance microbienne du thymol

		Contrôle négatif	50	25	12.50	6.250	3.125	1.156
Souches bactériennes	*Bacillus subtilis*	+	-	-	-	-	-	+
	Micrococcus luteus	+	-	-	-	-	-	+
	Staphylococcus aureus	+	-	-	-	-	+	+
Souches fongiques	*Candida albicans*	+	-	-	-	+	+	+
	Penicillium digitatum	+	-	-	-	-	+	+

(+) : Croissance ; (-) : Inhibition

Tableau 25 : Inhibition de croissance microbienne du chrysanthenone

		Contrôle négatif	50	25	12.50	6.250	3.125	1.156
Souches bactériennes	*Bacillus subtilis*	+	-	-	-	-	+	+
	Micrococcus luteus	+	-	-	-	-	+	+
	Staphylococcus aureus	+	-	-	-	-	+	+
Souches fongiques	*Candida albicans*	+	-	-	+	+	+	+
	Penicillium digitatum	+	-	-	-	-	-	+

(+) : Croissance ; (-) : Inhibition

Les résultats ont démontré l'effet antimicrobien du thymol sur différentes souches de microorganismes, avec des concentrations d'inhibition allant de 1,156 à 50 mg/ml. Ces résultats révèlent que le thymol exerce une activité antimicrobienne considérable contre Bacillus subtilis, Micrococcus luteus et Penicillium digitatum avec des concentrations d'inhibition d'environ 3,125 mg/ml et 6,250 mg/mL respectivement. À l'opposé, Candida albicans a été le microorganisme le plus résistant, elle a montré une concentration inhibitrice plus élevée de l'ordre de 6,250 mg/ml.

L'activité antimicrobienne de thymol est l'un des domaines les plus étudiés pour leurs avantages possibles dans les applications médicales (Trombetta *et al*.,2005). Elle a été bien défini dans la littérature que le thymol montre un effet antimicrobien en raison de sa structure phénolique (Rúa *et al*.,2019). À titre d'exemple, Botelho *et al*.,(2007) ont constaté que le

thymol a une activité antimicrobienne importante contre des espèces bactériennes cariogènes du genre *Streptococcus* et *Candida albicans* avec des IC_{50} allant de 0.625 à 10 mg/ml.. Simultanément, Jafri *et al.*,(2020) ont montré que le thymol a une forte activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* avec une IC_{50} d'ordre de 1,56 µg/ml. En outre, l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO.,2023) ont prouvé que le thymol possède une forte activité antimicrobienne contre de nombreuses espèces bactérienne et fongique y compris ; *S. aureus*, *E. coli* et *Aspergillus sp*. L'étude de Marino *et al*.,(1999) a révélé que le thymol purifié de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L*. montre une activité bactériostatique vis-à-vis plusieurs bactéries Gram positif et négatif.

Les résultats indiquent que le thymol témoigne d'une activité antibactérienne et antifongique considérable vis-à-vis les germes testés, cette activité se manifeste différemment selon la souche cible. Plus précisément, *C.albicans* a montré une forte résistance à ce composé avec une concentration inhibitrice de 12,50 mg/mL. Cependant, une bonne activité a été détectée contre *P.digitatum* avec une concentration inhibitrice d'ordre de 1,156 mg/ml. À l'opposé, les trois souches bactériennes ; *M.luteus, S.aureus* et *B.subtilis* ont été interagisse de la même manière avec la chrysanthenone et présente une concentration inhibitrice d'ordre de 3,125 mg/mL.

La différence entre l'activité des deux composés est due essentiellement à la structure chimique de ces dernières. Le thymol est un des composés phénoliques qu'ils ont un large spectre d'activité antimicrobienne, plusieurs études parmi lesquelles, l'étude de Marino *et al*., (1999) qu'ont révélé que le thymol (32,55%) montre une activité bactériostatique contre plusieurs bactéries Gram positif et négatif. Une autre étude prouve que le thymol a une forte activité antibactérienne vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli* avec des concentrations minimales inhibitrices d'ordre de 0,31 mg/ml et 5,00 mg/ ml respectivement, ce composé perturbe les lipides de la membrane plasmique bactérienne qui conduit au relargage du matériel intracellulaire. Trombetta *et al*.,(2005) indiquent que le thymol inhibe la croissance d'*E. coli* on induisant la perméabilité et la dépolarisation de la membrane plasmique bactérienne (Benzarti *et al*.,2010). Tous ces résultats prouvent que le thymol est doué d'une forte activité antifongique et antibactérienne. Concernant la chrysanthenone, aucune étude n'a entamé, jusqu'à maintenant les activités antimicrobiennes de ce composé bioactif. En outre, les composés monoterpéniques ont un grand pouvoir antimicrobien contre plusieurs souches bactériennes (Inoue *et al*.2004).

Conclusion

À l'issue des tests biologiques effectués dans cette partie de thèse, il ressort que le thymol et le chrysanthenone ainsi que leur mixture (thymol/chrysanthenone) combinée à 150 mg/kg ont montré qu'ils sont dotés d'une activité anti-oxydante, antimicrobienne et antiprolifération très remarquables. En plus de l'effet synergique entre le thymol et la chrysanthenone rend la mixture thymol/chrysanthenone combinée remarquablement bioactive vis-à-vis les agents oxydants, les germes bactériennes et fongiques et vis-à-vis les trois lignées cellulaires cancéreuses.



CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES



L'objectif de notre étude est d'évaluer l'impact des parties aériennes de *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba-alba* sur la prolifération de trois lignées cellulaires cancéreuses ; MCF-7, MDA-MB-231 et HepG2.

Nous avons montré que la mixture de deux huiles essentielles issues de *T.algeriensis* et *A.herba-alba* induisait une activité cytotoxique significative vis-à-vis les deux lignées cellulaires cancéreuses mammaires et la lignée cellulaire hépatique humains.

Thymus algeriensis et Artemisia *herba-alba* sont deux plantes médicinales largement utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine pour traités diverses pathologies.

Dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles pour chacune des deux plantes médicinales a été adoptée par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un Clevenger.

Un test de caractérisation photochimique a été réalisé par GC-MS pour la mise en évidence des composés chimiques appartiennent des deux huiles essentielles. La détermination de la nature de ces composés chimiques a permis d'établir un lien entre les différentes activités pharmacologiques testées et leur composition chimique.

Dans un second temps, nous avons ainsi entrepris de mettre en évidence des activités biologiques, autres que la cytotoxicité, à savoir ; l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobienne et hépatoprotective. Ainsi que l'évaluation d'innocuité de deux huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* à travers l'étude de toxicité aigüe, subaigüe et l'étude de l'hépatotoxicité par voie orale. À l'issue de ces études, il ressorts que la mixture de deux huiles essentielles d'*A.h* et de *T.a* a montré des activités antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique intéressantes comparées aux composés de référence synthétiques. En revanche, et suite aux résultats des différents tests de toxicité, nous avons prouvé l'innocuité de la mixture de deux huiles essentielles et que cette dernière ne présente aucun signe de toxicité biochimique ou histologique. En plus, cette dernière a présenté un effet hépatoprotecteur très significatif.

Les résultats obtenus des différents tests pharmacologiques corroborent à ceux obtenus par d'autres auteurs. Les multiples activités pharmacologiques de ces deux huiles essentielles sont due essentiellement à la richesse avérée de ces dernières en composés phénoliques, oxygénés et terpéniques. De ce fait, les deux composés majoritaires d'huiles essentielles de *T.a* et d'*A.h* respectivement le thymol et la chrysanthenone sont suggérés comme les molécules bioactives responsables de la bioactivité des deux huiles essentielles et leur mixture grâce à l'effet synergique de deux composés entre eux.

Parallèlement, nous avons recherché si le thymol et la chrysanthenone sont les deux molécules responsables de tous les effets pharmacologiques des deux huiles essentielles testés

précédemment. En effet, l'ensemble des données obtenues, à l'issue de tous les tests pharmacologiques réalisés, sont fortement corrélé aux résultats obtenus avec les huiles essentielles de *T.a* et *A.h* suggérant que le thymol et la chrysanthenone sont probablement les principaux composés actifs responsables de différentes activités pharmacologiques.

En perspectives plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés principalement :

- L'évaluation du pouvoir cytotoxique des huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* ainsi que celui de thymol et de chrysanthenone sur d'autres lignées cellulaires provenant d'autres cancers humains.
- La validation de nos résultats précédents en confirmant le pouvoir anticancéreux des huiles essentielles de *T.algeriensis* et d'*A.herba-alba* ainsi que celui de thymol et de chrysanthenone *in vivo* chez les rats. Des expériences d'induction de cancer chez les rats sont en cours d'investigation.
- L'identification des mécanismes d'action du thymol et du chrysanthenone qui contribuent à la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que leur dose thérapeutique et leur emplacement d'implantation. Il serait possible de fabriquer éventuellement des produits pharmaceutiques qui présentent un grand intérêt thérapeutique.
- Si les résultats seront encourageants on pourrait passer à la phase clinique de nos recherches pharmacologiques.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



[A]

Abu Darwish M S, Cabral C, Gonçalves M.J, Cavaleiro C , Cruz M T, Efferthe F, Salgueiro L. *Artemisia herba-alba* essential oil from Buseirah (South Jordan): Chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses. Journal of Ethnopharmacology. Volume 174, 4 (2015), Pages 153-160

Alaoui Mdarhri H, Benmessaoud R, Yacoubi H, Seffar, Guennouni Assimi H, Mouhsine H, Boussettine R, Filali-Ansari N, Lahlou F, Diawara I, Ennaji M M et Kettani-Halabi M. Approches thérapeutiques alternatives aux antibiotiques conventionnels : avantages, limites et application potentielle en médecine. *Antibiotiques 11* (12), 1826 ; *(*2022) https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826

Alharbi KS, Fuloria NK, Fuloria S, Rahman SB, Al-Malki WH, Cheikh MAJ, Thangavelu L, Singh Saskatchewan, Raju VSR, Jha, NK Facteur nucléaire-kappa B et son rôle dans les maladies pulmonaires inflammatoires. Chimique. Biol. Interagir. (2021), 345, 109568.

Akdis Cezmi A et SIMONS, F. Estelle R., 2006, Histamine receptors are hot in immunopharmacology. European Journal of Pharmacology. Volume 533 pages 69–76 (2006)

Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Aarab L, El Ajjouri M, Guedira A & Chaouch A. Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. Issue 4. Volume 158. (2011) https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516292

Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B,Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M, Chaouch A. Composition Chimique, Activité Antimicrobiennne et Antioxydante de l'huile Essentielle de Thymus Zygis Du Maroc. Phytothérapie, 9,149 (2011)

Amarti F, Satrani. B, Ghanmi. M, Farah. A, Aafi. A, Lotfi. A, El Ajjouri. M &Chaouch. A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus algeriensis et Thymus ciliatus du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14 (1), 141- 148 (2010)

Al-Azzawi R., Halvorsen P.A & Risør T. Context and general practitioner decision-making - a scoping review of contextual influence on antibiotic prescribing. BMC Fam. Pract. 22, 225 (2021).

Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. Life Sci;146:163-173 (2016)

Angelova PR & Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain : from physiology to neurodegeneration. FEBS Lett;592:692-702 (2018)

Almutary A & Sanderson BJ. The MTT and Crystal Violet Assays : Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. Int J Toxicol. 35(4) : 454–62 (2016)

Andrade F, Roca-Melendres M M, Durán-Lara E F, Rafael L, Shwartz S Jr. Stimuli-Responsive Hydrogels for Cancer Treatment: The Role of pH, Light, Ionic Strength and Magnetic Field. *Cancers* 2021, *13*(5), 1164 ; https://doi.org/10.3390/cancers13051164

Attia R. Messaoud C, Arraki K, Zedet C, Demougeot C, Boussaïd M, Girard C. Phytochemical screening and arginase inhibitory activity of extracts from several Tunisian medicinal plants. South African Journal of Botany. Volume 120 (2019)- 313-318

Avinash Kumar Jha, Nandan Sit. Extraction of bioactive compound from plant materials using combination of various novel methods : A review. Trends in Food Science & Technology. Volume 119 Pages 579-591 (2022)

[B]

Banks CJ & Andersen JL. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. Redox Biol;26:101270 (2019)

Ben Ouaghrem M, Vaugelade de S, Genty C, Pirnay S, Bouchonnet S. Characterization of photoproducts and global ecotoxixity of chlorphenesin: A preservative used in skin care products. International journal of Cosmetic sciences 44 (1), 10-19 (2022).

Barr, A. R. *et al.* DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat. Commun.* **8**, 14728 (2017)

Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F., and Kaloustian J. Composition chimique de l'huile essentielle d'Artemisia herba alba provenant de la région de Biskra (Algérie). Phytothérapie. 8(5). p277-281 (2010)

Belcastro E. Inflammation et stress oxydant dans l'athérosclérose : rôle dans les réponses vasculaires des S-nitrosothiols. Thèse de doctorat (2016). Université de Lorraine**.** Thèse.fr

Beani J-C. Produits de protection solaire. Journal de Pédiatrie et de Puériculture. Volume 35, Issue 5, Pages 213-233 (2022)

Benzarti A.M, Mhiri N, Beji M, Ben Jemaa A. Pneumopathie d'hypersensibilité aux enzymes protéolytiques du Bacillus subtilis dans l'industrie délavage des Jean : A case report Volume 50, issue 2. 77-81 (2010)

Bhatti J S, Bhatti G K, Reddy P H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. Molecular basis of disease, vol. 1863, no. 5, pp. 1066–1077 (2017)

Bleret V, Collignon J, Coucke P, et al- L'observance au traitement de longue durée : le cas particulier de l'hormonothérapie adjuvante du cancer du sein. *Rev Med Liège*. 65, 405-408. (2010)

Bellili S, Dhifi W, Ben Khsif Al-Garni A, Flaminie G, Mnif W. Essential oil composition and variability of Artemisia herba-alba Asso. Growing in Tunisia: Comparison and chemometric investigation of different plant organs. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (07), pp. 038-042 (2016)

Beddok A, Cottu P, Fourquet A, Kirova Y. Radiotherapy and targeted therapy for the management of breast cancer : A review. Cancer/Radiothérapie. Volume 27, Issue 5, 447-454 (2023). https://doi.org/10.1016/j.canrad.2023.02.002

Beloulou M, Lamara L. Place des techniques d'anesthésie locorégionale dans la prévention des douleurs chroniques postchirurgicales. Thèse de doctorat. Université Constantine 3 Salah Boubnider, Faculté de médecine. (2023) http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/3388

Benrouibah N & Nedjoud.K. L'inflammation et les maladies inflammatoires. Digital Repository-Abdel Hafid Boussouf University Center of Mila. Thèse (2021). http://dspace.centre-univ-mila.dz/jspui/handle/123456789/1133

Berenbaum F. AINS : la prévention des complicationsAINS : Prévention des effets secondaires. Monographies de la Revue du Rhumatisme. Volume 89, numéro 4 (2022), pages 296-299

Botelho MA, Nogueira N, Bastos GM, Fonseca S, Lemos T, Matos D. Antimicrobial activity of the essential oil from Lippia sidoides, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian journal of Medical and Biological Research 40, 356 (2007)

Ben El Hadj Ali, I.; Chaouachi, M.; Bahri, R.; Chaieb, I.; Boussaïd, M.; Harzallah-Skhiri, F. Chemical Composition and Antioxidant, Antibacterial, Allelopathic and Insecticidal Activities of Essential Oil of Thymus Algeriensis Boiss. et Reut. Ind. Crops Prod. 2015, 77, 631–639.

Bensakhria A. Toxicologie Générale, Chapitre II, Toxicité Aiguë- Analytical Toxicology. (2018). https://www.analyticaltoxicology.com/toxicite-aigue

Bouyahya A, Chamkhi I, Guaouguaou F E, Benali T, Balahbib A, El Omari N, Taha D, El-Shazly M, El Menyiy N. Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of Thymus capitatus Journal of Ethnopharmacology. Volume 259 (2020), 112925

Bouzian Y, Kandri Rodi Y, Essassi E M. Quinoline derivatives : syntheses, reactivities and pharmacological properties. Journal Marocain de Chimie Hétérocyclique. Volume 19 No. 1 (2020)

Bouzid, A., Chadli, R., & Bouzid, K. Étude ethnobotanique de la plante médicinale Arbutus unedo L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie*, *15*(6), 373–378 (2017).

Braig D, Nero T.L, Koch H-G, Kaiser B, Wang X, Thiele J.R, Morton C.J, Zeller J, Kiefer J, Potempa L.A, et al. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. Nat. Commun. 8 (2017).

Bray F, Laversanne M, Sung H, Rebecca FJ L. Siegel R, Soerjomataram I, DVM A J. Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 1–35. (2024)

[C]

Catherine MNP, Olivier MD. Chimiothérapie orale et soins de support : Enquête sur les besoins des pharmaciens d'officine Création du lien ville-hôpital. Thèse (2016). Université Angers

Chebili S. Etude rétrospective évaluant l'efficacité du Trastuzumab dans la prise en charge du cancer du sein HER2+ au niveau du service d'oncologie, unité de Belloua, CHU de Tizi-Ouzou. Thèse (2022). Université Tizi-ouzou MAMMERI Mouloud

Chaachouay N, Benkhnigue O, Fadli M, El Ibaoui H, Zidane L. Ethnobotanical and ethnopharmacological studies of medicinal and aromatic plants used in the treatment of metabolic diseases in the Moroccan Rif. Heliyon 5 e02191 (2019)

Cabral M, Toure A, Garçon G, Bah F, Dewaele D, Bouhsina B, Cazier F, Faye A, Courcot D, Fall D, Verdin A. Évaluation du statut oxydatif de la population infantile résidant à proximité d'une décharge à ciel ouvert. Environnement, Risques & Santé Volume 20 pages 35-44 (2021)

Cavassin F B, Baú-Carneiro J L, Vilas-Boas R R & Queiroz-Telles F. Sixty years of Amphotericin B : An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. Volume 10, pages 115–147, (2021)

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget, 9(6), 7204-7218. (2018).

Cohen J-L & Eleb M. Casablanca : mythes et figures d'une aventure urbaine. Ouvrages. (2019)

Cavassin FB, Baù-Carneiro JL, Villas-Boas RR. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. Infectuos Diseases and Therapy 10, 115-147 (2021)

Cao H , Chai TT, Wang X , Flaviana M. Morais-Braga B, Yang JH , Wong FC, Wang R, Yao H, Cao J , Cornara L, Burlando B , Wang Y, Xiao J & HDM Coutinho. Phytochemicals from fern. Phytochem Rev. 16, pages 379–440 (2017)

Chamanara, M., Abdollahi, A., Rezayat, S. M., Ghazi-Khansari, M., Dehpour, A., Nassireslami, E., et al. Thymol Reduces Acetic Acid-Induced Inflammatory Response through Inhibition of NF-kB Signaling Pathway in Rat colon Tissue. Inflammopharmacol 27 (6), 1275–1283 (2019)

Chassagne F, Samarakoon T, Porras G, Lyles J. T, Dettweiler M, Marquez L, Salam A.M, Shabih S, Farrokhi D.R, Quave C. A Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. Front. Pharmacol., 2021-Volume 11: https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586548

Chen, L. ; Deng, H. ; Cui, H. ; Croc, J. ; Zuo, Z. ; Deng, J. ; Li, Y. ; Wang, X. ; Zhao, L. Réponses inflammatoires et maladies associées à l'inflammation dans les organes. Oncotarget (2017), 9, 7204-7218

Chelucci, R.; Dutra, L.; Lopes Pires, M.; de Melo, T.; Bosquesi, P.; Chung, M.; dos Santos, J. Antiplatelet and Antithrombotic Activities of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. Molecules **2014**, 19, 2089–2099.

Cinelli M A, Do H T, Miley G P, .Silverman R B. Oxyde nitrique synthase inducible : régulation, structure et inhibition. Med Res Rev ; 1-32. (2019)

Couic-Marinier F. Aromatherapy, a new way to fight against antibiotic resistance ? Actualités Pharmaceutiques. Volume 62, numéro 627, pages 30-33 (2023)

Cici D, Corrado A, Rotondo C, Colia R, Paolo Cantatore F. Adipokines and Chronic Rheumatic Diseases: from Inflammation to Bone Involvement. Volume 18, pages 58–71, (2020)

Cheesbrough M. Detection of bence jones protein in urine. In Medical Laboratory Manual for Tropical Countries, (2nd edn). ELBS with tropical health technology / Butterworth Heinemann Ltd : Oxford ; 473-474 (1991).

Chouach A. Tlidjani N et Rabahi F. Conception d'un gel antibactérien à base des huiles essentielles (Clou de girofle, Thym et la Sauge). Thèse- dspace.univ-guelma.dz- (2023)

Craig K. Griffith and Steven. George. The Effect of Hypoxia on In Vitro Prevascularization of a Thick Soft Tissue. TISSUE ENGINEERING: Part A Volume 15, Number 9, (2009)

Cuzick J, Sestak I, Baum M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol. 11, 1135-1141 (2010)

Cuppone F, Bria E, Verma S, et al.— Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer- Meta-analysis of randomized trials. *Cancer*, 112, 260- 267 (2008)

[D]

Das S K, S Maji, Wechman S L. "Mda-9/Syntenin (Sdcbp): novel gene and therapeutic target for cancer metastasis," Pharmacological Research, vol. 155, p. 104695, (2020)

David M Z. & Da R S. Treatment of Staphylococcus aureus Infections. Current Topics in Microbiology and Immunology. Volume 409. p 325–383 (2017)

Delattre J F, Cohen R, Émile J F,Frédéric Bibeauc , Broudin C , Taieb, Andréa T , Svrcek M. Tumour deposit (TD), a probably underestimated poor prognostic criterion, to be taken into account in the therapeutic management of patients with stage III colon cancer. Annales de Pathologie. Volume 41, Issue 6, 535-543 (2021)

De Buyser M L, Sutra L. *Staphylococcus aureus*. In : Federighi M. Bactériologie alimentaire – Compendium d'hygiène des aliments. Economica, Paris, 25-51 (2005).

Diniz do Nascimento, L, Moraes, A.A.B. de, Costa, K.S. da, Pereira Galúcio, J.M, Taube P.S, Costa C.M.L, Neves Cruz, J, de Aguiar Andrade E.H.; Faria L.J.G. de Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules*, *10*, 988 (2020)

Diomande M, Ouali B, Eti E, Soh Kouakoul L C, Franck Brou K M, Gbané-Koné M, Jean-mermoz Djaha K,Ouattara B, Kouakou N M. Indications, efficacité et tolérance des anti-inflammatoires non stéroïdiens: à propos de 602 prescriptions au service de rhumatologie du chu de cocody. Revue Africaine et Malgache de Recherche Scientifique/Sciences de la Santé Vol. 1, No 2 (2013)

Dheeraj B, Kumar D, Dua K & Chellappan K-D. Phytochemistry and pharmacological activity of the genus artemisia. Archives of Pharmacal Research. Volume 44, pages 439–474, (2021).

Dib l, El Alaoui-Faris F.Z. *Artemisia campestris* L. Review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. Biomedicine & Pharmacotherapy. Volume 109 Pages 1884-1906 (2019)

Drayer C, Sablin MP, Faivre S, Raymond E. Topics in mTOR pathway and its inhibitors-Bulletin du cancer 96 (1), 87-94 (2009)

Drummond E M. Marete H N, Martyn E, Jacquier H, O'riordan J, Dolores C and gibney, eileen R. inhibition of pro-inflammatory biomarkers in thp1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. Phytotherapy research. Volume 27, no. 4, p. 588–594 (2013)

[E]

Erbasan F. Brain abscess caused by Micrococcus luteus in a patient with systemic lupus erythematosus: case-based review. Volume 38, pages 2323–2328 (2018)

Eclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides : nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 34:482–492 (2002)

El Alami Abderrazak & Chait Abderrahman. Enquête ethnopharmacologique et ethnobotanique sur les plantes médicinales dans le Haut Atlas central du Maroc. Algerian Journal of Natural Products 5:1 427-445 (2017)

Eloukili Mohamed. Valeur nutritive de l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*) comparée à l'unité fourragère de l'orge, master de science des aliments, université-Tlemcen, 38 (2013)

Eichenberger, P**.** Genomics and cellular biology of endospore formation. In Bacillus: Cellular and molecular biology. P. Graumann. Wymondham, UK, Caister Academic Press**:** 319-350 (2007).

Eddouks M, Ajebli M, Hebi M. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco. Journal of Ethnopharmacology Volume 198, 23 February 2017, Pages 516-530

Ed-dra A, Ghazi Filali F, Lo Presti V, Zekkori B, Nalbone L, Elsharkawy E M, Bentayeb A, Giarratana F. Effectiveness of essential oil from the Artemisia herba-alba aerial parts against multidrug-resistant bacteria isolated from food and hospitalized patients. Biodiversitas Journal of Biological Diversity.Vol. 22 No. 7 (2021). https://doi.org/10.13057/biodiv/d220753

El Hachlafi N**,** Benkhaira N, Ferioun M, Kansi F, Jeddi M, Chebat A, Addi M**,** Hano Christophe**, et** Fikri-Benbrahim Kawtar. Plantes médicinales marocaines utilisées pour traiter le cancer : étude ethnomédicale et aperçu des preuves pharmacologiques. 1645265 (2022) https://doi.org/10.1155/2022/1645265

Etuaful S., Carbonnelle B & Grosset J. Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of Mycobacterium ulcerans in early lesions of Buruli ulcer in humans. Antimicrob Agents Chemother, 49: 3182-3186 (2005)

Eva BM, Masa KH, Mojca S, Zeljko K, Urban B. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. Molecules 21 (7), 901 (2016)

El Moussaoui A., Jawhari FZ., Almehdi A.M., Elmsellem H., Fikri Benbrahim K., Bousta D., Bari A. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphénols of *Withania frutescens*. L Bioorganic Chemistry 93, 103337(2019)
El Hilah, F. B. A., Dahmani, J., Belahbib, N., & Zidane, L. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. Journal of Animal &Plant Sciences, 25(2), 3886–3897 (2015).

El Ouahdani, K.; Es-safi, I.; Mechchate, H.; Al-zahrani, M.; Qurtam, A.A.; Aleissa, M.; Bari, A.; Bousta, D. *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils: Chemical Analysis, Antioxidant Potential and In Vivo Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Acute Toxicity. Molecules 26, 6780 (2021) https://doi.org/10.3390/molecules26226780

Eunkung Kim, Youngshim Choi, Jihee Jang, and Taesun Park. Carvacrol protects against hepatic steatosis in Mice Fed a hight-fat diet by enhancing SIRT1-AMPK signaling. Evid based complent alternat med. 290104 (2013)

Elyemni M, Louaste B, Nechad I, Elkamli T, Bouia A, Taleb M, Chaouch M, and Eloutassi N. extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. De Scientific World Journal Volume 2019, page 6. (2019) https://doi.org/10.1155/2019/3659432

Ernesto B, Prisco P et Annamaria C. Carcinogenèse environnementale et transmission transgénérationnelle du risque cancérogène : de la génétique à l'épigénétique. *Int. J. Environ.* Rés. Santé publique *2*018, *15* (8), 1791. https://doi.org/10.3390/ijerph15081791

[F]

Fang H, Lan L, Qu Y, Zhang Q, Lv J Differences between central nervous system infection and neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in patients with systemic lupus erythematosus. J Int Med Res 46(1):485–491 (2018). https://doi.org/10.1177/0300060517722695

Fauvernier M. Splines multidimensionnelles pénalisées pour modéliser le taux de survenue d'un événement : application au taux de mortalité en excès et à la survie nette en épidémiologie des maladies chroniques. Thèse (2019). Version 1 (14-11-2019)

Fakchich J, Elachouri M. An overview on ethnobotanico-pharmacological studies carried out in Morocco, from 1991 to 2015: Systematic review (part 1). Journal of Ethnopharmacology. Volume 267, 1 March 2021, 113200

Ferradji A. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacia lentiscus. Thèse (2018). Université Ferhat Abbas–Setif.

Foutse Y. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans la région de l'ouest Cameroun : étude phytochimique et pharmacologique d'Afzelia africana J.E. Smith ex Pers. Thèse de doctorat. (2017)

[G]

Gaspard J L, Abelhauser A, Doucet C, Zanotti SV. Douleur chronique : enjeux psychopathologiques et perspectives cliniques. Psycho-Oncologie- volume 9-121-126 (2015)

Galvão L A, Bocchi C J. Considérations théoretiques sur le corps et le phénomene de la douleur à Nasio et Le poulichet : de l'image au corps en négatif. Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental Volume 26 (2023) https://doi.org/10.1590/1415-4714.e221271

Garg S S, Gupta J, Shikha Sharma S, Sahu D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compound and their mechanisms of action. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 152, 105424 (2020)

Gavahian M, Farahnaky A. Ohmic-assisted hydrodistillation technology : A review. Trends in Food Science & Technology. Volume 72, Pages 153-161 (2018)

Gauthier U, Mouele M, Atteke, Nkoulembene C, Kokolo B, Lendzele S, Sevidzem I. Ethnobotanical and ethno-pharmacological approach to ichthyotoxic plants of Gabon. Journal of medicinal plant research. Vol.16(5), pp. 154-164, (2022)

Ghanmi. M, Satrani. B, Aafi. A, Isamili. M.R, Houti. H, El Monfalouti. H, K.H. Benchakroun, M. Aberchane, L. Harki, A. Boukir, A. Chaouch, Z. Charrouf. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). Phytothérapie 8: 295–301 (2010)

Geck M S, Cristians S, Berger-González M, Casu L, Heinrich M, Leonti M. Traditional Herbal Medicine in Mesoamerica: Toward Its Evidence Base for Improving Universal Health Coverage. Sec. Ethnopharmacology. Frontiers in Pharmacology. Volume 11 (2020) https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01160

Ghanimi R, Ouhammou A, El Atki Y, El Hassan Bouchari M, Cherkaoui M. The Antioxidant Activities of Ethanolic, Methanolic, Ethyl Acetate, and Aqueous Extracts of the Endemic Species, Lavandula mairei Humbert (A Comparative Study between Cold and Hot Extraction). Ethiopian Journal of Health Sciences. Volume 32 No. 6 (2022)

Gheddouchi S, Mokhtari-Soulimane N, Merzouk H, Bekhti F, Soulimane F, Guermouche B, Meziane Tani A, Narce M. Low SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome. Nitric Oxide. Volume 49 Pages 40-46 (2015)

Ginwala R, Bhavsar R, De Gaulle I. Chigbu, Pooja Jain and Zafar K. Khan Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. Antioxydants , *8* (2), 35 (2019) https://doi.org/10.3390/antiox80200355

Giweli, A. A., Džamic, A M., Sokovic, M. D., Ristić, M. S., Marin, P. D. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. Central European Journal of Botany. 504-511 (2013)

Grabowska MM, Sandhu B, Day ML. EGF promotes the shedding of soluble E-cadherin in an ADAM10-dependent manner in prostate epithelial cells. Cell Signal. 2012;24:532-538.

Guerriaud M. Regulation of essential oils, a safety imperative. Actualités Pharmaceutiques, Issue 580. Volume 57/Issue 580, Actualités Pharmaceutiques. Pages 21-25 (2018).

Gulcin I, Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. Archives of toxicology 94 (3), 651-715, (2020)

Gwee K A, Cheng Y K, Yoon K H, Hee H T, Omar A, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic pain : implications of new data for clinical practice. Pages 1937-1948- volume 11-(2018).

Giordani, R.; Hadef, Y.; Kaloustian, J. Compositions and Antifungal Activities of Essential Oils of Some Algerian Aromatic Plants. Fitoterapia 79, 199–203 (2008)

Grellety T. Contribution à l'étude des mécanismes de sensibilité aux traitements antiandrogènes dans les cancers du sein moléculaires apocrines. Thèse (2018)

Guedes A P, Franklin G & Fernandes-Ferreira M. Hypericum sp : Composition des huiles essentielles et activités biologiques. Revue de phytochimie. Volume 11, pages 127 à 152, (2012)

Gulcin I & Alwasel S H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* , *11*(8), 2248 (2023); https://doi.org/10.3390/pr11082248

Guy J, Joëlle C, Claire J et al. Cancer du sein : de la thérapie ciblée à la médecine personnalisée. In Revue Médicale de Liège, 70 (5-6), p. 269-276 (2015).

[H]

Hamza N, Berke B, Umar A, Cheze C, Gin H, Moore N. A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology. Volume 238, 28 juin 2019, 111841

Hani M, Merghem M, Lebazda. Medicinal plants used against gastrointestinal disorders in setifian high plateau, algeria. Applied ecology and environmental research 21(2) :1459-1470 (2023)/ http://dx.doi.org/10.15666/aeer/2102_14591470

Hanjani Jamal-Mariam et al., 2017, « Traking the evolution of Non-small-Cell Lung Cancer », New England Journal of Medicine. 376: 2109-2121

Hanahan D. Hallmarks of Cancer : New Dimensions. Cancer Discov *(2022) 12 (1) : 31–46.* https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hassan S Etudes pharmacologiques d'un modèle cellulaire 2D/3D dans le cancer hépato-pancréatique. Thèse (2018). Version 1 (20-08-2020). theses.hal.science

Hernández-Pérez M and. Rabanal R. M, "Evaluation of the antinflammatory and analgesic activity of Sideritis canariensis var. pannosa in mice.," *J Ethnopharmacol*, vol. 81, no. 1, pp. 43–7 (2002).

Hussain A, Hayat M Q, Sahreen S, t ul Ain Q, and Bokhari S A I. Pharmacological Promises of Genus Artemisia (Asteraceae) : a Review. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: Pakistan Academy of Sciences B. Life and Environmental Sciences 54 (4): 265–287 (2017)

Hao C, Hu B, Lv X, Zhu S, ZZhen G, Jain A, Jain A, Gao B, Chai Y, Yang M, Wang X, Deng R, Wang L, Cao Y, Ni S, Liu S, Yuan W. Prostaglandin E2 mediates sensory nerve regulation of bone homeostasis. Nature Communications volume 10 (2019)

Harvested at Different Stages of Growth. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5, 37-45 (2017)

Hertzog S, & Razon L. Les douleurs chroniques résistantes : quand l'inconscient prend corps dans le colloque médecin–patient. Douleur et Analgésie, 33(2), (2020)113-118.

Hazzit M., A. Baaliouamer, A.R. Verissimo, M.L. Faleiro & M.G. Miguel, Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem*., 116, 714-721. (2009)

Hechachna H, Allal Benfekih L, Gourine N & Yousfi M. Seasonal variation of yield, chemical composition and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil growing in the south of Algeria. Journal of Essential Oil Bearing Plants Volume 26/Issue 5 (2023)

Hrytsyk R A, Struk O A, Ivanochko V M. Investigation of the effect of artemisia l. Herb extracts on the progress of the toxic tetrachloromethane liver damage. Medical and Clinical Chemistry. No. 4 (2019). https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10851

Huang J, Zhang L, Wan D, Zhou L, Zheng S, Shengzhang L, Yiting L. Extraction matrix and its therapeutic potential of cancer treatment. Signal Transduction and Targeted Therapy 6 (1), 153, 2021.

[I]

Ismaili R, Lanouari S, Abdeslam L and Moustaid K. Ethnobotanical study of moroccan aromatic and medicinal plants. International Journal of Innovation and Applied Studies. Volume 34 No. 2 Nov., pp. 403-413 (2021)

Ioannis T, Lydia K, Panagiota X, Fevronia K, Petros Z, Georgios G, Markos,Stelios F.A. Spontaneous cerebral abscess due to Bacillus subtilis in an immunocompetent male patient: A case report and review of literature; 6(16): 1169-1174 (2018)

Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpen alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. FEMS Microbiology Letters 237, 325-331 (2004)

Ioannis K, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. Frontiers in immunology 11, 553 (2020)

[J]

Jafri, H., & Ahmad, I. Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(1), 100911 (2020). https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100911

Jomova K, Raptova R, Suliman Y. Alomar S, Saleh H. Alwasel S, Nepovimova E Kuca K & Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants : chronic diseases and aging. Archives of Toxicology.Volume 97, pages 2499–2574 (2023)

Jordan VC. Evolution of long-term adjuvant anti-hormone therapy: consequences and opportunities. *Breast*, , 20, S1 (2011)

Jouad. H, Haloui. M, Rhiouani. H, El Hilaly. J et Eddouks. M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). Journal of Ethnopharmacology Volume 77, Issues 2-3, Pages 175-182 (2001)

[K]

Kang S-H, Kim Y-S, Kim E-K, Hwang J-W, Jeong J-H, Dong X, Lee J-W, Moon S-H, Jeon B-T,Park P-J. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *J. Microbiol. Biotechnol. 26*(1), 28-37 (2016)

Kamal F Z, Radu L, Ahmad A, Ech-Chahad A, Constantin T, Alin C & Daniel T. The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 25 pages Volume (2021)

Kim D H, Yong H J, Mander S, Nguyen H T, Nguyen L P, Park H-K, Cha H K, Kim W-K, Hwang J-IK. SP-8356, a (1S)-(-)-verbenone derivative, inhibits the growth and motility of liver cancer cells by regulating NF-ķB and ERK signaling. Biomolecules & Therapeutics 29 (3),331 (2021)

Kharbach M, Marmouzi I, El Jemli M, Bouklouze A, Heyden Y V. Recent advances in untargeted and targeted approaches applied in herbal-extracts and essential-oils fingerprinting - A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Volume 177, (2020), 112849

Khan A, Aung J J et Chaudhuri D. Le premier cas d'endocardite mitrale native due à Micrococcus luteus et revue de la littérature. Case Report in cardiology. Volume (2019) https://doi.org/10.1155/2019/5907319

Klein A.; Eliakim, R. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. Pharmaceuticals **2010**, 3, 1084–1092.

Koziol N. Huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, d'Eucalyptus radiata et de Corymbia citriodora : qualité, efficacité et toxicité. (2018). https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733789

Kovats E Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. Adv Chromatogr 7: 229–47 (1965)

Ku C.-M.; Lin, J.-Y. Anti-Inflammatory Effects of 27 Selected Terpenoid Compounds Tested through Modulating Th1/Th2 Cytokine Secretion Profiles Using Murine Primary Splenocytes. Food Chem. 2013, 141, 1104–1113.

Kumar M, Jaiswal S, Sodhi KK, Shree P, Singh DK, Agrawal PK, Shukla P Antibiotics bioremediation : perspectives on its ecotoxicity and resistance. Environ Int 124:448–461(2019)

Kurowska A, Ziemichód W, Herbet M and Piątkowska I C. The Role of Diet as a Modulator of the Inflammatory Process in the Neurological Diseases. *Nutrients* 15(6), 1436 ; (2023) https://doi.org/10.3390/nu15061436

Kyung-Mi C. Gun-Hee K Comparative Chemical Composition of Domestic and Imported *Chrysanthemum indicum L*. Flower Oils. Food Sci. Biotechnol. Volume 18, No. 5, pp. 1288-1292 (2009)

Katlyarov S, Floyd JL, Dupont M, Harbour A. Adu-Agyeiwaah Y, Asare-Bediako B, Chakraborty D, Kichler K, Rohella A, Calzi S L, Lammendella R, Wright J, Boulton M E, Oudit Y G, Raizada M K, Stevens B R, Qiuhong Li and Grant M B. Maintenance of Eteral ACE2 Prevents Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. Circulation Research 132 (1), e1-e21 (2023)

[L]

Lahlou R A, Samba N, Soeiro P, Alves G, Goncalves A C, Silva L R, Silvestre S, Rodilla J and Ismael M I. *Thymus hirtus* Willd. ssp. *algeriensis* Boiss. and Reut: A Comprehensive Review on Phytochemistry, Bioactivities, and Health-Enhancing Effects. *Foods* , *11*(20), 3195 (2022) https://doi.org/10.3390/foods11203195

Lamari Ilham. Effet de l'armoise blanche (Artemisia herba alba Asso) sur les performances zootechniques et la glycémie chez le poulet de chair. Thèse de master, p25 (2018)

Laetitia Coute, Chantal Dreyer, Marie-Paule Sablin, Sandrine Faivre, Eric Raymond. Rôle de la voie PI3K-AKT-mTOR dans le cancer et les thérapeutiques antitumorales. Volume 99, Issue 2, February Pages 173-180 (2012)

Lakhani, Sunil R, Dilly, Susan A and Finlayson, Caroline J, Basic pathology: an introduction to the mechanisms of disease. London: Hodder Arnold (2009)

Lehmann H, Pabst J.-Y H. Phytovigilance: A medical requirement and a legal obligation. Annales Pharmaceutiques Françaises. Volume 74, Issue 1, Pages 49-60 (2016)

Leopoldini, M., N. Russo et M. Toscano. "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." *Food Chemistry* 125(2) : 288-306 (2011)

Livorsi D, Comer A, Matthias M. S, Perencevich E N & Bair M. J. Factors influencing antibiotic-prescribing decisions among inpatient physicians: a qualitative investigation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 36, 1065–1072 (2015)

Lu X, Gu X, Shi Y. A review on lignin antioxidants : Their sources, isolations, antioxidant activities and various applications. Journal international des macromolécules biologiques. Volume 210, Pages 716-741 (2022)

Li C, Jia W W, Yang J, Cheng C, Olaleye O E. Multi-compound and drug-combination pharmacokinetic research on Chinese herbal medicines. Acta Pharmacologica Sinica volume 43, pages3080–3095 (2022)

Li, Y., Xu, J. z., Gu, C. x., Liu, G. l., and Tian, K. Carvacrol Suppresses Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes. J. Cel Biochem 120 (5), 8169–8176 (2018)

Legeay S, Faure S. Codeine and fluoxetine. Actualités Pharmaceutiques. Volume 62, Issue 626, Pages 17-19 (2023)

Léa D, Somé D, Yehouenou C, Somé C, Zoungrana J, Ouédraogo A-S, Lienhardt C, Poda A.Current status of antibiotic resistance in sub-Saharan Africa. Médecine et Maladies Infectieuses Formation. Volume 2, Issue 1-Pages 3-1 (2023)

Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgujar, P., Doltade, S. & Telang, A. J. N. I. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. 78**,** 122-129 (2014).

[M]

Mamo J CL Lam V, Al-Salami H, Brook E, Mooranian A, Nesbit M. Delivery of Probucol and Suppressed Neuroinflammation and Neurodegeneration. Therapeutic Delivery Volume 9, Issue 10, pages 703-709 (2018)

Maamar Sameut Y, Belhacini F, Bounaceur F. Ethnobotanical study in the south-east of Chlef (Western Algeria). AgroBiologiaVolume 10, No. 2, 2044-2061 (2020)

Madjida O. Etudes chimiques et biologiques d'Artemisia herba alba, Origanum vulgare L. et un composé synthétique. Thèse (2022) http://dspace.centre-univ-mila.dz/jspui/handle/123456789/1984

Maciejowski J, Lange T. Telomeres in cancer : tumour suppression and genome instability. Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 18, 175–186 (2017)

Marcuzzi A, De Leo L, Decorti G, Crovella S, The farnesyl transferase inhibitors tipifarnib and lonafarnib inhibit cytokines secretion in a cellular model of mevalonate kinase deficiency. Pediatric research 70 (1), 78-82 (2011)

Maqsood S, Adiamo O, Ahmad M, Mudgil P., (2020). Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients- Food chemistry. Tome 308/125522

Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. Nature Reviews Cancer (2009).

Manda P, Manda O, Vangah-manda M O, Kroa E et Djédjé Dano S. Étude des toxicités aigue et subaiguë du remède nature utilise dans le traitement du paludisme. Rev. Ivoir. Sci. Technol., 29-145 – 158 (2017)

Marinas, I.C.; Oprea, E.; Buleandra, M.; Badea, I.A.; Tihauan, B.M.; Marutescu, L.; Angheloiu, M.; Matei, E.; Chifiriuc, M.C. Chemical Composition, Antipathogenic and Cytotoxic Activity of the Essential Oil Extracted from Amorpha Fruticosa Fruits.Molecules, 26, 3146 (2021)

Moradi A, Srinivasan S, Clements J, Batra J- Beyond the biomarker role: prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. Cancer and metastasis reviews 38,333-346, 2019

Marsik, P.; Kokoska, L.; Landa, P.; Nepovim, A.; Soudek, P.; Vanek, T. In vitro Inhibitory Effects of Thymol and Quinones of Nigella sativa Seeds on Cyclooxygenase-1- and -2-Catalyzed Prostaglandin E2 Biosyntheses. Planta Med. 2005, 71, 739–742.

Matsuzawa A. Thioredoxin and redox signaling : Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. Arch Biochem Biophys ; 617:101-105 (2017)

Matyushin D. Supplementary Data and Code for the Article "Gas Chromatographic Retention Index Prediction Using Multi-modal Machine Learning". Figshare p. 57303746 (2020).

Matyushin D D, Sholokhova A Y & Buryak A K. Deep Learning Based Prediction of Gas Chromatographic Retention Indices for a Wide Variety of Polar and Mid-Polar Liquid Stationary Phases. *Int. J. Mol. Sci*, *22*(17), 9194 (2021) https://doi.org/10.3390/ijms22179194

Mekenza, N. Medjmedj, O. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de la graisse de la bosse de *Camelus dromedarius* sur un modèle murin d'inflammation aiguë. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine1, Algérie, vol 1-77 (2019).

Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., & Messaoudi, Z. A. Antibacterial effects of Thymus algeriensis extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41, e48548-e48548 (2019)

Messai L. 2011. Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'Est algérien (*Artemisia herba alba*). Thèse de Doctorat, Constantine.

Messias Rodrigues A, Messias Rodrigues A, Gonçalves S S, Carvalho J A, Luana P. Borba-Santos, Rozental S and Camargo Z P. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *J. Fungi. 8* (8), 776 (2022) https://doi.org/10.3390/jof8080776

Mendes, S. S., Bomfim, R. R., Jesus, H. C., Alves, P. B., Blank, A. F., Estevam, C. S., et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of Lippia gracilis leaves. J. Ethnopharmacol**.** 129, 391–397 (2010). http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.005

Meddour R, Sahar O, Jury S. New analysis of the endemic vascular plants of Algeria, their diversity, distribution pattern and conservation status. Willdenowia, BioOne Digital Library. 53(1-2):25-43 (2023). https://doi.org/10.3372/wi.53.53102

Miloš Nikolić, Jasmina Glamočlija, Isabel C.F.R. Ferreira, Ricardo C. Calhelha, Ângela Fernandes, Tatjana Marković, Dejan Marković, Abdulhamed Giweli, Marina Soković. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Journal of Dairy Sciences.Industrial Crops and Products. Volume 52, Junary 2014. P 183-190

Modi S J, Kulkarni M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors : Medicinal Chemistry Perspective. Medicine in Drug Discovery. Volume 2,100009 (2019)

Michel M. Analyse quantitative de quelques substances azotées et glucidiques en milieu biologique. Thèse Fac. Sci. Clermont-Ferrand, n° 43. (I97I).

Micucci, M.; Protti, M.; Aldini, R.; Frosini, M.; Corazza, I.; Marzetti, C.; Mattioli, L.B.; Tocci, G.; Chiarini, A.; Mercolini, L.; et al. Thymus Vulgaris L. Essential Oil Solid Formulation: Chemical Profile and Spasmolytic and Antimicrobial Effects. *Biomolecules, 10,* 860 (2020)

Mutuku C, Gazdag Z & Melegh S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Volume 38, 152, (2022)

Muthanna J. M, Anand U, Altemimi A B, Tripathi V, Guo Y and Pratap-Singh A. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of White Wormwood (Artemisia herba-alba), *Plantes (*2021), *10* (1), 164 ; https://doi.org/10.3390/plants100101644

Monodane T, Kawabata Y, Yang S, Hase S, and Takada H, "Induction of tumour necrosis factor-*α* and interleukin-6 in mice in vivo and in murine peritoneal macrophages and human whole blood cells in vitro by *Micrococcus luteus* teichuronic acids," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 50, pp. 4–12 (2001).

Meadows L K, Hurwitz I H. Anti-VEGF therapies in the clinic. Cold Spring harbor perspectives in medicine 2 (10), a006577 (2012)

[N]

Naglik J R, Gaffen S L, Hube B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. Current Opinion in Microbiology. Volume 52, Pages 100-109 (2019)

Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Golenbock D, Gresnigt MS, Heneka MT, Hoffman HM. Une carte directrice pour l'inflammation. Nat. Immunol. 18, 826-831. (2017)

Nagoor Meeran, M. F., and Prince, P. S. Protective effects of thymol on altered plasma lipid peroxidation and non enzymic antioxidants in isoproterenol- induced myocardial infarcted rats. J. Biochem. Mol. Toxicology. 26, 368–373 (2012). https://doi.org/10.1002/jbt.21431

Nyanke N R, Traore D, Cissoko M, Fofana Y, D SY, Dembele I A, Sanogo A, Keita K, Oumar A, Diassana N M, Landoure S, Kone N, Sangare M, Kone J, Malle M, Kaya Soukho A. Perception et Attitude des sujets âgés face à la douleur. Revue Africaine de Médecine Interne.Vol. 10, N° 1-3 (2023)

Navaneethan U, Njei B, Venkatesh PG, Lourdusamy V, Sanaka MR. Endoscopic ultrasound in the diagnosis of cholangiocarcinoma as the etiology of biliary strictures: A systematic review and meta-analysis. Gastroenterology Report 2015; 3(3):209-215.

Newmann DJ, Cragg GM, Hyde KD. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod 66(7): 1022-1037 (2004)

Nigam M, Mishra A.P, Pezzani R, Devkota H P, Plygun S, Salehi R, Setzer W N, Sharifi-Rad J. Bioactive Compounds and Health Benefits of Artemisia Species. Natural Product Communications (2019) : 1–17/ http://dx.doi.org/10.1177/1934578X19850354

Ngo B, Van Riper J M, Cantley L C & Yun J. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. Nature Reviews Cancer volume 19, pages271–282 (2019)

Nieto G, Ros G, Castillo J., Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) : A Review. *Medicines*, *5*(3), 98 ; (2018) https://doi.org/10.3390/medicines5030098

Nouioura G, Tourabi M, El Ghouizi A, Kara M, Assouguem A, Saleh A, Al Kamaly O, El Ouadrhiri F, Lyoussi B, Derwich E H. Optimization of a New Antioxidant Formulation Using a Simplex Lattice Mixture Design of *Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L., and *Petroselinum crispum* M. Grown in Northern Morocco. *Plants, 12(5)*, 1175 (2023). https://doi.org/10.3390/plants12051175

[O]

OCDE. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, N° 423, (2001)

OCDE (2018). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse. OCDE 453. Paris. http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation

OMS (Organisation mondiale de la Santé).- Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle, WOH/TRM/2000.1 ; annexe II : 31-35 (2003)

OMS., Résistance aux antibiotiques. (En ligne) 2023. http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/r%C3%A9sistance-aux-antibiotiques.

OECD. Test No. 423: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD:Paris, France,2002; ISBN 978-92-64-07100-1.

Orcurto A, Odermatt R, Stravodimou A, Wolfer A. Résistance à l'endocrinothérapie dans le cancer du sein : mécanismes et implications cliniques. Rev Med Suisse (2014) ; 10 : 1102-6

Ouedraogo S, Yuda J, Traore T K, Nitiema M, Diawara H Z, Yameogo J B G, Djande A, Belemnaba L, Kini F B, Ouedraougo S, Semde R. Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. International Journal of Biological and Chemical SciencesVol. 15 No. 2 (2021) https://doi.org/10.4314/ijbcs.v15i2.28

Ouchar Mahamat O, Kempf M, Lounnas M, Tidjani A, Cacher M, Benavides J A, Carrière C, Bañuls A-L,Hélène J-P, Ouédraogo A-S, Dumont Y, Godreuil S. Épidémiologie et prévalence des entérobactéries productrices de β-lactamases et de carbapénémases à spectre étendu chez l'homme, l'animal et l'environnement en Afrique de l'Ouest et du Centre. Journal international des agents antimicrobiens. Volume 57, numéro 1 (2021)

Ospina FE, Echeverri A, Zambrano D, Suso JP, Martínez-Blanco J, Cañas CA, Tobón GJ Distinguishing infections vs flares in patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology;56- i46–i54 (2017). https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew340

Owolabi, O. O., James, D. B., Sani, I., Andongma, B. T., Fasanya, O. O., & Kure, BPhytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory potential of *Feretia Apodanphera* root bark extracts. BMC Complementary and alternative medicine, 18(1), 12. (2018)

[P]

Pan S-Y**,** Litscher G, Gao S-H, Shu- Zhou F, Yu Z-L, Chen HQ, Zhang S-F, Tang M-K, Sun J-N, and Ko K-M. Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2014, Article ID 525340, 20 pages http://dx.doi.org/10.1155/2014/525340

Pappas PG, Rotstein CMF, Betts RF, Nucci M, Talwar D, De Waele JJ et al.Micafungin versus caspofungine for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. Clin infects Dis 45 (7): 883-93 (2007)

Paramanya A & Ali A. Role of oxidative stress in biological systems. Middle East Journal of Science, vol. 5, no. 2, pp. 155–162 (2019)

Pemmaraju, S.C.; Pruthi, P.A.; Prasad, R.; Pruthi, V. Candida Albicans Biofilm Inhibition by Synergistic Action of Terpenes and Fluconazole (2013)

Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, et al. Relationship between oxidative stress and the taking of oral contraceptives in women aged 40-48 years. *Human Reprod*, in press. (2007)

Piroth M, Frénard C, Eugène-Lamer J, Dreno B, Quéreux G. Hyperdermite sous inhibiteur de BRAF et/ou inhibiteur de MEK : revue de la littérature à partir d'une nouvelle observation. Annales de dermatologie et de vénérologie 147 (12), 833-841 (2020)

Pereira D R. Elementos do complexo de Édipo na toxicomania : a droga como afastamento da castração na neurose. Cadernos de psicanálise, 38(35)- 113-128 (2016)

Pei J, Xingyu P, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. Front. Pharmacol. Volume 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1147414

Poljsak B, kovaĉ V, Milisav L. Antioxydants, Food Pocessing and Health. Antioxydants 10 (3) 433 (2021)

[R]

Ramsey JT, Carrie Shropshire B, Nagy RT, Kevin Chambers D, Yin Li et Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. Journal of Ethnopharmacology. Volume 229 Pages 29-45 (2019)

Ramya D, Sujatha P, Raghavendra K, Keshavulu K, Ramesh T, Radhika K. Antioxidants and polymer coating for soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed longevity enhancement. Industrial Crops and Products.Volume 210 (2024)

Razzak N A, Abou N, W Y Ho , NR Zamberi ,Tan S W, Alitheen N B, Long K & S K Ouais. Cytotoxicité de l'eupatorine dans les cellules cancéreuses du sein humaines MCF-7 et MDA-MB-231 via l'arrêt du cycle cellulaire, l'anti-angiogenèse et l'induction de l'apoptose. Rapports scientifiques volume 9, 1514 (2019)

Reddeman R A, Glávits R, Endres J, Clewell A E, Hikr G, Vértesi A, Béres E et Szakonyiné I P. A Toxicological Evaluation of Mango Leaf Extract (Mangifera indica) Containing 60% Mangiferin. Journal of Toxicology (2019). https://doi.org/10.1155/2019/4763015

Reitman SN, Frankel S. A colorimetric method for the determination of SGPT and SGPOT. Am. J. Clin. Pathol., 25: 56- 62 (1957).
Rizzi V. Update on EFSA activities and *S. aureus* reporting in animals and food. Workshop of the NRLs for Coagulase Positive Staphylococci - Maisons-Alfort, France. (2011).

Rodrigo Cámara-Leret & Jordi Bascompte. Language extinction triggers the loss of unique medicinal knowledge 118 (24) e2103683118. Sciences biologiques (2021) https://doi.org/10.1073/pnas.2103683118

Romain Haudecoeur, Marine Peuchmaur,Basile Pérès,Maxime Rome,Germain Sotoing Taïwe, ,Benjamin Boucherle. Utilisations traditionnelles, propriétés phytochimiques et pharmacologiques des espèces africaines *de Nauclea* : une revue. Journal d'Ethnopharmacologie, pages 106-136 (2018)

Ruel J et al. IBD across the age spectrum: is it the same desease? Nature reviews Gastroenterology and Hepathology. 11. (2).88-98 (2014).

Rúa J, del Valle P, de Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto M.R. Combination of Carvacrol and Thymol: 534 Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus Aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, *16*, 622–629 (2019)

Rouillé T, Aractingi S, Kadlub N, Fraitag S, How-kit A, Moguelet P, Picard A, Fontaine R, Guégan S. Traitement local par inhibiteurs de MEK et AKT dans le nævus congénital mélanocytaire. Annales de Dermatologie et de vénéréologie. Volume 146, issue 12, Supplement, Pages A127-A128 (2019).

[S]

Salehi B, Martorell M, Arbiser J L. Antioxidants: positive or negative actors? Biomolecules, vol. 8, no. 4, p. 124 (2018)

Sadik C D, Miyabe Y, Sezin T, Luster A D. The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune inflammation of the joint and skin. Séminaires en immunologie. Tome 37, pages 21-29 (2018)

Sachdev, S.; Ansari, S.A.; Ansari, M.I.; Fujita, M.; Hasanuzzaman, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. Antioxidants 10, 277 (2021). https://doi.org/10.3390/antiox10020277

Saroyo H & Arifah IAN. Antioxidant Activity Using DPPH & Frap Method and Their Correlation with The Levels of Phenolic and Flavonoid Compounds from Nemba Plants (Azadirachta Indica A. Juss). Journal of Nutraceuticals and herbal medicine. Volume 3, No 2 (2020)

Scarcello E, Lambremont A, Vanbever R, Jacques P J, Lison D. Mind your assays : Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. (2020) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231634

Sim J.X.F, Khazandi M, Chan W.Y, Trott D.J, Deo P. Antimicrobial Activity of Thyme Oil, Oregano Oil, Thymol and Carvacrol against Sensitive and Resistant Microbial Isolates from Dogs with Otitis Externa. *Vet Dermatol*, *30*, 524 (2019)

Scott Jr L, Li N, Dobrev D. Rôle de la signalisation inflammatoire dans la fibrillation auriculaire. Journal international de cardiologie. Issue 287, pages 195-200 (2019) https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.10.020

Selma B, Abid Y, Leila R, Aicha B.T, Mahmoud I, Tekaya R, Olfa S, Abdelmoula L. Effets indésirables du méthotrexate au cours la polyarthrite rhumatoïde : prévalence et facteurs associés. La Revue de Médecine Interne. Volume 44, Supplement 2, Pages A531-A532 (2023)

Sobeh, M.; Rezq, S.; Cheurfa, M.; Abdelfattah, M.A.O.; Rashied, R.M.H.; El-Shazly, A.M.; Yasri, A.;Wink, M.; Mahmoud, M.F.Thymus Algeriensis and Thymus Fontanesii: Chemical Composition, In Vivo Antiinflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. Biomolecules, 10, 599 (2020)

Suresh, V.; Deepika, G.; Bantal, V.; Beedu, S.R.; Rupula, K. Evaluation of Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Potentials of Andrographolide and Forskolin: In Vivo Studies. J. Biol. Act. Prod. Nat. 8, 326–334 (2018)

Sayhi A, Lazreg N, Talbi I, Abdessalem M, Bouchech, Guezguez F, Ghannouchi I, Rouatbi S. L'impact du tabagisme sur le stress oxydatif au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive : une étude moléculaire. Revue des Maladies Respiratoires Actualités. Volume 16, Numéro 1, page 3 (2024)

Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi A A. Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology. Volume 140 Pages 5-12, (2018)

Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress : Oxidative eustress. Redox Biol;11:613-619 (2017)

Schade, A. E., Oser, M. G., Nicholson, H. E. & DeCaprio, J. A. Cyclin D-CDK4 relieves cooperative repression of proliferation and cell cycle gene expression by DREAM and RB. Oncogene 38, 4962–4976 (2019).

Schwartz, Christian, EBERLE, Joerg U. and VOEHRINGER, David, 2015, Basophils in inflammation. *European Journal of Pharmacology*. (2015).

Sobeh, M.; Rezq, S.; Cheurfa, M.; Abdelfattah, M.A.O.; Rashied, R.M.H.; El-Shazly, A.M.; Yasri, A.;Wink, M.; Mahmoud, M.F. Thymus Algeriensis and Thymus Fontanesii: Chemical Composition, In Vivo Antiinflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. Biomolecules 10, 599 (2020)

Solaimani B, Ramezani M, Saharkiz MJ. Biological control of postharvest disease caused by *Penicillium digitatum* and *P. italicum* on stored citrus fruits by Shiraz thyme essential oil. Adv Environ Biol 3:249-254 (2009)

Stocker M, Klingenberg C, Navér L, Nordberg V, Berardi A, El Helou S, Fusch G, Bliss M J, Lehnick D, Dimopoulou V, Guerina N, Seliga-Siwecka J, Maton P, Lagae D, Mari J, Janota J, Agyeman P K. A, Pfister R, Latorre G, Maffei G, Laforgia N, Mózes E, Størdal K, Strunk T & Giannoni E. Less is more : Antibiotics at the beginning of life. Nature Communications volume 14, 2423 (2023)

Suresh V.; Deepika, G.; Bantal, V.; Beedu, S.R.; Rupula, K. Evaluation of Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Potentials of Andrographolide and Forskolin: In Vivo Studies. J. Biol. Act. Prod. Nat. **2018**, 8, 326–334.

Spickett C M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2- nonenal : advances in chemistry and analysis. Redox Biology, vol. 1, no. 1, pp. 145–152, (2013)

Szewcczyk k, Chojnacka A, Gornicka M. Tocopherols and tocotriénols-bioactive dietary compounds; what is certain, what is boubt? International journal of molecular sciences 22 (12), 6222, (2021)

Srivastava RC, Husain MM, Hasan SK, Mohammad Athar. Green tea polyphénols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. Cancer letters 153 (1-2), 1-5 (2000)

[T]

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J. Ethnopharmacol. 110, 105–117.

Thibaut Brotelle, Jacques-Olivier Bay. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : Description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutique en cancérologie. Bulletin du cancer 103 (1), 18-29, 2016

Tiabi I, Tadlaoui Anouar K, Ennaji Y, Alaoui Sosse S, Kasmi Y, Saif I, Benchakroun M N, Ennaji M M. Immunological implication and Molecular Diagnostics of Genitourinary Cancer.

2023, Pages 311-321- Chapter 21-Impact of signaling in the development pathway of Genitourinary Cancers

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M.G, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. Mecha-531 nisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother 49*, 2474–2478 (2005)

Tsai DH, Riediker M, Berchet A, Paccaud F, Waeber G, Vollenweider P, Bochud M. Effets des expositions à court et à long terme aux particules sur les niveaux de marqueurs inflammatoires dans la population générale. Environ Sci Pollut Res Int. juillet 2019 ; 26 (19) : 19697-19704.

Tsikas D & Zoerner A.A Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion. Journal of Chromatography B. Volume 964, 1 Pages 79-88 (2014).

Tilaoui. M, Ait Mouse. H, Jaafari. A, Aboufatima. R, Chait. A, Zyad. A. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of amedicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Revista Brasileira* de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy. 21(4): 781-785 (2011).

Touhami, A., Chefrour, A., Khellaf, N., Bukhari, A., & Fadel, I. Phytochemical Characterization of the Essential Oils Obtained from Mediterranean Thymus spp. (Lamiaceae)

[U]

Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis : The Golden Mean of healthy living. Redox Biol ; 8:205-215 (2016)

Uritu CM, Mihai CT, Stanciu GD, Dodi G, Alexa-Stratulat T, Luca A, Leon-Constantin MM, Stefanescu R, Bild V, Melnic S**,** Tamba IT. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae in Pain Therapy: A Review. Pain Research and Management Volume 2018, page 44 (2018)

Ullah I, Karthik GM, Alkodsi A, Kjallquist U, Stalhammar G, Lovrot J *et al*: Evolutionary history of metastatic breast cancer reveals minimal seeding from axillary lymph nodes. J Clin Invest 2018; 128:1355-1370.

[V]

Viala C-G, Dernis E, Senbel E, Herman-Demars Becker H, J, Courbeyrette A, Flipo RM.. Persistance du méthotrexate dans le traitement de la PR, deux ans après initiation d'une première thérapie ciblée : résultats de l'étude prospective STRATEGE 2. Revue du Rhumatisme. Volume 90, Supplément 1, p A81 (2023)

Vignols F. Thioredoxines végétales et Interactiveomes Redox-dépendants. AGRIS - International System for Agricultural Science and Technology (2016).

Virot Claude, Bernard Franck. Hypnose, douleurs aigues et anesthesia (2e edition). Arnette-John Libbey Euro text (2018)

Vitale, I., Manic, G., Castedo, M. & Kroemer, G. Caspase 2 in mitotic catastrophe: The terminator of aneuploid and tetraploid cells. Molecular and Cellular Oncology (2017). doi:10.1080/23723556.2017.1299274

Veerakumari L. Botanical anthelmintics. Asian Journal of Science and Technology Vol.06, Issue, 10, pp. 1881-1894, (2015)

Van Tonder AMJ A & Cromarty A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Res Notes 8:47 (2015)

[W]

Webster, D.; Taschereau, P.; Belland, R.J.; Sand, C.; Rennie, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J. Ethnopharmacol.*, , *115*(1), 140-146 (2008). http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.014

World Health Organization. Assessing national capacity for the prevention and control of non communicable diseases : report of the 2020 global survey. Geneva. Mis en ligne sur Cairn.info

Winter C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. Exp. Biol. Med. **1962**, 111, 544–547.

Wang R, Li S, Jia H, Si X, Lei Y, Lyu J, Dai Z, Wu Z. Protective Effects of Cinnamaldehyde on the Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Apoptosis in Liver of Salmonella Typhimurium-Challenged Mice. Molecules 26, 2309 (2021)

William H, Frishman Md. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy on blood pressure and peripheral edema. The American Journal of Cardiology. Volume 89, Issue 6, Supplement 1, Pages 18-25 (2020)

World human organization Plan d'action national de lutte contre la résistance aux antimicrobiens du Mali. Examen des progrès dans le secteur de la santé humaine. 17 février 2023. https://www.who.int/fr/publications-detail/9789240065468 (Site consulté le 22 septembre 2023).

[X]

Xin, H.-L.; Zhai, X.-F.; Zheng, X.; Zhang, L.; Wang, Y.-L.; Wang, Z. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of Total Flavone of Cunninghamia Lanceolata. Molecules 17, 8842–8850 (2012**)**.

[Y]

Yang Y M, Hong P, Wen Xu, He Q-Y & Li B. Advances in targeted therapy for esophageal cancer Signal Transduction and Targeted Therapy volume 5, Article number : 229 (2020)

Yadav G.D. & Kamble S.B. Synthesis of carvacrol by Friedel– Crafts alkylation of *o*-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *84*(10), 1499–1508 (2009)

Yanishlieva N.V, Marinova E.M, Gordon M.H, Raneva V.G, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem. 64*(1), 59-66 (2017).

Younsi F, Mehdi S, Aissi O, Rahali N, Jaouadi R, Boussaid M, Messaoud C. Essential Oil Variability in Natural Populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (ASSO) and Incidence on Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activities. Volume 14. Numéro 7. 2017/ https://doi.org/10.1002/cbdv.201700017

Yu Z, Wang C, Zheng W, Chen D, Liu Y, Yang Y, Wei J. Anti-inflammatoires 5, 6, 7, 8-tétrahydro-2-(2-phényléthyl) chromones du bois d'agar d'Aquilaria sinensis. Bioorg. Chimique. 99, 103789 (2020)

Yu Z, Wu X & He J. Study on the antifungal activity and mechanism of tea saponin from Camellia oleifera cake. Volume 248, pages 783–795, (2022)

[Z]

Zayyad N., Farah A., Bahhou J. Analyse chimique et activite antibactérienne des huiles essentielles des trios espèces de Thymus: T. algeriensis, T. zygis et T. bleicherianus. Bulletin de la société royale de Liège ; Vol. 83, 2014, p. 118-132 (2014)

Zhang X, Wu X, Hu Q, Wu J, Wang G, Hong Z, Ren J., Laboratoire de traumatologie et d'infections chirurgicales. ADN mitochondrial dans l'inflammation du foie et le stress oxydatif. Sciences de la vie. 1er novembre 2019 ; 236 : 116464

Zhao H, Wu L, Yan G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. Signal Transduct Target Ther 2021; 6:263.

Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., & Ayadi, M. A. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss.et Reut. (Lamiaceae). Food and bioproducts processing, 89(4), 257-265 (2011)

Zrira S. Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco. Medicinal and Aromatic Plants of the World - Africa Volume 3. Chapter. p 91–125 (2017)